Presentación

EXCMO. SR. D. JUAN MANUEL REOL TEJADA
Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Presentó, una vez más, una nueva Monografía de la Real Academia Nacional de Farmacia, que creo puede ser útil a numerosos profesionales especialmente de la Sanidad y de la Defensa.

La Monografía es el resultado de un Curso celebrado en nuestra Academia en noviembre de 2003, en el que participaron entre otros, los Académicos de nuestra institución, especialistas de la Sanidad y de la Farmacia Militar, junto a miembros de las FAS, del Samur y del Cuerpo de Bomberos.

Los autores de los capítulos son grandes conocedores de sus materias y han sabido condensar en sus temas lo más importante de los mismos. Hemos podido contar con destacados Académicos de nuestra Institución, especialmente el Dr. Domínguez Carmona, Coordinador de la Obra, a quien agradecemos su trabajo, el Dr. Jiménez y el Dr. Ribas y de modo especial el Prof. Gestal Otero de la Universidad de Santiago de Compostela. Las FAS han participado a través del Teniente General Pardo de Santayana, los Generales de Sanidad Dres. Villalonga (médico) y Merino (farmacéutico), el Capitán Farmacéutico Dr. René Pita Pita, así como otros valiosos colaboradores.

La Real Academia Nacional de Farmacia ha cumplido con su obligación de sensibilizar a todos, y especialmente al mundo farmacéutico, en la defensa BQ (además de actuar en la prevención del riesgo nuclear). El farmacéutico por su formación técnica y sobre todo porque su profesión está dirigida a proteger y mejorar la salud de la población está llamado a desempeñar un papel esencial. Un importante papel del farma-

céutico está en la investigación de los modernos métodos de detección de agresivos ambientales, como las técnicas de ADN o el uso de biosensores, utilizando sistemas de fibra óptica o electroquímica, con luminiscencia, fluorescencia etc., basados en reacciones inmunitarias. Biosensores, enormemente sensibles, pueden detectar toxinas y hasta olores, incluidos el corporal, o técnicas que evalúan la densidad de las partículas microbiológicas o químicas por medio de láser que pueden estar conectadas electrónicamente a alarmas sonoras; también se han aprovechado el pigmento bacteriorodopsina del Halobacterium salinarum como sensor de agresivos. Igualmente, la red de oficinas de farmacia podría constituir un magnífico sistema de alerta ante posibles agresiones QB.

El farmacéutico tiene, también, un papel decisivo en la búsqueda de antídotos cada vez más seguros y eficaces, así como en la investigación de descontaminantes y por otro lado en la obtención de vacunas.

La Real Academia Nacional de Farmacia junto a los Ministerios civiles, Sanidad principalmente, y las Fuerzas Armadas, con sus técnicos militares sanitarios (médicos, farmacéuticos, veterinarios, químicos, biólogos...) cree necesaria una puesta en común de los conocimientos sobre agresivos BQ (sin olvidar los aspectos nucleares) en unos momentos en los que lamentablemente el terrorismo internacional es la primera amenaza para Occidente, como todos los Gobiernos reconocen.

Este prólogo me permite, una vez más, condenar el terrorismo, —cualquiera que sea—, porque todas las víctimas son inocentes, y representan una herida que no se cierra nunca. El 11 M no es un recuerdo en nuestra memoria, al contrario, es un estímulo permanente para vivir alerta ante el terrorismo. Los profesionales sanitarios tenemos una responsabilidad y un compromiso ineludible en la lucha contra las armas químicas y bacteriológicas (incuso nucleares) precisamente por nuestros conocimientos sobre estas materias y la exigencia de ponerlos al servicio de la sociedad y nuestro modelo de vida en democracia y libertad.

Prólogo

EXCMO. SR. D. BERNABÉ SANZ PÉREZ
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

La sección de *Salud Pública, Alimentación y Medio Ambiente* de la Real Academia Nacional de Farmacia organizó, dentro de sus actividades, un curso, titulado AGRESIVOS QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN LA GUERRA Y EN EL TERRORISMO, que tuvo lugar los días 11 al 13 y 18 y 19 de noviembre de 2003. El curso estuvo abierto a todos los estudiosos preocupados por los agresivos nucleares, biológicos y químicos (NBQ).

Contando con la experiencia en estos temas de nuestro infatigable académico, Dr. Domínguez Carmona, que actuó de coordinador, diversos académicos, militares, profesores universitarios e investigadores se esforzaron en condensar y poner al día, en un lenguaje asequible al numeroso, variado e interesadísimo auditorio asistente, primero la historia y la situación actual de los principales agresivos que podrían emplearse con fines bélicos, terroristas y criminales, después su mecanismo de acción y por último, los medios de protegerse contra ellos, tanto a nivel nacional o regional, como local y hasta meramente personal.

Los temas que se recogen en esta publicación son los que expusieron los distintos profesores del curso y se refieren a las sustancias utilizadas como agentes real o potencialmente agresivas. En general, tanto los agresivos químicos como los microbiológicos, son productos de bajo coste, fáciles de preparar y transportar, de aplicación muy versátil y con potencialidad de causar una gran mortalidad o incapacidad, sin alterar apenas las infraestructuras y recursos existentes. Esto ha determinado que se conozcan también como «arma nuclear de los pobres».

El teniente general, Excmo. Sr. Don José Ramón Pardo de Santayana, en el capítulo *La triple amenaza* presenta una breve pero profunda revisión de las armas NBQ, de las razones de su existencia, de la protección de las mismas y del problema que supone la amenaza terrorista y especialmente el conocido como «terrorismo suicida a gran escala».

Aunque el libro solo incluye los agresivos químicos y microbiológicos, también se refiere, con cierta frecuencia, a ciertos aspectos de la guerra nuclear (véase a este respecto los capítulos 1 y 2). En el capítulo 2, el general Villalonga Martínez, Director de Sanidad del Ejército de Tierra, nos muestra la historia de la guerra química, presentando una visión general no solo de la respuesta de la sociedad ante estas acciones, sino también de la cooperación internacional.

Los dos primeros capítulos, que acabamos de citar tienen un carácter general y constituyen el pórtico de las restantes, de aquí que incluyan una serie de generalizaciones y comentarios, necesarios para una mejor comprensión de los pormenorizados temas que más adelante se analizan.

En el capítulo 3, nuestro admirado Académico, Dr. D. Segundo Jiménez Gómez (q.e.p.d), recientemente fallecido, pasó revista a los agresivos químicos empleados más frecuentemente en la Primera Guerra Mundial y en los conflictos bélicos que se produjeron en el periodo entre guerras. Con la profundidad y amenidad que siempre le caracterizaron, dedica un apartado especial a los gases asfixiantes. Don Armando Merino describe magistralmente en el capitulo 4 los agresivos que bloquean la cadena respiratoria y las reacciones implicadas en el bloque. Por su parte, el profesor Gestal Otero expone, con gran detalle, en otro capítulo (el 5), las posibilidades que presenta el virus de la viruela como arma biológica.

En el capitulo de «Las toxinas como agresivos químicos», el profesor Domínguez Carmona, académico numerario de esta RAN de Farmacia, pone de manifiesto su amplia cultura científica y presenta una puesta al día del tema, que sirve de entrada a otros cinco capítulos, que firma con su hijo, el Dr. Domínguez de la Calle, y que son, a su vez, una clara manifestación del conocimiento que poseen los autores sobre los más variados aspectos de los agresivos químicos y microbiológicos, y de las posibles aplicaciones de la ingeniería genética en la guerra. Los desfo-

liantes, con especial énfasis en el Agente naranja, los estudia el Dr. Ribas Ozonas, quién, como ecotoxicológico responsable, analiza minuiciosamente esta sustancia.

El Dr. Del Rey Calero, al igual que los generales Pardo de Santayana y Villalonga Martínez, se refiere al Bioterrorismo en el capítulo 11 y como buen microbiólogo, hace una minuciosa descripción de los agentes activos bacterianos potencial o realmente utilizables en este campo. Por último, el Dr. René Pita Pita, profesor de la Escuela Militar de NBQ, trata de los componentes de la defensa química y biológica en operaciones militares, poniendo al alcance del lector, en un lenguaje fácil, claro y entretenido, los puntos que deben resaltarse en dichas operaciones.

En conjunto, a pesar de su denso contenido, este libro resulta ameno y de agradable lectura, aportando al lector, en un solo volumen, una gran cantidad de información que se encuentra ampliamente distribuida por muchas publicaciones especializadas. Espero y confío que tenga la misma acogida que el curso que le dió origen.

Madrid, 4 de diciembre de 2004

BERNABÉ SANZ PÉREZ

Presidente de la Sección
de Salud Pública, Alimentación
y Medio Ambiente

La triple amenaza

JOSÉ RAMÓN PARDO DE SANTAYANA Y COLOMA
Teniente General de las FAS españolas

Considero de gran actualidad este ciclo de conferencias para dar a conocer los principios científicos en los que se debe apoyar nuestra defensa contra las amenazas biológicas o químicas. Prueba de ello es la conferencia que dio el Secretario General de la OTAN Lord Robertson el pasado día 12 de noviembre en la que dijo que «junto a la necesidad de contar con una fuerza de reacción rápida, unos aviones de transporte estratégico o de repostaje en vuelo, unas armas de precisión es imprescindible una buena defensa nuclear, biológica y química». Por ello, a mí, como militar, me parece que me corresponde informar sobre las características de esta doble amenaza que unida a la nuclear se hace triple y se conoce en abreviatura como amenaza NBQ.

He de hacer la advertencia de que el tema que voy a exponer va a ser la triple amenaza: nuclear, química y biológica desde el punto de vista de la protección práctica contra la misma, que es el aspecto, en el que como militar, quizá pueda informarles con una cierta autoridad. Daré algunos datos también sobre las Convenciones internacionales que limitan o prohíben el empleo de estas armas.

Empezaré haciendo un poco de Historia. El peligro de la guerra, representada por el caballo bermejo del Apocalipsis, fue siempre el azote de la Humanidad. En el último siglo dos terribles guerras mundiales causaron millones de muertos e inmensos daños. Aunque la Comunidad internacional está cambiando de mentalidad y ya no da como inevitable la existencia de la guerra, sino que quiere evitarla, en el momento actual son más de 20 los conflictos bélicos de cierta importancia que siguen abiertos. En

Europa Occidental el rechazo a los horrores de la II Guerra Mundial y la reacción ante la formidable amenaza soviética que quería extender su imperio a todo el mundo, propició la creación en 1.949 de la Organización del Tratado del Atlántico Norte (en abreviatura OTAN o NATO) para la defensa del mundo occidental. Su logro más importante ha sido el medio siglo de paz entre las primeras potencias mundiales. Francia y Alemania, eternas enemigas, hoy son estrechos aliados. Estados Unidos y Rusia cooperan al mantenimiento de la paz en el seno de la OTAN.

En el ambiente esperanzador de la desaparición de la amenaza soviética, caído el muro de Berlín e iniciada la apertura económica de China, surge, a escala internacional el problema de la amenaza terrorista, del ataque indiscriminado e inopinado contra personas indefensas, aduciendo motivos políticos, religiosos, de injusticia social o simplemente de conquista del poder. Es cierto que este problema no es nuevo, comenzó poco después de la II Guerra Mundial con secuestros de buques y aviones, que fueron tolerados en un principio por falsos motivos políticos; apareció en España con la ETA hace casi 30 años con el pretexto de la lucha contra Franco; pero ha dado un paso de gigante con el ataque a las torres gemelas de Nueva York hace dos años, el 11 de septiembre, no sólo por el enorme número de víctimas producidas, y por haber atacado a los Estados Unidos que parecían inexpugnables, sino porque ha nacido *el terrorismo suicida a gran escala.* El fantasma de la guerra toma un nuevo aspecto.

La humanidad está preocupada e insegura. Sabe que, aunque no hay justificación moral alguna para el terrorismo, si que es cierto que para que éste aparezca y tenga apoyo social hace falta un «caldo de cultivo», por lo que es necesario eliminar no solo a los terroristas y sus organizaciones, sino también hacer desaparecer las circunstancias por las que los hombres fanáticos o desesperados se lanzan a la muerte para hacer daño, sin tener en cuenta a las personas inocentes. La educación, la ayuda social y el restablecimiento de la justicia y de la paz pueden contribuir a ir disminuyendo dicho fanatismo. Éstas son misiones fundamentales y urgentes de los políticos, de la sociedad y del conjunto de la comunidad internacional.

El factor principal que ha incrementado el peligro actual del terrorismo es la posibilidad de que emplee armas insidiosas, de destrucción masiva o de acción destructora de la salud humana: nucleares de acción radiológica, químicas o biológicas productoras de secuelas terribles y pro-

longadas. Las armas químicas, los llamados «gases asfixiantes» que se emplearon por primera vez a gran escala en la Primera Guerra Mundial, las «bombas atómicas» de la Segunda y los agresivos biológicos que aparecieron en forma masiva empleados por Saddam Hussein contra Irán y contra su propio pueblo kurdo.

Armas nucleares

En la primavera de 1.939, ante la inminencia de la guerra, los británicos empezaron a considerar la posibilidad de disponer de un arma nuclear en un futuro no muy lejano, para lo que se creó un restringido grupo de expertos, el Comité Maud, que empezó por buscar el procedimiento de obtener el uranio 235, lo que llevó al descubrimiento del plutonio. En el bando opuesto, Alemania investigó el aprovechamiento del «agua pesada» como moderador de neutrones para regular las masas críticas de las reacciones en cadena. Cuando Estados Unidos entró en la guerra, a consecuencia del ataque japonés a Pearl Harbour, sustituyó a los ingleses asumiendo la responsabilidad del proyecto del arma nuclear que denominó «Proyecto Manhattan». El día 16 de julio de 1.945 se lanza en Alamogordo la primera bomba de plutonio llamada «fatman» (gordinflón). El experimento fue un éxito y sus efectos semejantes a la explosión de 20.000 toneladas (20 KT) de trilita.

El Tercer Reich había sido derrotado, pero la guerra continuaba en el Pacífico, y el Gobierno de los EEUU decidió emplear la nueva arma para acelerar la capitulación del Japón sin tener que invadirlo, lo que hubiera producido un gran esfuerzo militar y pérdidas de vidas humanas muy numerosas. El 6 de agosto de 1.945 un bombardero B-29 el «Enola Gay» lanza sobre Hiroshima el «Little Boy» de uranio 235 causando más de 80.000 muertos y una terrible devastación. El piloto del avión, que desconocía lo que iba a suceder, entró, horrorizado, en el monasterio católico de las «Tre fontane» en Roma, donde permanece todavía. Tres días después, una bomba de plutonio sobre Nagasaki causa análogos efectos. El imperio nipón se rinde pocos días después.

En 1949 la Unión Soviética rompe el monopolio de los EEUU y lleva a cabo su primera explosión nuclear. Los americanos pasan de la bomba de fusión a la «H» termonuclear de fisión, de potencia mil veces su-

perior. Pronto Gran Bretaña (1952), Francia (1960) y China (1964) se unen al clan nuclear. Los misiles balísticos de alcance intercontinental proporcionan el vector mas apropiado para lanzar proyectiles nucleares. Pero con la crisis de los misiles de Cuba en 1962 comienza una lenta desescalada, que culmina en 1987 con la Iniciativa de Defensa Estratégica (SDI), conocida como «Guerra de las Galaxias», que «da la puntilla» al poderío soviético y acaba con la «Guerra fría».

Hoy día el Tratado de No Proliferación de armas nucleares TNP, firmado por 168 países, permite solamente la existencia de cinco potencias nucleares, pero hay estados nucleares «de facto«, que están en condiciones de producir estas armas, como Israel, India, Pakistán y Corea del Norte que no se han adherido a este tratado. Irán parece que va a hacerlo. La amenaza nuclear sigue existiendo.

Armas químicas

La Guerra química sigue en importancia a la nuclear y es mucho más antigua. Sin contar con los antecedentes históricos que se remontan a la guerra del Peloponeso entre griegos y troyanos, el primer empleo de agresivos químicos masivo y con graves efectos se realiza el 27 de octubre de 1917 en la I Guerra Mundial cuando los alemanes lanzan sobre los franceses una mezcla de gases estornudógenos, a la que responden aquellos con bombas lacrimógenas, y en esta escalada los alemanes generan en Yprés una cortina de gases de cloro de 10 km con terribles efectos.

Se generaliza el empleo de los llamados gases sofocantes: fosgeno, difosgeno y cloropicrina, del cianuro, de los rompemáscaras y se llega a la iperita o gas mostaza, que produce ocho veces más bajas que todos los demás agresivos empleados hasta entonces. El horror que causó el empleo de estos gases y el gran número de bajas (más de medio millón, de las que murieron 100.000) llevó a la firma del Protocolo de Ginebra en 1.925 que prohibía su empleo pero no su posesión. En la II Guerra Mundial ninguno de los contendientes empleó agresivos químicos en combate. En cambio si se emplearon en Vietnam agresivos lacrimógenos, estornudógenos, herbicidas y desfoliantes, y agresivos vesicantes y neurotóxicos en la guerra Irán-Irak. ETA también ha intentado fabricar armas químicas.

En el control de las armas químicas se han realizado verdaderos progresos. El 29 de marzo de 1997 entró en vigor la Convención que prohibe totalmente este tipo de armas, destruyendo las existentes, que ha sido firmada por la casi totalidad de las naciones, incluidos los Estados Unidos. Sin embargo Argelia, Libia, Egipto, Siria, Corea del Norte mantienen capacidad de Guerra Química. Estas armas son fáciles de producir a bajo precio y son muy difíciles o casi imposibles de detectar. Por tanto es muy posible que su proliferación pueda continuar.

Armas biológicas

Son también muy antiguas, porque ya los persas, griegos y romanos provocaban intencionadamente epidemias. Se dice que la gran peste que asoló a Europa en el siglo XIV, produciendo la muerte de la cuarta parte de la población, se inició en el sitio de Caffa, en Crimea, cuando los tártaros catapultaron algunos cadáveres con peste sobre los sitiados genoveses, que posteriormente introdujeron en Europa la enfermedad. En la lucha contra los indios los británicos usaron en Fort Pitt mantas inoculadas de viruela y en la Guerra Civil americana y en la de los Boers en Sudáfrica se produjeron envenenamientos de fuentes con hombres y animales muertos de enfermedades contagiosas.

En el siglo que acaba de terminar han existido procesos de experimentación de agentes biológicos, que han salido a la luz pública como consecuencia de accidentes, como en el caso de la isla Gruinard en la costa oeste de Escocia en la que se esparció el bacilo del carbunco, en 1.950 en San Francisco se produjo una nube bacteriológica con ocasión de unas maniobras y en 1.979 en Sverdlosk, en los Urales hubo otra epidemia de carbunco pulmonar que causó la muerte de más de doscientas personas. Tras el ataque del 11-9-02 a las Torres gemelas de Nueva York se produjeron varios casos de agresiones con polvos de antrax, que causaron varias muertes en los Estados Unidos

El Protocolo de Ginebra de 1.925 sobre armas químicas ya incluía la prohibición de las biológicas y toxínicas, así como su destrucción. El Convenio de armas biológicas y tóxicas de 1.972 fue firmado por la mayor parte de los países, pero no por todos como por ejemplo Argelia, Israel y Mauritania. Otros como Libia y Egipto lo firmaron pero no lo llevan a

cabo. El control de la fabricación y almacenamiento de medios biológicos con fines agresivos es tan difícil como el de los químicos.

La Defensa NBQ

¿Qué hacemos en España, que hacen nuestras Fuerzas Armadas, para contrarrestar estas amenazas? Empecemos por decir que lo mismo que los demás países de la OTAN, en la que llevamos integrados 21 años. Hay una organización de Protección Civil, que por cierto creó en 1.960, a base de la antigua Jefatura de Defensa Pasiva, un General Pardo de Santayana, y hay un sistema de Defensa NBQ en las FAS. Voy a referirme principalmente a esta Defensa, que sirve de base a la Protección Civil, con la que está en estrecho enlace, y a como está organizada en la OTAN y en España.

Tras más de 50 años de vida y acabada la «guerra fría», la OTAN responde hoy a otras amenazas diferentes, que pueden dar lugar a conflictos nacionales o internacionales como el citado terrorismo internacional, en especial el de Al Qaeda, a los países con regímenes tiránicos y agresivos a los integrismos fanáticos a los nacionalismos excluyentes y agresivos, a las injustas desigualdades económicas y sociales dentro y entre los países. A pesar de que ha desaparecido la terrible amenaza de una guerra mundial nuclear, la defensa contra las armas nucleares, químicas y biológicas es ahora psicológicamente más preocupante, porque los posibles agresores no son países definidos, pueden surgir en el momento más inesperado y sus objetivos afectan a la humanidad entera. La incertidumbre es, a veces, peor que el peligro esperado.

Una de las mayores ventajas de la existencia de la OTAN es que ha hecho posible llegar a una doctrina militar común, lo que posibilita la interoperatividad entre las fuerzas aliadas, pertenezcan a la Organización o colaboren con ella. Esta acción conjunta con iguales métodos y procedimientos es algo insólito en la historia militar y permite lograr insospechados rendimientos. España como miembro destacado de la OTAN ha adoptado su doctrina, y por lo tanto, también lo ha hecho en el terreno de las armas nucleares, químicas y biológicas. Las bases de esta doctrina están contenidas en el documento NATO RESTRICTED, es decir, de carácter restringido, de fecha 15.05.2.001 que fue aprobado por el Acuer-

do normalizado OTAN (STANAG 2451), y que es designado con el título ATP-59 (A). Vamos a comentarlo haciendo un resumen del mismo, adaptado al objeto de esta exposición.

En las «Directrices para el Planeamiento de la defensa de la OTAN», MC 299, se estima que en la actualidad la amenaza de ataques masivos y repentinos con este tipo de armas es remota. Pero al existir países y organizaciones terroristas que tienen armas NBQ o están en condiciones de adquirirlas, hay que tener planeadas operaciones para contrarrestar el riesgo de un ataque con Armas de Destrucción Masiva (AMD) contra las Fuerzas de la OTAN o contra las poblaciones de sus países, o el riesgo de que, por cualquier motivo, se liberen substancias nocivas procedentes de plantas o reactores que las puedan producir. Estas emisiones llamadas ROTA (Release Other Than Attack) en el lenguaje OTAN, también dan lugar a un ambiente similar al NBQ.

Las Fuerzas de la OTAN han de estar en condiciones de llevar a cabo operaciones prolongadas en un ambiente NBQ, lo que obliga a desarrollar una doctrina, unos procedimientos, y disponer de los medios y equipos eficaces para esta defensa. El objetivo de la defensa NBQ civil y militar es proteger a las personas de los efectos políticos, psicológicos, personales y colectivos del empleo de estos medios, instruirlas y equiparlas para que puedan sobrevivir e incluso operar en tales ambientes. Unas Fuerzas Armadas equipadas e instruidas para combatir las armas NBQ reducirán las posibilidades de que el posible agresor las emplee y servirán para apoyar a la Protección Civil siempre cuando ésta lo necesite.

La defensa NBQ ha de estar preparada permanentemente, porque siempre se pueden producir accidentes o acciones delictivas individuales. Aunque en nuestra Patria la probabilidad de ataque del terrorismo internacional con estos medios sea hoy día muy pequeña, ésta puede incrementarse en cualquier momento sin que de tiempo a adoptar las medidas necesarias si éstas no están ya previstas.

No es necesario describir los efectos de los ataques nucleares (recordemos las terribles destrucciones de Hiroshima y Nagasaki) y también de los químicos o biológicos. Las consecuencias estos ataques o de emisiones industriales tóxicas pueden variar desde la incapacitación temporal hasta la muerte inmediata o posterior de las personas desprotegidas. La contaminación posterior NBQ requiere un gran esfuerzo de reconoci-

miento, control y descontaminación de las zonas afectadas, así como un enorme esfuerzo en todos los escalones de la asistencia sanitaria. El impacto psicológico en la población sería grave y hay que estar preparados para superarlo.

Para la Defensa NBQ resulta de primera necesidad tener información sobre el riesgo o las amenazas NBQ de cualquier fuerza o elemento potencialmente hostil, valorando sus capacidades, limitaciones e intenciones probables. Hay que procurar, por todos los medios, eliminar la sorpresa, en especial en los primeros ataques.

Medidas de Defensa NBQ

Vamos a referirnos al caso más peligroso, al de un ataque masivo con cualquiera de estos tres tipos de armas, porque en el quedan incluidos los ataques de menor importancia. Los principios básicos de esta defensa son la prevención del riesgo, la protección y el control de la contaminación. Su aplicación dependerá de varios factores: el tipo, grado y persistencia del peligro, la influencia del clima y del terreno y el tiempo necesario para reaccionar ante el ataque. Cuando este ataque se haya producido la defensa tendrá en cuenta las víctimas y daños sufridos, el esfuerzo necesario para eliminar o reducir la contaminación, las probabilidades de sucesivos ataques NBQ y la explotación del éxito del ataque por parte del enemigo, etc.

La *prevención del riesgo* consiste en adoptar medidas individuales y colectivas para detectar, identificar, prevenir y reducir los efectos de los peligros NBQ. Entre ellas están: un sistema adecuado de inteligencia que informe sobre riesgos y ataques; medidas de defensa pasiva tales como dispersión fuera de ciudades, ocultación y enmascaramiento, o discreción en las comunicaciones; medidas de protección individual y colectiva, como abrigos y refugios; delimitación de zonas contaminadas y movimientos para salir de las mismas; medidas de medicina preventiva. La alerta anticipada es un componente vital para prevenir el peligro, mediante alarmas automáticas a distancia, sensores para detectar explosiones o agresivos químicos o biológicos, y reconocimientos con vehículos NBQ y vigilancias adecuadas.

La *protección individual y colectiva* mejora la capacidad de supervivencia, por lo que todas las personas sometidas a una amenaza NBQ cierta y real deben estar instruidas y equipadas para defenderse de los efec-

tos inmediatos y residuales de estas armas y los miembros de los Ejércitos y de la Protección Civil han de seguir desempeñando su misión. Existen medidas preventivas (inmunizadores, repelentes, medicamentos) contra radiaciones ionizantes, intoxicaciones químicas o infecciones bacteriológicas. Todo el personal de defensa NBQ debe disponer de máscara, equipo de primeros auxilios, de descontaminación, ropa de protección y dosímetros para determinar la radiación. La mejor defensa individual en caso de ataque nuclear es enterrarse, pues la tierra es buen material protector. Un refugio doméstico, un pozo de tirador adecuadamente preparado o un vehículo acorazado proporcionan una protección excelente contra la radiación.

La protección colectiva de edificios, vehículos, buques o aviones permite disminuir la protección individual dando lugar a una mayor comodidad para la persona. En los refugios se emplea normalmente el sistema de sobrepresión, que impide la entrada de aire contaminado en el área protegida. La mayor protección se logra mediante un área de control de la contaminación y una esclusa hermética apropiada, con lo que se asegura la entrada y salida de personal sin afectar a la protección colectiva. Si falta el área de control de la contaminación no podrá entrar el personal afectado por agentes líquidos. El sistema de protección más simple es el de cerrar herméticamente ventanas o puertas.

El *control de la contaminación*, sea ésta radiológica, química o bacteriológica es el tercer pilar de la Defensa NBQ. El personal debe descontaminarse inmediatamente si no hubiera estado protegido y lo más pronto posible si lo estuviera. El equipo, material y abastecimientos deben recubrirse con cubiertas especiales para impedir su contaminación. El objeto de esta descontaminación, además del de salvar vidas y evitar daños a la salud de las personas, es reducir o eliminar la necesidad de emplear el equipo de protección individual y mantener el ritmo de vida, y en especial las operaciones defensivas. La descontaminación puede ser de tres clases: inmediata, que es la que requiere el personal; operacional de material o instalaciones, que tiene por objeto recuperar la actividad defensiva militar y civil; y descontaminación completa, para eliminar totalmente las consecuencias del ataque. Es muy importante contar con dispositivos de detección para indicar las zonas contaminadas y con equipos de descontaminación de vehículos, armas e instalaciones permanentes. Las Unidades militares de Defensa NBQ disponen de equipos especiali-

zados con experiencia para operaciones de descontaminación a gran escala. En estos días se está procediendo a la entrega al Ejército de un buen número de vehículos de protección NBQ.

Conducción de operaciones en ambiente contaminado. La primera alternativa que se presenta es, en el caso en que sea posible continuar cumpliendo la misión encomendada, abandonar la zona contaminada, haciéndolo con toda urgencia, sin más que controlar que al salir de dicha zona no se propague involuntariamente dicha contaminación a zonas no afectadas. Cuando no sea posible tal desplazamiento, se ha de continuar cumpliendo la misión, aunque sea con limitaciones de tiempo y espacio y reduciendo el peligro lo más posible.

Los efectos sobre el personal son grandes: el calor que produce el equipo de protección afecta al rendimiento individual, por lo que es necesario tener una instrucción previa y tomar medidas de adaptación del cuerpo a las condiciones de este esfuerzo físico y psicológico. Además de aprender a soportar el calor es importante preparar al personal para actuar normalmente con el equipo individual durante periodos prolongados. Se debe suministrar agua y alimentos líquidos a través de la máscara.

Las medidas defensivas para disminuir el deterioro producido por el ambiente NBQ son muy diversas: reducir el nivel de protección individual cuando disminuye el peligro, reducir el nivel de exposición individual mediante la rotación del personal, especialmente en los puestos de trabajo más pesado, llevar a cabo periodos de descanso más frecuentes y prolongados aunque se tarde más tiempo en realizar los trabajos, proporcionar abastecimiento de agua adecuado, emplear transportes, material mecánico auxiliar y equipos de excavación para disminuir el esfuerzo humano, etc.

Consideraciones especiales

Las *condiciones meteorológicas* influyen esencialmente en el comportamiento de los agresivos NBQ, en especial el viento, la temperatura, las precipitaciones y la humedad. El primero puede favorecer o perjudicar según su dirección y sentido, y su velocidad puede favorecer la fragmentación de la nube y disminuir su persistencia; la temperatura acelera la evaporación de los agresivos químicos; la luz solar decrece la actividad de los

agentes biológicos; las precipitaciones atmosféricas disminuyen la eficacia de los agentes químicos y de la lluvia radiactiva, lo mismo que la humedad en un grado menor, que en cambio favorece a algunos agentes biológicos. Las *condiciones del terreno* modifican los vientos, la temperatura y la humedad de la zona, los suelos porosos absorben los agresivos líquidos y la vegetación impide la llegada al suelo de la contaminación, pero los bosques espesos conservan gran parte del agresivo.

El sistema de *apoyo sanitario* es fundamental para la Defensa NBQ. Empezando por la valoración médica inicial para determinar el tipo de lesión y el tratamiento médico necesario y siguiendo por las necesidades de evacuación, descontaminación, tratamiento, hasta llegar al alta médica. Los pacientes deben seguir llevando el equipo de protección durante la evacuación. Se debe evitar que las ambulancias resulten contaminadas, para lo que deben disponer de protección colectiva para los pacientes y personal médico o al menos el interior de la ambulancia debe estar protegido químicamente para favorecer su descontaminación.

Una *instrucción* NBQ lo más real posible refuerza el sistema de defensa y ayuda a reducir la influencia psicológica y fisiológica sobre el personal. Las diversas situaciones de un ataque NBQ deben plantearse en todas las fases de la instrucción individual, así como en los ejercicios terrestres, navales y aéreos para simular una amenaza creíble. Todas las unidades militares y de Protección Civil deben instruirse en los procedimientos de detección, alerta e información y los primeros auxilios y el tratamiento de las víctimas deben integrarse en la instrucción sanitaria. El personal ha de saber colocarse la máscara de forma rápida y correcta, cambiarse la ropa y equipo contaminado sin transferir dicha contaminación a la piel o la ropa interior, debe dominar los procedimientos de entrada y salida en instalaciones protegidas y emprender sus acciones sin ayuda exterior. Deben simularse los ambientes contaminados durante los ejercicios para evaluar la capacidad de la unidad de sobrevivir en un ambiente tóxico.

El *equipo y el material* deben ser capaces de aguantar un ataque nuclear y diseñarse para resistir al menos lo mismo que el hombre que debe usarlos. Todos los vehículos, embarcaciones, aviones y material esencial deben ser capaces de resistir la contaminación química y biológica, así como poderse descontaminar rápidamente.

La *contaminación residual* plantea un gran problema a las fuerzas de combate y a su apoyo logístico, así como a la población en general. Hay que tener en cuenta las prioridades de evacuación y tratamiento de pacientes contaminados, los procedimientos de tratamiento de víctimas en cantidades masivas, los desplazamientos de personal por zonas contaminadas, los procedimientos de descontaminación y evacuación de víveres, agua y material, y el reabastecimiento de equipos NBQ.

Las *Unidades NBQ* localizarán rápidamente las zonas de peligro, delimitando las que estén contaminadas y descontaminando las que se le ordenen, tanto en operaciones de combate como en cualquier otra circunstancia. Establecerán: alerta temprana de los posibles peligros, prevención de la contaminación cuando sea posible, y si no lo es, una protección y descontaminación eficaz, el empleo de los equipos de protección individual y colectiva, una instrucción NBQ lo más real posible y un apoyo sanitario eficaz.

Esta doctrina de la OTAN genera unas necesidades de reglamentos, de procedimientos, y de sistemas, medios y ejercicios de instrucción. El ATP-59(A) enumera todos estos extremos en sus tres Anexos, que dan lugar a una serie de manuales, instrucciones y documentos que detallan las precauciones necesarias.

La doctrina española

Como no podía ser menos, el Ejército de Tierra español ha desarrollado estos puntos doctrinales de la OTAN en diversos manuales, el principal de los cuales se llama «Protección NBQ de las unidades» OR7-019 de 1.07.2002, que ya no se refiere sólo al caso de empleo de estas armas en forma masiva, sino a los de utilización por países del tercer mundo u organizaciones terroristas. Por eso es el más apropiado para dar idea en lo que consiste la protección individual.

Los medios actuales de detección y localización de objetivos, así como los de lanzamiento y guía de proyectiles y lo accesible de estos medios y tecnologías a cualquier nación u organización interesada, hacen que ningún punto del globo pueda estar libre de esta amenaza. Por otra parte, el aumento del número de industrias químicas e instalaciones biológicas o nucleares hace más probable la posible emisión de materiales

tóxicos en el medio ambiente, fruto de la negligencia, de daños colaterales o del uso mal intencionado. La posibilidad de un escape químico es mayor en los países en los que los niveles de seguridad son bajos. Los materiales tóxicos más utilizados son: cloro, amoniaco, disolventes, pesticidas, grasas y productos empleados en la fabricación de plásticos. Algunos son inflamables, explosivos o reaccionan violentamente con el aire, el agua u otras substancias. Los efectos a corto plazo pueden ser la irritación, el sofoco, la náusea, el vómito y el vértigo y a largo plazo lesiones en diferentes órganos, malformaciones orgánicas o efectos cancerígenos.

Efectos de los ataques NBQ e incidentes ROTA

Los ataques de *armas nucleares* pueden provocar multitud de víctimas, considerables daños materiales, obstaculizar el movimiento y restringir el empleo de instalaciones esenciales y de las comunicaciones. Los efectos de la radiación nuclear inicial pueden variar desde ser leves y de carácter temporal, hasta la incapacitación inmediata y la muerte. El «flash» o fogonazo afecta a los ojos pudiendo producir ceguera permanente o temporal. La radiación térmica puede causar quemaduras graves al personal desprotegido. La onda de choque destruirá edificios, vehículos y equipos, y ocasionará heridas o incluso la muerte. El «pulso electromagnético» y los efectos de la radiación sobre equipos electrónicos dañaran o impedirán el empleo de las comunicaciones. La lluvia radiactiva y la radiación de neutrones requerirán las correspondientes operaciones de descontaminación.

Los efectos de los agentes *biológicos o químicos* y los de los productos industriales tóxicos supongo que han sido analizados exhaustivamente en las conferencias anteriores.

La *contaminación NBQ, incluida la que resulta de los ROTA,* puede requerir amplias medidas de reconocimiento y su eliminación, si hay víctimas tanto NBQ como convencionales, acarrea un gran esfuerzo material y sanitario. Su efecto sobre personal poco instruido será grave, y le impedirá cumplir su misión, incluso en zonas no directamente afectadas. Los principios de esta descontaminación son tres: realizarla lo antes posible; establecer prioridades, porque no es necesario descontaminar todo siempre;

y evitar extender la contaminación, por lo que los equipos de descontaminación deben desplazarse a las unidades afectadas y no al contrario.

Las estaciones de descontaminación deben disponer de agua abundante, caliente y a presión. El personal empezará por enjabonarse completamente, enjuagándose con abundante agua, repitiendo la operación al menos tres veces. El enjabonamiento debe ser enérgico y metódico procurando que no se produzcan excoriaciones en la piel. Las manos se lavarán con especial atención, pues pueden estar más contaminadas que el resto del cuerpo. Se cortarán previamente el pelo y las uñas. Se evitará el cepillado, pero si fuera necesario se hará con un cepillo blando. Una vez que el personal haya terminado de lavarse será examinado por los especialistas NBQ.

La parte específica de la descontaminación química se hará con álcalis para los agresivos neurotóxicos, hipoclorito sódico o cálcico, cloro, compuestos oxidantes y también con agua caliente a presión, vapor de agua (contra la iperita) y jabón que arrastre los productos químicos. La descontaminación biológica se logrará frotando enérgicamente la piel para eliminar de ella los agentes agresivos y enjuagándose con una solución de hipoclorito sódico, aclarando bien con agua y jabón.

En el caso de instalaciones permanentes, vegetación o almacenes al aire libre la descontaminación puede ser impracticable. El vestuario y equipo del personal y del material esencial para cumplir la misión deben descontaminarse «operacionalmente», es decir en la medida necesaria para poder seguir operando.

Conclusión

La llamada amenaza NBQ es más mucho más psicológica que real. La probabilidad de ataques nucleares o químicos masivos en el mundo occidental es casi nula y los biológicos siempre tendrán consecuencias limitadas. Es fundamental informar a la población, deshaciendo miedos infundados y exageraciones, y así instruirla para tomar medidas defensivas que reducen mucho los efectos letales. Esta es una misión de la Protección Civil.

El terrorismo aunque pueda causar grandes daños en algún momento solo puede emplear estas armas en forma puntual e intermitente. Podrá apoderarse de estos agresivos, pero no fabricarlos en grandes cantidades.

El mejor antídoto contra estas amenazas es la solidaridad de la comunidad internacional en la lucha antiterrorista y en la eliminación de los fanatismos religiosos, nacionales o étnicos, al menos en las naciones civilizadas.

Nunca puede decirse que se dispone de los medios suficientes para superar totalmente esta triple amenaza, pero sí es posible defenderse de ella mediante organizaciones responsables. La Protección Civil española está operativa en todo el territorio y puede prepararse para la Defensa NBQ cuando se estime necesario apoyándose en la defensa militar. Nuestro Ejército dispone de una Defensa NBQ modesta pero experimentada, con Unidades especializadas a nivel División y Brigada, que están actualmente operativas. También es importante la labor didáctica y de investigación de la Escuela de Defensa NBQ de las Fuerzas Armadas situada en Hoyo de Manzanares (Madrid) junto a la Academia de Ingenieros del Ejército.

Creo poder afirmar, sin ser inconsciente, que la triple amenaza terrorista nuclear, química o biológica no debe quitar el sueño a ningún español. En cambio, todos los esfuerzos para eliminar el cáncer del terrorismo siempre serán pocos.

Historia de la Guerra Química. Características y mecanismos de aplicación en la guerra y en el terrorismo

LUIS VILLALONGA MARTÍNEZ
General de División Médico. Inspección General de Sanidad de la Defensa

1. INTRODUCCIÓN

Los riesgos de las armas de destrucción masiva, es decir debidos a los agentes NBQ (nucleares, biológicos y químicos) constituyen un grupo de riesgos emergentes, estimándose que su aparición sería más probable en el contexto de accidentes o de ataques criminales o terroristas que por verdaderos ataques reglados en el contexto de una guerra declarada, al estilo de los gases asfixiantes empleados en la Gran Guerra. Algunos autores hablan de riesgos NBQR, es decir añaden la letra «R» a la conocida sigla, porque incluyen en el grupo las denominadas armas radiológicas o armas sucias (dispersión de radionucleidos contaminantes con un explosivo convencional), de las ya se habló en los años sesenta y setenta del pasado siglo, en plena guerra fría.

El presente documento estudia determinados aspectos de los agentes químicos, que incluyen un recuerdo histórico, un análisis general sobre su naturaleza y una prospección sobre las posibilidades de empleo.

Hay razones y hechos que permiten afirmar que determinadas naciones y organizaciones terroristas disponen de armas químicas y podrían emplearlas o proveer de ellas a un tercero. Este tipo de agresiones, aunque afecte a un número limitado de personas, tienen un gran repercusión

social, como en el caso del ataque con agentes químicos neurotóxicos en el metro de Tokio[1]. La disposición de armas químicas por un «estado fallido» (aquél cuyo gobierno no controla el país) o por un «estado gamberro» (nación cuyos gobernantes no respetan las normas del derecho internacional) representan un riesgo importante a valorar.

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En la lucha del hombre contra el hombre y desde la prehistoria se han tratado de utilizar cuantas armas y elementos podían asustar, hacer daño o matar al enemigo, por tanto no sorprende que la historia de los agresivos químicos comience muy atrás en la historia, aunque la que podríamos llamar etapa científica, con el desarrollo en laboratorio de agentes específicos se inicia durante la Gran Guerra europea.

2.1. La «prehistoria química»

Este apartado presenta una serie de hechos históricos en los que se emplearon, de forma más o menos empírica, diversos productos tóxicos. Estos hechos constituyen una muestra, pues hay otras referencias de uso de diversos productos tóxicos en otras épocas y lugares.

Probablemente una de las primeras referencias históricas esté en las crónicas de Alejandro Magno, donde se describe el empleo de cal viva junto con el azufre y las cenizas para producir un polvo tóxico respiratorio e irritante de la piel. Hay constancia del empleo de humos irritantes, azufre y otros productos en la Guerra del Peloponeso, cuando los espartanos trataban de conquistar una fortaleza ateniense en el año 423 a. de C. Hay numerosas referencias de empleo en el siglo VII y siguientes del llamado fuego griego, probablemente una combinación de resina, azufre y petróleo, si bien este producto no es «sensu strictu» un agente

[1] En marzo de 1994, la secta Aum Shinrikyo dispersó gas neurotóxico *sarin* en el metro de Tokio, causando 12 muertos y más de 300 afectados. El año anterior habían intentado atacar a un tribunal de justicia de Matsumoto, para obligarles a modificar un fallo que perjudicaba unas propiedades de la secta, hubo 7 muertos y más de 200 afectados entre la población, ajena al tribunal, pues el viento llevó la nube tóxica en dirección opuesta a la prevista.

químico, sería físico pues su mecanismo de actuación es por el calor. Siglos después, en el XIII, el árabe Hassan Alramnah describe un agresivo químico a base de opiáceos y arsenicales, también se cita empleo de productos cáusticos e irritantes en la batalla naval de Ponza en el año 1435 y en las luchas contra los turcos a final del siglo XV. En los siglos XV y XVI los venecianos —como no podía ser de otro modo dada su afición a los venenos— emplearon venenos introducidos en municiones de morteros.

Los primeros datos sobre el empleo de la artillería química se remontan al siglo XVII, y así, en 1640, Glanber propuso el empleo de granadas fumígenas y proyectiles conteniendo trementina y ácido nítrico, pero parece ser que el primer proyectil de artillería cañón conteniendo agresivos químicos se fabricó en Sévres, en 1830, siendo atribuida la idea al farmacéutico francés Lefortier.

2.2. La Gran Guerra

El primer empleo masivo de agresivos químicos, con graves efectos sobre el adversario, se realiza durante la I Guerra Mundial, el 27 de octubre de 1914, los alemanes lanzan sobre las tropas francesas una mezcla de efectos estornudógenos compuesta por clorhidrato y sulfato de anisidina. Como respuesta, los franceses lanzaron, posteriormente, bombas lacrimógenas, y, en esta escalada, se llega al 15 de abril de 1915, cuando los alemanes generan en Yprés una cortina de gases de cloro a lo largo de 10 km. que causa una verdadera masacre entre los aliados.

Es el inicio de una terrible escalada que aterrorizó al mundo, el 25 de septiembre los ingleses lanzan nubes de humo (cloro, fosgeno y cloropicrina) contra los alemanes. En diciembre de 1915, los alemanes utilizan fosgeno. En 1916 se empleó el difosgeno por primera vez por ser más persistente y de más fácil manejo. En 1916, se emplea por primera vez, por parte de los franceses, la denominada «Vincenitas» que son ingenios dotados de cianuro con tricloruro de arsénico y zinc. El 4 de abril de 1917 los ingleses emplean por primer vez lanzadores de gases.

En junio de 1916 se desarrolla una mezcla que se denominará «rompemáscaras», conteniendo fosgeno, difosgeno y difenilcloroarsina, impi-

diendo esta última el uso de la máscara, por ser estornudógena, de ahí el nombre de «rompemáscaras».

Continuando esta carrera por tener el agresivo más eficaz, se llega a junio de 1917, en que los alemanes lanzan un nuevo agresivo, la iperita o sulfuro de dicloroetilo, denominada por estos como «senfgas» o «lost»; al cual los ingleses le denominan «gas mostaza» por el intenso olor a mostaza que desprendía. El nombre de iperita proviene de haber sido utilizada por primera vez en Yprés (Yper en flamenco). Esta variante, produjo ocho veces más bajas que todos los demás agresivos empleados. El último agresivo en esta contienda fue la lewisita, desarrollado por el capitán de artillería de EEUU, N. Lee Lewis, de ahí su nombre, pero no llegó a emplearse por la firma del Armisticio en el momento en que llegaron los primeros proyectiles al teatro de operaciones.

El horror que ocasionó el empleo de estos gases y el gran número de bajas (más de medio millón, de las que 100.000 murieron), llevó a la firma del Protocolo de Ginebra de 1925 que prohíbe el empleo, pero no la proliferación de estos agresivos. A partir de este momento se oculta el empleo de estos agentes en los diversos conflictos.

2.3. Agresivos químicos en la Guerra del Rif (Marrueros 1921-1927)

Un episodio poco conocido y no reflejado habitualmente en la literatura especializada anglosajona es el uso y fabricación por España de agresivos químicos en la década de los veinte, durante la Guerra del Rif (1921-1927) para sofocar la rebelión rifeña de Abd-el-Krim[2] en Marruecos. España empleó profusamente durante este conflicto la iperita fundamentalmente y también el fosgeno y la cloropicrina. Inicialmente se compraron a Francia, posteriormente se obtuvo en Alemania el oxol o tiodiglicol (precursor de la iperita). En junio de 1921 se había iniciado en Melilla la carga de proyectiles con gases, pero había muchas dificultades de manejo del producto, de la carga de proyectiles, de su dispersión directa desde aviones —primer empleo de agresivos químicos desde el aire—, de su empleo en disparos de artillería, de condiciones meteorológicas adversas, para la dispersión y para el vuelo de aviones.

[2] Ramón J. Sender en su novela «Imán» narra los efectos de los gases tóxicos en las tropas españolas destacadas en esta guerra.

La decisión de usar gases —nombre coloquial de la época para los agentes químicos— parece basada en los desastres que sufrieron las tropas españolas en los años anteriores, en particular la masacre de Monte Arruit, en 1921. Se inició la construcción de la Fábrica Nacional de La Marañosa (localidad a 20 km al sur de Madrid) que a mediados de la década producía iperita, fosgeno y otros agentes que se enviaban a Melilla.

No obstante lo anterior ni la artillería ni la aviación llegaron a emplear masivamente, sino de forma limitada, sobre objetivos seleccionados, a veces sobre las fuerzas o bien sobre las cábilas que ofrecían mayor resistencia, para quebrar la voluntad de resistencia de Abd-el-Krim(*), que denunció ante la comunidad internacional estas agresiones, ya prohibidas. De un lado parece que el propio cabecilla rifeño ocultó los verdaderos efectos de estas agresiones químicas para mantener la moral de los combatientes y la población y, de otro lado, hay muchos datos que permiten afirmar que la eficacia de los agentes fue muy limitada, por las condiciones meteorológicas y por los primitivos sistemas aéreos y artilleros de dispersión. Hubo muchos afectados entre los manipuladores españoles, porque a lo anterior se sumaba la escasa preparación técnica del personal. La efectividad de la dispersión aérea era limitada además porque los aviones sólo podían volar a determinadas horas, por el calor y la visibilidad (amanecer y atardecer), no había sorpresa y podían protegerse.

Durante el desembarco en Alhucemas se bombardearon con iperita diversos objetivos del interior, para facilitar el desembarco, pero al cambiar la dirección del viento se volvió la nube contra los españoles, que sufrieron los efectos del gas. Hay que constatar que los rifeños intentaron con empeño utilizar agentes químicos pero no consiguieron los agentes químicos pues fueron engañados por los vendedores.

2.4. Segunda Guerra Mundial y la guerra fría

Los agentes químicos no se emplean prácticamente en lo combates de la II Guerra Mundial, no así en las cámaras de gas de los campos de prisioneros del régimen nazi, en las que se utilizó profusamente el cian-

(*) Abd-el-Krim intentó obtener agresivos químicos, pero fue engañado por los traficantes de armas.

hídrico. Japón[3] utilizó en China iperita, lewisita y fosgeno. Parece que los alemanes utilizaron gases en Varsovia y los polacos en Jalso. Hitler no autorizó el empleo de sus importantes arsenales de armas químicas (principalmente los recién fabricados neurotóxicos), se dice que por sus recuerdos dramáticos de la I Guerra Mundial, aunque es posible que lo que se diera fuera un equilibrio de terror, ante las posibles represalias.

En los conflictos armados ocurridos a partir de la Segunda Guerra Mundial se ha denunciado la utilización de agresivos químicos en numerosas ocasiones, verificándose en algunos casos su uso, pero en la mayoría no existen pruebas fehacientes de su empleo:

— Mayo de 1957: Cuba denuncia el empleo de agresivos químicos por las tropas gubernamentales contra los guerrilleros.

— Noviembre de 1958: Radio Pekín acusa a los nacionalistas chinos de bombardear con agentes químicos a tropas de China Popular.

— El gobierno saudita acusa a Egipto de emplear, iperita en 1967, fosgeno en 1965 y neurotóxicos en 1968.No pudiéndose verificar la acusación.

— En 1965, en Vietnam, USA. empleó contra el Vietcong, lacrimógenos, estornudógenos, herbicidas y defoliantes en grandes cantidades.

2.5. Final del siglo XX y siglo XXI

En el campo de las armas químicas es donde el control de armamentos ha realizado verdaderos progresos. El proyecto de convención sobre armas químicas (CWC), quedó abierto a la firma el 13 de enero 1.993, en París. La CWC tiene por fin, destruir todas las existencias de agresivos químicos e implantar un riguroso régimen de verificación.

Pero mientras la amenaza se extiende, los EE.UU. —junto con otros aliados occidentales, tales como Reino Unido y Alemania— han re-

[3] Los japoneses en China, incumpliendo los acuerdo de Ginebra, además de los agresivos químicos llevaron a cabo con prisioneros unas dramáticas experiencias de guerra biológica, para lo que constituyeron la «Unidad 731». hicieron.

nunciado a su propia capacidad ofensiva de guerra química. Así, EE UU inició en 1996 la destrucción de treinta misiles con carga de gas nervioso y prevé finalizar la eliminación de estas armas en el 2.004. Argelia, parece disponer de medios para la obtención de agentes químicos; pero no existe ninguna prueba de que su capacidad operacional sea efectiva, y nada indica que persiga alcanzarla. Libia, está invirtiendo cada vez más en armas químicas. En 1985, construyó en Rabta un enorme complejo químico de doble uso que fue inaugurado en 1.988. Además de este complejo, parece que está en construcción una segunda fábrica cerca de Wafa, a 80 km al SE de Trípoli, tras la reciente distensión de Libia con occidente (septiembre de 2003) sería interesante conocer la situación de estos programas [*]. En febrero de 1.995, fue sospechosa de tratar de obtener de África del Sur, información sobre armas químicas.

Siria y Corea del Norte, consideran la posibilidad de guerra química, como una disuasión estratégica contra rivales provistos de armas nucleares. Myanmar (Birmania), se cree que posee capacidad de guerra química. Rusia aún constituye una fuente de pericia y capacidad en guerra química.

Dada la actualidad del conflicto en Irak y que en el 2003 sigue sin estar clara la solución, se considera de interés hacer un resumen de los desarrollo armamentístico químico en el Irak de Saddam Hussein, desde los años setenta hasta el año 2003. El régimen de Saddam planificó cuidadosamente la adquisición de capacidad química, dentro de un extenso programa de armamento, que incluía armas biológicas y nucleares. En cuanto a las químicas se inició su adquisición a principios de los setenta, y aunque vieron que el arma biológica era mucho más barata, consideraron necesario tener armas químicas, probablemente porque el manejo del arma biológica es mucho más complicado y es más difícil el control de sus efectos. En el ámbito del Ministerio de Agricultura y camufladas como empresas supuestamente para producción de abonos y pesticidas organofosforados aparecieron las denominadas «Industrias Químicas», la «Agencia para la Producción de Pesticidas» y otras. Así, con la ayuda de

[*] Recientemente, inicios de 2005, parece que ha renunciado a estos programas de armamento.

Alemania Oriental, se construyeron hasta seis plantas para la producción de «pesticidas».

Durante la guerra Irán Irak, en el año 1983 los iraquíes primero amenazaron y después emplearon armas químicas contra las fuerzas iraníes y contra la población civil; así lo comprobó in situ un equipo de expertos enviados por la ONU[4], que confirmaron el empleo de iperita y un neurotóxico, el tabún. La rentabilidad táctica —bajas y daños en el campo de batalla— fue muy limitada y estratégicamente el efecto fue negativo pues la opinión pública internacional se puso en contra de Saddam[5]. Parece comprobado que también empleó armas químicas contra los kuwaitíes en conflictos durante los años 80. Es importante resaltar, en el marco de la polémica internacional surgida por no haber encontrado EEUU y Gran Bretaña —hasta noviembre de 2003— almacenes de armas químicas, que Saddam ha sido el único personaje en la historia universal que ha empleado profusamente armas químicas contra su propio pueblo (kurdos y otros), en el norte del pais en 1988. Durante la Guerra del Golfo, la liberación de Kuwait por los aliados en 1991, Saddam no usó armas químicas, probablemente por dos razones: el escaso rendimiento táctico y el desgaste estratégico ante la opinión pública, fundamentalmente la árabe, aunque seguramente la razón principal fue la amenaza de los aliados de responder con armas nucleares. Algo parecido puede aplicarse a la operación de derrocamiento de Saddam, de marzo de 2003.

3. LOS RIESGOS QUÍMICOS

Las armas químicas son, tecnológicamente fáciles de producir, de bajo precio, eficaces en muchos escenarios y difíciles de detectar. Por tanto es previsible que continúe, de forma más o menos encubierta, la proliferación de armas químicas. Los incidentes NBQ han tenido un incremento

[4] Uno de los expertos era el Prof. Dr. Domínguez Carmona, Catedrático de Medicina Preventiva y Coronel Médico, coordinador del presente curso en la RAEF.

[5] Irán trató de movilizar la opinión pública internacional enviando afectados químicos civiles a diversas naciones de Europa, entre ellas España, que recibió a nueve afectados por iperita. Sanidad Militar (Hospital Militar «Gómez Ulla») atendió a estas bajas, desde su dramática llegada, hasta la recuperación de todos menos de un paciente que falleció por la importante afectación pulmonar.

notable a lo largo de la pasada década, si bien no es fácil cuantificarlos dado que la mayor parte de las referencias de empleo proceden de la prensa y hay poca información rigurosa no clasificada. Entre los años 1960 y 1999, en Estados Unidos, se registraron 415 incidentes relacionados con agentes químicos, biológicos y radiactivos. De ellos 151 se consideraron terroristas, 160 criminales, 38 asesinatos «oficiales» (promovidos por una nación) y el resto accidentales o motivados por otras causas. La proporción de ataques terroristas se incrementó desde 1985. Si se añadieran los hechos recientes de los últimos tres años el número y repercusión social se verían aumentados. El Cuadro 1 es un esquema que ayuda a analizar la naturaleza de los ataques terroristas, en los que se observa que los químicos son los agentes más empleados.

CUADRO 1

Naturaleza de los incidentes terroristas (*). (Basado en datos de EE.UU. sobre 151 casos químicos, biológicos y radiactivos. 160-1999)

1. AGENTE	*2. SUCESO*	*3. OBJETIVO*	*4. MOTIVO*	*5. AUTOR*
— Químico	— Sólo conspiración.	— Indiscriminado	— Ultranacionalismo	— Individual
— Biológico	— Adquisición	— Gubernamental	— Separatismo	— Nacionalista
— Radiactivo	— Posesión	— Grupo determinado	— Protesta contra gobierno	— Separatista
— Mixto	— Amenaza	— Símbolo (edificio,	— Por el maltrato a animales	— Fanático relg.
	— Ataque	organización,	— Contra el aborto	— Ultraizquierda
	— Broma/ Falso	individuo)	— Profecía apocalíptica.	— Ultraderecha
			— Contra institución	— Psicópata
			o empresa.	
			— Venganza	
			— Razones políticas	
			— Asesinato	
			— Ecoterrorismo	

(*) Tomado de «EMERGING INFECTIOUS DISEASES», National Center for Infectious Diseases. EEUU, vol 5, num 4, july-august 1999.

La columna 1 recoge los diversos tipos de agentes implicados. La columna 2 indica el tipo de suceso, si se trataba simplemente de los planes de una conspiración, o bien disponían ya de los agentes, si habían amenazado o se trataba de una ataque real. La columna 3 indica el objetivo del ataque, frecuentemente indiscriminado, otras veces contra una insta-

lación del Gobierno, un grupo o empresa determinados o contra un elemento simbólico. La columna 4 expone las causas observadas de los sucesos, frecuentemente por razones pseudopolíticas, protestas contra el Gobierno, contra la permisividad del aborto o contra el maltrato a los animales u otras causas. La columna 5 indica el tipo de autor.

4. LOS AGENTES QUÍMICOS

De las varias decenas de miles de productos químicos que se utilizan con fines industriales un porcentaje elevado es tóxico para el hombre y por lo tanto podrían ser empleados como agresivos químicos, si bien cabe entender, en el contexto del presente ejercicio, que los de mayor interés son los denominados agentes químicos, es decir los productos químicos especialmente desarrollados para causar daño al hombre, como el cloro, el fosgeno, los neurotóxicos, así como los incapacitantes y los modificadores de la fisiología normal del organismo, denominados biorreguladores.

Conviene hacer una breve referencia a los productos químicos que maneja la industria y que son nocivos para el hombre, los animales y el medio ambiente. Se considera que los productos químicos industriales representan un riesgo mayor para la sociedad en aquellos países donde la normas medio ambientales y los sistemas de vigilancia están poco desarrollados. Como ejemplo baste citar el escape químico en Bhopal (India) en 1984, que causó miles de víctimas. Cada industria debe tener sus planes de emergencia, en los que se contemplen los productos que utilizan y sus riesgos, así como los planes de actuación, junto con los medios para su ejecución, así está contemplado en la normativa tanto española como de la UE. No obstante como cada año aparecen miles de productos y desaparecen otros, lo más práctico para los servicios públicos de salud y en general los servicios sanitarios es preparar los protocolos de actuación en base a los posibles cuadros genéricos o sindrómicos tales como quemaduras y traumatismos, fallo cardiorespiratorio, cuadros neurológicos, etc, manteniendo un estrecho contacto con los responsables de las tomas de muestras, identificación y descontaminación. Todo esto complementariamente a los planes particulares que deba tener cada industria química.

La utilización terrorista de agresivos químicos bélicos, así como de otros productos tóxicos utilizados habitualmente por la industria, constituye una amenaza importante para la sociedad, una sociedad, la occidental especialmente sensibilizada tras los ataques terroristas a Estados Unidos el 11 de septiembre de 2001 y las amenazas de determinados grupos terroristas del islamismo fanático a occidente, tras las actuaciones militares de las coaliciones internacionales lideradas por EEUU en Afganistán (2002) e Irak (2003).

Para identificar los agentes de mayor riesgo cabe considerar que serían aquellos que reunieran las siguientes condiciones:

— Agresivos químicos bélicos conocidos
— Más fácilmente disponibles
— Más tóxicos para el hombre
— Efectos dramáticos, para causar mayor pánico
— Que requieran asistencia compleja, sanitarias y social

Sobre la base de estos criterios el Cuadro 2 presenta una relación de agentes químicos de posible uso terrorista:

CUADRO 2

Relación de agentes químicos de mayor posibilidad de utilización con fines terroristas

NEUROTÓXICOS	Tabun, sarín, somán, GF, VX
HEMOTÓXICOS	Ácido cianhídrico, cloruro de cianógeno
VESICANTES	Lewisita, mostazas
METALES PESADOS	Arsénico, plomo, mercurio
TÓXICOS VOLÁTILES	Benceno, cloroformo, trihalometano
TÓXICOS PULMONARES	Fosgeno, cloro
INCAPACITANTES	BZ
PESTICIDAS	Fosforados, clorados
INCENDIARIOS	Gasolina, propano
TÓXICOS INDUSTRIALES	Cianidas, nitrilos, ácidos nítrico y sulfúrico
OTROS	Dioxinas, furanos, explosivos nítricos

Otro grupo de agentes químicos que podrían representar un riesgo sanitario especial serían los denominados biorreguladores, es decir sustancias que modifiquen el funcionamiento normal de determinadas funciones fisiológicas como el sueño, el nivel de glucemia, la visión, las funciones psíquicas y otras. La posible utilización de biorreguladores con carácter masivo tiene la gran dificultad de que hay que hacer llegar a cada persona la dosis adecuada para que surta el efecto deseado, por ello cabe pensar que su utilización sería más probable frente a colectivos menores, entre los que sería más fácil su distribución[6].

No se hace un mayor desarrollo de los citados agentes, por estar incluidos en otras lecciones del presente curso.

5. LAS ARMAS QUÍMICAS

Se definen como aquéllas que recurren a las propiedades tóxicas de determinados productos químicos que producen alteraciones en la fisiología de los seres vivos. El producto químico tóxico es el denominado agente químico que, junto con el sistema de lanzamiento y dispersión, constituyen el arma química. Los medios de dispersión pueden ser muy variados y podría diferenciarse entre los de uso posible terrorista, que podrían utilizar cualquier medio de dispersión y los de uso militar, dentro de estos se han empleado bombonas a presión, dispersión desde depósitos de aeronaves, bombas de aviación, munición de artillería y munición de mortero.

6. EL EMPLEO TERRORISTA DE LOS AGRESIVOS QUÍMICOS

El terrorismo del siglo XXI se desenvuelve en un nuevo entorno que se caracteriza por los siguientes aspectos:

a) La tecnología está al alcance de todos: en Internet se puede encontrar toda clase de información, las empresas multinacionales se cuentan por millares y en ellas trabajan hombres y mujeres de todas las

[6] Probablemente un empleo, fallido en gran medida, de empleo de biorreguladores tuvo lugar antes del asalto ruso y liberación de los rehenes que los terroristas chechenos habían hecho en un teatro de Moscú (octubre de 2002).

culturas e ideologías. Además, los países más avanzados en el desarrollo de las tecnologías de utilización militar, capaces de producir armas de destrucción masiva, han caído en el error de facilitar parte de sus conocimientos a otros y, tras la caída de la URSS, este antiguo imperio vivió una situación de caos que ha podido dejar desprotegidos importantes secretos y sofisticado material militar.

b) Existen países que han alimentado el odio hacia occidente y que han permitido o fomentado que determinados grupos se adoctrinen en visiones fanáticas del mundo y se adiestren en el empleo de armamento y de las más variadas técnicas terroristas.

c) Se ha acentuado el carácter transnacional del terrorismo, al ser más fácil viajar y comunicarse y al aumentar el número de «santuarios» en donde los terroristas pueden esconderse y preparar sus atentados, al tiempo que surgen nuevas redes de implantación multinacional y se estrechan los vínculos entre los diferentes grupos que existen.

d) Algunas visiones fundamentalistas de la religión, la cultura, la política, una determinada ideología o incluso la raza —ciegas de fanatismo— han aceptado éticamente lo que nunca será aceptable para el resto de la humanidad: el empleo indiscriminado de la violencia y el terror, sin excluir el asesinato, para conseguir determinados fines. Además, el grado de fanatismo se está incrementando y se está produciendo una proliferación de la figura del terrorista suicida, de consecuencias altamente preocupantes.

e) El terrorista puede escoger su presa entre una ingente variedad de blancos potenciales, así como el momento de su agresión. Piénsese en la cantidad de instalaciones o personas vulnerables que existen en un país y en la dificultad de controlar el tráfico aéreo, los envíos postales o un coche-bomba que no se sabe dónde ni cuándo podría estallar.

f) En la nueva gama de riesgos que nos acechan, se está difuminando la frontera entre la seguridad frente a una agresión militar externa (ámbito tradicional de prevención y actuación de las Fuerzas Armadas) y la Seguridad frente a la delincuencia o el terrorismo en el interior de un país, que normalmente se ha situado bajo la responsabilidad de las Fuerzas de Seguridad de los Estados.

En resumen, aunque el fenómeno terrorista es antiguo, su evolución es hoy en día motivo de gran preocupación debido a su proliferación, radicalización e internacionalización y a la existencia de una mayor facilidad de movimientos y de acceso a las armas de destrucción masiva, de ellas la química es la más fácil de conseguir y emplear, en un mundo cada vez más global e interdependiente.

Este fenómeno ha tenido su máximo exponente en el grupo AL QAEDA de Bin Laden, el que está marcando la nueva estrategia militar de EE.UU. en el mundo y la nueva situación estratégica mundial.

Las características más destacadas de este nuevo tipo de terrorismo son las siguientes:

— Está asociado a grupos fundamentalistas islámicos.
— Sus miembros se alimentan de interpretaciones religiosas fundamentalistas y de un fanatismo que les lleva a odiar a occidente.
— Goza de tolerancia y apoyo por parte de algunos países, lo que ha permitido su crecimiento y su fuerza en los últimos años.
— Se aprovecha de los actuales avances en las comunicaciones y en la informática para organizarse, producir sus armas y viajar a cualquier parte.
— Muestra especial interés por las armas de destrucción masiva.
— Muchos de estos terroristas han vivido en países occidentales, hablan correctamente su lengua o incluso tienen formación universitaria.

En este marco internacional, se considera que la mayor amenaza química viene dada por el posible empleo de este tipo de agentes en acciones terroristas, aunque pudiera parecer que cualquier grupo terrorista que empleara agentes químicos despertaría una reacción de rechazo en la opinión pública. Expertos en terrorismo sostienen que, probablemente, los grupos terroristas que constituyen un mayor riesgo desde este punto de vista son los grupos religiosos fundamentalistas y los fanáticos ultraderechistas, como grupos paramilitares, racistas, etc. Las sectas religiosas, a diferencia del terrorista «convencional», no perciben ninguna necesidad de que la opinión pública les sea favorable; dicho de una forma muy gráfica «el público de un terrorista religioso es solamente Dios». De hecho, si se examinan los grupos involucrados en acciones terroristas podemos

tener una idea de otro grupo de posibles agresores futuros; grupos como Aum Shinrikyo, y los ultraderechistas norteamericanos «Nación Aria», «Consejo de Patriotas de Minnesota», etc, encajan perfectamente en el perfil de posibles terroristas químicos. Para analizar las posibilidades es necesario conocer la ideología del grupo para determinar si se proponen destruir un régimen; se debe estudiar la personalidad del líder, sus motivaciones, la tipología de sus miembros, la sofisticación de sus métodos, sus recursos económicos, etc. Aum Shinrikyo, por ejemplo, estaba dirigida por un líder autoritario y paranoico, que reclutaba a personas con conocimientos de medicina, ordenadores y con relaciones en las fuerzas de seguridad.

7. LOS EFECTOS GENERALES DE LOS AGRESIVOS QUÍMICOS

Los efectos de cada grupo de agresivos, incluso de determinados agresivos particulares, serán expuestos más adelante en otras lecciones, no obstante se considera conveniente presentar una panorámica general de los efectos de las distintas familias de agentes, con un enfoque especial, orientado al diagnóstico clínico diferencial sindrómico, es decir por grupos de efectos afines. Esto puede tener un gran interés en un mundo en el que pueden aparecer intoxicaciones, accidentales o no, causadas por productos nuevos, derivados de los conocidos en los que la identificación puede tardar más de lo que podría soportar un paciente afectado, que exige una descontaminación y un tratamiento inmediato.

8. LA RESPUESTA

Se van a presentar los diversos campos de actuación en los que la sociedad puede dar respuesta a la acción terrorista química, dichas actuaciones son en gran medida compartidas por la protección química en su empleo bélico, sobre el campo de batalla. Todo lo anterior sin entrar en aspectos técnicos que se desarrollan en otras conferencias del presente ciclo. Por tanto en este apartado no se estudian procedimientos de detec-

ción, identificación, descontaminación, pretratamiento, tratamiento, etc sino que se presenta una panorámica general de la respuesta de la sociedad ante estas acciones.

En primer lugar se cita la cooperación internacional, que es imprescindible para la prevención de estas acciones químicas, estrechamente relacionado con esto está la inteligencia, es decir la búsqueda y elaboración de la información de interés, que incluye tanto aspectos técnicos de obtención de agentes químicos y sus posibles precursores como los medios de dispersión o lanzamiento y, lo que es más importante y difícil de conocer, la voluntad de un estado, un grupo terrorista o un individuo de emplear estos agentes. Esto se completaría con el mantenimiento de sistemas de vigilancia en distintas áreas (alimentarias, agua, sistemas de aire...) que permitan detectar la aparición de sustancias no deseadas.

AGRESIVOS QUÍMICOS: DIAGNOSTICO DIFERENCIAL CLINICO INICIAL

(En ausencia de equipos de detección o antes de disponer de ellos)

	OJOS-ORL	*PIEL*	*SNC*	*AP. RESPIRAT.*	*P. LATENCIA*	*OLOR*	*AGENTE*
	Congestión y dolor ocular. Rinorrea. Salivación.	Sudoración excesiva. Fasciculaciones.	Fasciculaciones. Incontinencia doble. Convulsiones.	Opresión precordial. Broncoconstricción e hipersecreción.	Minutos.	«Afrutado» (Somán y Tabún)	NEUROTOXICO (Vapor, o líquido «masivo»)
MIOSIS	Conjuntivitis con edema y espasmo palp. Disfonía. Tos.	Eritema-erupción Ampollas (Ver cuello-axilas)		Disfonía. Tos. Opresión torácica. Disnea.	Lewisita y oxima, inmediatas. Mostazas, tardías.	Mostazas: ajo. Lew: afrutado. Oxima: irritante y desagrad.	VESICANTE (Vapor)
	Ninguno previo.	Ninguno previo.	Ninguno previo.	Ninguno previo.		Ninguno.	DESCONOCIDO
	Congestión ORL y ocular. Salivación			Tos violenta y dolor torác. Dificultad resp. progresiva.	Fosgenos, 2-4 h.	Fosgenos: hierba recién cortada.	NEUMOTOXICO
	Conjuntivitis con edema y espasmo palp. Disfonía. Tos.	Eritema-erupción. Ampollas (Ver cuello-axilas)		Disfonía, tos. Opresión torácica. Disnea.	Lewisita y oxima, inmediatas. Mostazas tardías.	Mostazas: ajo. Lew: afrutado. Oxima: irritante y desagrad.	VESICANTE (Vapor)
TOS	No aumento secreciones.	«Color cereza»	Cefalea, vértigos. Convulsiones.	Disnea. Taquipnea.	Minutos.	Aspero y picante.	HEMOTOXICO (Haluros de cianóg.)
NO MIOSIS	Dolor y quemazón ORL y ocular Rinorrea. Salivación	Eritema. Prurito Quemazón. Vesículas	Ataxia. Parestesias (Alta concentración)	Edema pulmonar. (Alta concentración)	Inmediato.		LACRIMOGENO
	Ninguno previo	Ninguno previo	Ninguno previo	Ninguno previo.		Ninguno	DESCONOCIDO
	No aumento secreciones.	«Color cereza»	Cefalea, vértigos. Convulsiones.	Disnea. Taquipnea.	Minutos.	Almendras amargas.	HEMOTOXICO (Ac. cianhídrico)
NO TOS	Conjuntivitis con edema y espasmo palp. Fotofobia.	Eritema-erupción. Ampollas.			Minutos.	Mostazas: ajo. Lew: afrutado. Oxima: irritante y desagrad.	VESICANTE (líquido, local)
		Sudoración. Fasciculaciones localizadas			30 min.-18 h.	«Afrutado» (Somán y Tabún)	NEUROTOXICO (Líquido; local inicial)
	Ninguno previo.	Ninguno previo.	Ninguno previo.	Ninguno previo.		Ninguno.	DESCONOCIDO

Las sociedades avanzadas, como la española, disponen de una serie de normas, organizaciones e infraestructuras que suponen un importante factor de protección ante una hipotética agresión química.

— Ley 2/1985, de Protección Civil
— Sistemas de salud pública (Servicio Nacional de Salud)
— Planes de actuación
— Planes de catástrofes de los hospitales
— Apoyos de las Fuerzas Armadas

Dentro de ellos se pueden distinguir:

Apoyos militares generales:

- Conocimiento experto
- Reconocimiento, detección y señalización
- Descontaminación
- Logística, seguridad

Apoyos de la Sanidad Militar:

- Conocimiento experto
- Detección, identificación
- Protocolos de actuación
- Antídotos y medicamentos huérfanos
- Asistencia in situ y especializada

9. CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto, cabe deducir las siguientes conclusiones:

— Los riesgos por las armas de destrucción masiva, es decir debidas a los agentes NBQ (nucleares, biológicos y químicos) constituyen un grupo de riesgos emergentes, estimándose que su aparición sería más probable en el contexto de accidentes o de ataques criminales o terroristas que por verdaderos ataques reglados durante operaciones de guerra.

— Los ataque biológicos que tuvieron lugar tras el 11 de septiembre de 2001, causaron varios muertos, numerosos afectados y una gran alarma social en EEUU, alarma que se reprodujo en otras naciones del mundo. En España generó inquietud y falsas alarmas, que obligaron a establecer precozmente un plan de protección por parte de las autoridades sanitarias nacionales con la colaboración estrecha de la sanidad militar. Este hecho ha supuesto un verdadero revulsivo en el concepto de defensa-protección civil de nuestra sociedad, cuyas consecuencias se están viviendo intensamente en la actualidad.

— Los productos químicos son una fuente próxima e importante de riesgo sanitario, tanto los que maneja la industria, de los que un porcentaje elevado es tóxico, como los desarrollados específicamente para causar daño al hombre, animales y plantas, los denominados agentes químicos de guerra.

— Dentro de los agentes químicos, los de mayor riesgo tanto de uso terrorista como bélico serían los neurotóxicos, por ser los más dañinos para el hombre, porque sus efectos tienen un carácter dramático lo que potencia su acción psicológica y porque no es difícil disponer de ellos.

— Los riesgos alimentarios se consideran como emergentes, en particular la afectación del alimento, en su origen, favorecida por la «globalización» en la obtención de alimentos primarios, pero también las contingencias que puedan surgir durante los procesos de transformación de los alimentos.

— La contaminación intencionada del agua y demás alimentos, es una modalidad más de posible empleo criminal o terrorista de los agentes químicos, biológicos o radiactivos.

— Excluyendo los riesgos sanitarios naturales o no utilizados intencionadamente para hacer daño, cabe presentar como riesgos posibles en el próximo futuro los ataques terroristas o criminales con carbunco, toxinas tipo perfrigens o botulínica, neurotóxicos, virosis hemorrágicas, el accidente con un arma nuclear o en una central nuclear. Podría considerarse también un escenario más peligroso, como la aparición de uno o más de las siguientes cir-

cunstancias: explosión de un arma nuclear, accidente grave en una central nuclear, diseminación amplia del carbunco o de la viruela, o de un neurotóxico de nueva generación.

— No es objeto del presente estudio analizar los sistemas de protección frente a cada uno de los riesgos químicos citados anteriormente, pero se considera oportuno comentar con carácter general los sistemas de que dispone o puede disponer la sociedad para hacer frente a este tipo de situaciones. En primer lugar la inteligencia, es decir la obtención de información suficiente, su elaboración y difusión; los sistemas de vigilancia, de amplia implantación actual en el campo de la salud, pero que posiblemente requieren ser potenciados. Igualmente los planes de actuación para los distintos niveles y amenazas, con el alcance y dotación que corresponda en cada situación y sometidos a un proceso de continua revisión y adaptación. Todas estas acciones de protección, como es natural después de los hechos vividos recientemente, están en proceso de revisión y potenciación, tanto en el entorno de cooperación internacional como en el nivel nacional de España.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ALSINA, A. JAVIER.; VILLALONGA, M.; LUIS, M., (1998) *La amenaza iraquí (química y biológica).* Revista Española de Defensa, marzo.

(2) BARDAJI, RAFAEL L., (2003) *Irak reflexiones sobre una guerra*. Real Instituto Elcano, febrero.

(3) CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, (2000) *Biological and Chemical terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response*. Atlanta, USA, april.

(4) CON COUGHLIN, (2003) La vida secreta de Saddam Hussein. Planeta, Barcelona.

(5) EJÉRCITO DE TIERRA., (2002) *Protección NBQ de las Pequeñas Unidades*. OR7-019. Granada.

(6) GUERRERO, F. Y GUERRERO, F. A., (2002) «Defensa química», Ministerio de Defensa, Madrid.

(7) MANRIQUE, G. J. M. Y MOLINA F. L., (2003) *Antes que Sadam... las armas de destrucción masiva y la protección civil en España 1924-2000*. Quirón, Valladolid, abril.

(8) MINISTERIO DE DEFENSA. (2003) Cuadernos de Estrategia. «Nuevos riesgos para la sociedad del futuro». Madrid, enero.

(9) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, (1998) *Accidentes químicos: aspectos relativos a la salud*, Washington DC.

(10) VILLALONGA, M. L. M.(1989) *Arma Química y Sanidad Militar*, Revista Ejército, enero.

(11) ZAJTCHUK, R. (1997) *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*, Office of the Surgeon General (DOA), Washington.

Agresivos químicos: fumigenos, incapacitantes, vesicantes, lacrimógenos, estornudógenos y eméticos. gases asfixiantes

SEGUNDO JIMÉNEZ GÓMEZ
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los agresivos químicos usados con fines bélicos, no sólo tiene interés desde el punto de vista de evitarlos o de protegerse contra los mismos, sino que desde una perspectiva mucho más amplia, viene a converger con el hecho de la dispersión ambiental descontrolada de muchos productos químicos, y del impacto que a medio y largo plazo pueda tener sobre la salud.

Organismos Internacionales cualificados estiman que, en la actualidad, se comercializan más de 100.000 especies químicas distintas, de las cuales unas 30.000 se producen en cantidades superiores a una tonelada. Se trata de un problema preocupante porque transmite una imagen negativa de la Química, y crea una conciencia ciudadana de rechazo, sin caer en la cuenta de que, a lo largo de los tiempos, la Química ha dado más motivos de servicio a la humanidad que de lo contrario. Las pruebas que, están tan a la vista, que no requieren explicitarse.

Con esto no se pretende poner paliativos al tema de los agresivos químicos, sino más bien al contrario justificar la preocupación por cuántas situaciones, a corto o largo plazo, pueden deteriorar el estado sanitario de la población mundial, con independencia de que pueda estar o no inmersa en un conflicto bélico.

El uso incorrecto, e incluso bélico, de algunas sustancias químicas, no puede aparejar el anatema indiscriminado de la producción química. Es más, y como en algún momento de la exposición habrá oportunidad de comentar, más de un descubrimiento realizado al amparo de objetivos bélicos, puede constituir una aportación a la mejora de la salud pública, no sólo en el campo de la defensa sino en la terapéutica.

Pero no es menos cierto que el uso de agresivos químicos como instrumento bélico, no ha sido objeto de demasiadas medidas restrictivas, pese a lo mucho que se ha hablado de ellos.

En la **Declaración de La Haya de 1899, concerniente a Gases Asfixiantes**, los países que unos años después participaron en la Primera Guerra Mundial, habían acordado «abstenerse en el uso de proyectiles cuyo único propósito fuera —sea— la difusión de gases asfixiantes o nocivos».

En 1907 se celebra el **Primer Congreso sobre armas Químicas** en el que se reglamentó su uso, pero hay países como USA que no participaron. A pesar de ello se usaron, como es sabido en la Primera Guerra Mundial.

En **1925** se celebra el **Protocolo de Ginebra,** en el que se prohíbe el uso de armas químicas, pero no le firman ni Japón ni USA, aunque este país se unió al mismo en 1947.

Pero la verdad es que se aún tardó casi medio siglo en tomar decisiones algo más positivas, pues hasta **1989** no se celebró en París un **Congreso para el Fomento del Protocolo de Ginebra,** en el que participaron 149 países, que culminó con la **Convención de Armas Químicas (CAQ)** en 1992, en la que se crea **Organización para la Prohibición de Armas Químicas,** de forma que en enero de 1993 se firma un **Convenio** por el que los países formantes, USA entre ellos, se comprometieron a prohibirlas y a destruir las existentes.

Claro está que, simultáneamente, la Convención flexibilizó las prohibiciones al establecer tres listas de sustancias, de las cuales las actividades en que pueden involucrarse las incluidas en dos de ellas no tienen más restricción que la de no contribuir a la fabricación de armas químicas.

El uso bélico de productos químicos es conocido desde tiempo inmemorial.

Sin pretender ser exhaustivo, citaremos algunos casos:

- Los griegos emplearon humos de azufre 400 años b. C.
- Hay antecedentes de que, bien avanzado el siglo XV, en Alemania, se conoció la primera fórmula de un gas asfixiante.
- En 1914, al principio de la Primera Guerra Mundial, parece ser que ya se emplearon gases tóxicos.
- En 1915, se emplea cloro en Ypres.
- En 1916 aparecen las primeras granadas de gas.
- En 1920 Gran Bretaña usa gases contra los kurdos.
- Entre 1936 y 1938 se descubren varios gases nerviosos.
- En 1945 se usan gases tóxicos en Rusia.
- En 1950 se descubren neurotóxicos.
- En 1970, se descubre el LSD.
- En 1971, USA emplea el Agente Naranja, como desfoliante, en Vietnam.

2. CLASIFICACIÓN E ÍNDICES DE VALORACIÓN DE SU TOXICIDAD

Las sustancias químicas empleadas con fines bélicos pueden clasificarse en incapacitantes o en letales, según la intensidad de su acción tóxica. O bien, atendiendo a las situaciones que originan, pueden ser fumígenos, psicoactivos o incapacitantes, vesicantes, estornutógenos, eméticos, lacrimógenos, hemotóxicos y sofocantes.

Los fumígenos son los generadores de humos, que suelen tener como fin dificultar la visibilidad y no su específica agresividad física que, como es lógico, también ejercen. Los vesicantes actúan través de la piel, a la que irritan y producen ampollas y quemaduras, aunque también pueden ser inhalados, y los urticantes se comportan de forma análoga, pero con menos intensidad. Los lacrimógenos irritan los ojos y dificultan la visión. Los neurotóxicos son muy complejos, y su desarrollo

se debe a sus aplicaciones agroquímicas en la lucha contra plagas e insectos, ya que bloquean la colinesterasa e impiden la metabolización de la acetilcolina. Su toxicidad para los seres vivos se observó con relativa rapidez, habiéndose empleado con diferentes fines, tanto a medio como a largo plazo.

Los sofocantes son sustancias que afectan a las vías respiratorias impidiendo la reoxigenación de la sangre hasta producir la muerte por asfixia. Algo parecido le sucede a los hemotóxicos, que bloquean de manera directa la formación de la oxihemoglobina, llegando a ser letales.

Se me ha hecho el encargo de que trate de los incapacitantes y alguno de los letales, como son determinados sofocantes, reservando para otras intervenciones, los neurotóxicos, los desfoliantes, etc. La extensión del encargo me obligará a hacer una exposición somera.

Debo comenzar diciendo que la primera dificultad de esta clasificación está en encontrar los límites entre incapacitantes y letales. Decir que los incapacitantes son los que producen trastornos transitorios, de manera que disminuyen temporalmente las capacidades vitales de los individuos, siendo, sin embargo, susceptibles de recuperación, y que los letales producen la muerte o la incapacidad permanente, no es bastante, pues se comportarán de una u otra forma según la cantidad de sustancia ingerida o inhalada.

Por ello, hay que comenzar definiendo brevemente los índices empleados para cuantificar su toxicidad, pues si bien para los expertos es algo corriente, para los profesionales no dedicados al tema puede no serlo tanto, aun que debieran de serlo si todos los productos químicos de uso doméstico hicieran costar en sus envases alguna indicación en tal sentido, para contribuir a su manipulación cuidadosa.

El más frecuente es la ***dosis letal (DL)***, que es la cantidad de una sustancia que produce la muerte. Pero como cada especie, e incluso cada sujeto, tiene unas características de resistencia distintas, no hay un umbral único siendo obligado tomar como referencia un valor medio, al que se denomina ***DL50,*** que es la dosis que produce la muerte al 50% de los individuos que la ingieren. Pero, naturalmente, entre los factores que pueden modificar la resistencia a un agresivo está el peso del individuo, por lo que para independizar del peso, los valores de la DL 50 se refieren a

la unidad del peso del receptor. De este modo, la DL 50 son ***los mg de una sustancia tóxica por unidad de peso (kg) del receptor que producen la muerte del 50% de los individuos que la reciben.***

De análoga forma se define la ***dosis incapacitante (DI) como la cantidad que, expresada en mg por Kg de peso del receptor, produce la incapacidad de un individuo*** y la DI50, ***la dosis que produce incapacidad en el 50% de los que la reciben.***

Pero en ocasiones tampoco esto es suficiente para valorar el riesgo, pues en el caso de sustancias disueltas o dispersas en el aire, y de forma semejante a la Ley de Boyle de los gases, dónde p.V = Cte. la cantidad de tóxico recibida depende de su concentración. A menor concentración se tardará más tiempo en recibir la DL50, y a mayor concentración se tardará menos. Hay, por tanto, un valor del producto concentración por tiempo (C.t), que es el valor límite permisible, que se **denomina CTL 50**, siempre por kg de peso del receptor, que tiene efectos letales para el 50% de las personas que lo alcanzan, y de forma semejante un índice **denominado CTI 50,** que provoca efectos incapacitantes en el 50% de las personas que le alcanzan.

Como los casos más graves son los de alta concentración y bajo tiempo, éste se refiere a 1 minuto, con lo cual el índice se expresa por una cifra, que se denomina ***índice de Habber,*** e indica la **concentración máxima de un tóxico que es letal para el 50% de las personas expuestas al mismo durante 1 minuto.** Y de forma **análoga forma se define un índice de Habber para la incapacidad CTI 50**.

Por otra parte, como de lo que se trata con cada agresivo es de cuantificar un índice generalizado de toxicidad que permita definir una cierta situación ambiental, se suele tomar una referencia de peso de 70 Kg por individuo, y por tanto los resultados experimentales, normalmente sobre animales de ensayo, se refieren después a los 70 kg. En ocasiones se ha tomado como peso medio 80 kg, pero no es aconsejable porque se elevan los valores de los índices.

Cuanto menores sean los índices más tempranamente se avisa de la situación de riesgo y más prematuramente se puede huir de él. Se define así el índice de ***actividad,*** CTA, que es la concentración de un tóxico que en un minuto da lugar a la aparición de algún tipo de síntoma.

Pero aún hay otra precaución más: el tóxico puede ingerirse por vías respiratorias o por la piel, circunstancias que pueden obligar a cuantificar los valores de los índices para cada caso.

3. SUSTANCIAS FUMÍGENAS

Las nieblas y los humos, naturales o provocados, son un valioso instrumento para limitar y ocultar el campo de visión a las fuerzas contrarias facilitando las acciones de sorpresa o los movimientos propios, tanto en tierra como en mar, aunque puedan usarse también con otros fines militares, como son la señalización o seguimiento. En este supuesto no se usan como agresivos químicos, sino como barreras ópticas, aunque esto no quiere decir que no sean también agresivos y que no produzcan lesiones en las vías respiratorias.

Por ello, en el caso de los fumígenos, la identificación de características no se basa en medidas de toxicidad, sino en las de perceptibilidad luminosa. En fotometría se manejan dos conceptos que son la transmitancia y la absorbancia. La primera es la relación entre la radiación emitida y la recibida, mientras que la absorbancia es el logaritmo decimal con signo negativo de la inversa de la transmitancia. Aquí, se sustituyen ambos conceptos por los de opacidad y poder de ocultación total.

Naturalmente, esto exige tomar como referencia la capacidad emisora de una fuente luminosa de características constantes y perfectamente definidas para después relacionarla con las propiedades fumígenas del agente de que se trate.

La **opacidad** es el valor inverso del espesor mínimo, en metros, de una nube que no deja pasar la luz de una lámpara Mazda de 40W. Se comprende que es necesario especificar la lámpara y no sólo su potencia.

El **poder de ocultación total** es el producto de la opacidad por el volumen de humo generado por un kilogramo de agente fumígeno.

El poder de ocultación por **PO= (1/m). (m^3/ Kg.)= m^2/kg;** cuanto mayor sea el número obtenido, mayor será su eficacia.

Como se sabe los humos son suspensiones coloidales de sólidos dispersos en el aire, mientras que las nieblas son suspensiones de líquidos o de aerosoles. El tamaño de partícula de los aerosoles es superior al de

la longitud de onda de las radiaciones IR (800 nm) y el de los humos inferior a los 400 nm del UV cercano. Su comportamiento ante la luz es distinto, pues las primeras la reflejan y las segundan las difractan, aunque en ambos casos se llega al mismo resultado de impedir su captación por los ojos.

La estabilidad de las partículas es fundamental para lograr y conservar la opacidad, por lo que la eficacia de un fumígeno depende del mantenimiento de cuantos factores contribuyan a la permanencia de las partículas en el aire: El primero es su tamaño, no debiendo tener un diámetro superior a 10^{-4} cm. En segundo lugar deben tener una tensión de vapor baja para evitar su evaporación rápida. Y, asimismo, es deseable que los productos formados reaccionen, al menos parcialmente, con el aire y con el vapor de agua contenido en la misma, por ello la estabilidad aumenta en situaciones de humedad relativa alta. Es obvio que, en este sentido, también influyen la velocidad y dirección del aire.

Los fumígenos se dispersan en el aire mediante explosión o descomposición térmica, o bien por evaporación adiabática directa del fumígeno. Una variante de este sistema consiste en comprimir la fase dispersa, en balas o botellas en mezcla con un gas impulsor, de tal forma que al salir se expande, también adiabáticamente, con lo que se enfría y se generan los núcleos de condensación. Incluso se puede hacer por reacción en el aire de dos o más productos que se condensan en el aire sobre las moléculas de vapor de agua, generándose los aerosoles de ocultación.

Los fumígenos cambian la composición del aire y disminuyen la concentración de oxígeno. Cuando éste disminuye por debajo del 18% en volumen hay que utilizar máscara para permanencias superiores a cinco minutos.

Los agentes fumígenos más frecuentes son el fósforo blanco, el SO_3, el ácido clorosulfónico (SO_3HCl), el cloruro de cinc, los tetracloruros de estaño, silicio y titanio, aceites de petróleo, etc, así como mezclas de ellos, que en unas ocasiones son de aporte directo y en otras se generan en el aire por reacción entre otras sustancias.

El **fósforo blanco** fue uno de los primeros fumígenos usados, pero tiene múltiples inconvenientes. Por lo pronto es tóxico, tanto el elemento como sus compuestos, se inflama espontáneamente en el aire y arde con llama

muy brillante lo que permite ser descubierto con facilidad. Además, libera calor que contribuye a que la niebla se destruya con rapidez por originarse corrientes ascendentes de aire. Tiene, sin embargo, la ventaja de su gran poder de ocultación, 942 m^2/kg, y se le da el valor de 100 para tomarle como referencia comparativa con el comportamiento de otros fumígenos

Es bastante agresivo para los seres vivos, pues aunque en la combustión se forma primero P_2O_3, en contacto prologado con el aire se forman nubes de P_2O_5 que, después, con la humedad del aire se forma ácido fosfórico, que es corrosivo, aunque su acción dependa de la concentración y del tiempo de exposición. Normalmente, se producen irritaciones locales en los ojos y en las mucosas.

Se empleó por los aliados en la Primera Guerra Mundial, pero las dificultades que creaba obligaron a su sustitución por óxido de cinc en mezcla con cinc metálico y tetracloruro de carbono ó hexacloroetano. El agente fumígeno es el **cloruro de cinc**, junto con el carbono elemental finamente disperso que se genera. La mezcla **BM** usada por los americanos durante la Primera Guerra Mundial, contenía:

Cinc en polvo	25%
Óxido de cinc	20%
Tetracloruro de carbono	50%
Tierra de kieselgur	5%

Detenernos en explicitar el conjunto de reacciones que se originan nos llevaría a alargar mi intervención. Baste decir que la diferencia de densidad entre el tetracloruro de carbono y el resto de los metales, en especial el cinc, da lugar a una separación de fases, y a la volatilización del tetracloruro. Para evitarlo se sustituyó el tetracloruro de carbono por hexacloroetano, sustancia sólida y, lógicamente, más estable por su menor presión de vapor.

La reacción base es:

$$3\ Zn + C_2Cl_6 \leftrightarrow 3\ Cl_2Zn + 2\ C + 244\ cal$$

La exotermicidad de la reacción puede elevar mucho la temperatura del medio, y el óxido de cinc tiene la misión de disminuirla mediante una reacción endotérmica secundaria:

$$ZnO + C + calor \leftrightarrow CO + Zn$$

Pero, naturalmente, se produce CO que es tóxico.

El producto BM tiene un poder de ocultación de 286, equivalente al 30% del fósforo blanco.

Como agente de cloración se usa también el hexaclorobenceno, sustancia poco volátil, junto con el perclorato potásico como oxidante, denominándose al fumígeno ***declorane***. En este caso las reacciones son:

$$3\ Zn + C_6Cl_6 \leftrightarrow 3\ Cl_2Zn + 6\ C$$

$$4\ C + ClO_4K \leftrightarrow 4CO + ClK$$

Para obtener un humo más blanco con menor volumen de gases se puede sustituir parte del cinc por aluminio en polvo:

$$2\ Al + 3\ ZnO \leftrightarrow Al_2O_3 + Zn$$

El óxido de aluminio queda disperso y el cinc sigue después sus mecanismos de cloruración.

En la Tabla I se da la composición de diferentes fumigenos en los que el agente activo es el cloruro de cinc.

TABLA 1

Fumígenos en los que el agente activo es el Cl_2Zn

Componente	*HC*	*Hexaclorobenceno*	*Declorane*
Hexacloroetano	45,5 %		
Hexaclorobenceno		34,4%	33,9%
Oxido de cinc	47,5 %	27,6 %	37,4%
Cinc en polvo		6,2%	
Aluminio polvo	7 %		
ClO_4K		24,0%	20,5%
CO_3Mg		7,8%	8,2%

La combustión de los productos HC, origina una gran variedad de sustancias, muchas de ellas tóxicas, como fosgeno, cloro, cloruro de hidrógeno, monóxido de carbono, además de las específicas de cloruro de cinc, tetracloruro de carbono, tetracloruro de etilo, hexacloroetano, etc.

Con exposiciones pequeñas y moderadas la afección más frecuente es disnea, que se resuelve espontáneamente en 4 a 6 horas, aunque con riesgo de reproducirse entre 24 y 36 horas. También se pueden originar bronconeumonías y hasta fibrosis intersicial. Con exposiciones largas las consecuencias son más graves: Las disneas agudas se manifiestan rápidamente, aparece una tos espasmódica con esputos sanguíneos, ulceración hemorrágica de vías respiratorias, edemas de laringe y pulmonares, y puede llegar hasta la muerte. No existe ningún informe definitivo sobre el valor clínico de los agentes quelantes, pero dada su eficacia para complejar el cinc se ha sugerido el empleo de la sal cálcica del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)

Resumo, para abreviar, los restantes fumígenos:

El **anhídrido sulfúrico (SO_3)** es un líquido que hierve a 45 ºC, que con el vapor de agua forma ácido sulfúrico que se condensa en gotas blancas y densas. Son bien conocidas las nieblas de SO_3 en las fábricas de ácido sulfúrico, y su acción erosiva sobre las vías digestivas. El proceso de formación de nieblas, como se sabe, es fuertemente exotérmico y para evitar incrementos locales de temperatura que romperían la niebla, conviene generarla desde múltiples focos de emisión.

El **ácido clorosulfónico (SO_3HCl),** es un líquido de bajo punto de ebullición, 15 ºC, que se obtiene por reacción directa del SO_3 con ClH seco, que se condensa en pequeñas gotas formando una niebla muy agresiva, porque se hidroliza y libera los dos ácidos: sulfúrico y clorhídrico. Tiene un poder de ocultación de 286, que equivale al 30 % del fósforo.

La capacidad de ocultación de la niebla puede aumentarse en mezcla con anhídrido sulfúrico, en proporción de 45% de ácido clorosulfónico y 55% de SO_3, formando el denominado agente **FS,** que tiene un poder de ocultación de 552, equivalente a un 50% del fósforo.

El ácido clorosulfónico puede, incluso, mezclarse con amoniaco, formándose sulfato y cloruro amónico, pero su poder de ocultación es inferior (327 m^2/kg).

Hay un grupo de cloruros líquidos formados por los **tetracloruros de titanio, silicio y estaño,** cuya acción fumígena se basa en la hidrólisis progresiva para dar sucesivamente sales básicas del tipo de

$$TiCl_3(OH);\ TiCl_2(OH)_{2;}\ TiCl(OH)_3 \text{ y } Ti(OH)_4$$

En términos militares, el Cl_4Ti, se denomina FM, siguiéndole en actividad el de silicio y el de estaño.

Cuanto más se acerquen al hidróxido titánico más inestables y corrosivas serán las nieblas, pues cada etapa ocurre con la liberación de una molécula de ClH y el aumento del tamaño derivado de la estructura flocular de los hidróxidos.

El poder de ocultación puede aumentarse incorporando amoniaco, que forma cloruro amónico e impide la reversibilidad de la reacción. La mezcla tiene un poder de ocultación muy alto, alcanza el valor de 620, equivalente al 66 % del fósforo blanco.

Sobre el organismo provoca irritación de piel, conjuntivitis y hasta posibles desprendimientos de retina y lesiones en las vías respiratorias.

La dispersión al aire puede hacerse directamente o disueltos en disolventes organoclorados como el di o tricloro etileno. Soslayo todo comentario sobre la que supone para la contaminación del aire la persistencia de estos disolventes, porque ello nos llevaría por otros derroteros.

Por último se tienen los **humos de aceites petrolíferos**, de difícil combustión y escaso poder de ocultación, del orden del 5% del fósforo. Para que arda es necesario aporte de calor para que se alcance el punto de ebullición, por lo que es frecuente emplearles en motores de combustión en defecto de aire para que se formen los humos, y mezclados con carbón y nitrato amónico para que se facilite la combustión.

4. INCAPACITANTES

Aunque con anterioridad se decía, en términos generales, que los incapacitantes eran las sustancias que provocan trastornos transitorios,

se suele reservar esta denominación a las llamadas **psicodrogas,** que alteran el comportamiento del sistema nervioso temporalmente, sin producir daños graves, salvo en los casos de sobredosis o de ingestión prolongada. Algunas de éstas, las llamadas **psicodislepticas**, producen alteraciones mentales con trastornos de la personalidad o alucinaciones que transportan al consumidor a hipotéticos paraísos. Entre ellas están la morfina, la heroína, la cocaina, el LSD (ácido lisérgico) y algunas más.

Todas tienen, desgraciadamente, una nesciente notoriedad, por lo que hay mucha información pública sobre sus efectos. Sólo unos breves comentarios sobre el LSD, cuya dietilamida LSD-25 es un poderoso alucinógeno que provoca esquizofrenia temporal en individuos normales.

El LSD se encuentra en un hongo que crece sobre el centeno y algún otro cereal. A partir del mismo se obtiene una mezcla de alcaloides empleada desde hace tiempo en medicina. Por hidrólisis se obtiene el ácido lisérgico, cuya fórmula es:

Ácido lisérgico

En la actualidad y siguiendo una ruta no demasiado complicada, también se obtiene por síntesis. No tengo datos sobre el uso bélico de estas sustancias, pero figura en los manuales de agresivos químicos. Conozco algunas cifras de miles de kilogramos fabricados por alguna potencia, que soslayo por no tenerlas validadas. Lo que sí se sabe es que el CTI_{50} del LSD-25 es de 2.10^{-3}, por lo que bastarían 100 g disueltos en el agua suministrada a una ciudad para conseguir su incapacitación temporal.

Otro de los grupos de incapacitantes son los llamados **psicoanalépticos**, que son sustancias estimuladoras de la actividad, de las que las más representativas son la xantina (2,4 dioxipurina) y sus derivados de cafeína (1,3,7 trimetil xantina), teofilina (1,3 dimetil xantina) y teobromina (3,7 dimetil xantina). Son mucho menos sensibles que las del grupo de las LSD, pues se necesitan dosis muy altas para superexcitar la actividad hasta el punto de hacer perder el control de los actos personales.

Cafeína, etc

En tercer lugar están los **psicolépticos**, que son depresores de tipo hipnótico, o sedante, que no llegan a adormecer la conciencia, aunque sí provocan un estado de apatía, despreocupación o confusión, sin crear dependencia. Los más representativos de estos son:

$R\text{-}(CH_2)_3\text{-}N{=}(CH_3)_2$ Cloropromacina

$CH_3\text{-}(CH_2)\text{-}CO\text{-}C_6H_5$ Butirofenona

5. SUSTANCIAS VESICANTES

Estas sustancias destruyen los tejidos porque actúan a nivel molecular, hasta el extremo de impedir la duplicación del ADN, por su reactividad con las bases del mismo, sobre todo con la adenina y la guanina, y con sus grupos fosfatos. Es uno de los casos a que antes me refería, pues al actuar sobre el ADN puede buscarse algún camino para no destruir su estructura, sino sólo modificarla. Reaccionan también con los grupos tiol unidos a enzimas, con lo que las destruyen e impiden su acción.

Son agresivos diseñados para que inicien su acción sobre la piel cuándo las vías respiratorias están protegidas con máscaras. Pero es evidente que en su diseño sólo se tuvo en cuenta su acción, y no el cómo, pues la estructura del ADN se estableció en 1953, y la iperita se utilizó por los alemanes en Ypres, durante la guerra del 14-18.

Sobre la piel originan ampollas y quemaduras, con la particularidad de que los primeros síntomas no aparecen hasta después de transcurrido un cierto tiempo de haber entrado en contacto con el agresivo. Se inician por la piel y se continúan por los ojos que son, también, muy sensibles. Primero se producen lágrimas y después los tejidos oculares se erosionan, se afectan por conjuntivitis y hay una pérdida parcial de visión. Por último, las vías respiratorias se ven afectadas por bronconeumonia, ahogos e, incluso, asfixia, originada al obstruirse los bronquios y la traquea por los restos de las células destruidas por los vesicantes.

Entre los vesicantes más conocidos están la iperita, las mostazas nitrogenadas y la lewisita.

La **iperita** se usó por primera vez por los alemanes en la guerra del 1914-18 con bastante éxito. Los ingleses la denominaron gas mostaza en atención a su olor. Es líquida y oleosa. Su formula es

$S(CH_3\text{-}CH_2Cl)_2$ Iperita (sulfuro 2,2, dicloroetilo)

Están muy bien estudiadas las interacciones del azufre de la iperita con los ácidos nucleicos, pero no lo están tanto las que tienen lugar con los fosfolípidos de las membranas celulares. Por RMN se ha comprobado que dispersan los fosfolípidos formando vesículas unilaminares de lecitina.

Hay escasos tratamientos específicos, a excepción de los tópicos como polvos adsorbentes, cremas que alivien los picores y escozores, o que contengan algún anestésico local. Es importante quitarse toda la ropa, que puede haber absorbido el vesicante y proseguir con la acción irritante. Una de las características de su agresividad es su permanencia.

Es de alta persistencia por lo que sus efectos pueden durar varios días. Sus índices de toxicidad varían según se trate de un impacto gaseoso o líquido:

Para el vapor inhalado su CTI_{50} es de 1.500.

Cuando se trata de vapor cutáneo su CTI_{50} es de 10.000

Se ha estudiado la degradación de la iperita por cultivos de basidiomicetos, encontrado que se degradan según dos rutas: La más importante involucra una degradación hidrolítica no enzimática en la que se genera tiodiglicol y una segunda, de menos cuantía, el la que en enlace de azufre se rompe por descloración hidrolítica y da cloroetanol y cloroetano.

Sirviendo de referencia el grupo cloroetil de la iperita se han buscado otros productos más reactivos en los que se sustituye el azufre por un grupo amino terciario, y así surgieron tres **mostazas nitrogenadas**: HN1, HN2 y HN3, cuyas fórmulas son muy parecidas a la de la iperita pero tienen sustituidas el azufre por nitrógeno:

- La HN1 es la N-etil 2,2 dicloroetil amina: $C_2H_5\text{- N= }(CH_2\text{-}CH_2Cl)_2$
- La HN2 es la N-metil 2,2 dicloroetil amina: $CH_3\text{- N = }(CH_2\text{-}CH_2Cl)_2$
- La HN3 es la 2,2´,2´´ tricloroetil amina: $N_\ (CH_2\text{-}CH_2Cl)_3$.

El nombre de mostazas se debe a que tienen el grupo cloroetil común con la iperita, aunque su olor no tiene nada que ver con aquella, ni con la mostaza. Son sustancias líquidas a temperatura, con puntos de ebullición de 85 ºC (HN1), 75 ºC (HN2) y 128 ºC, y aún más persistentes que la iperita.

Son muy poco solubles en agua pero muy solubles en compuestos orgánicos, siendo esta la forma preferente para pasar las barreras celulares. En la Tabla II se han recogido algunos valores de la CTI 50, por inhalación y sobre la piel, y parece que la toxicidad crece a medida que aumenta su volatilidad, aunque eso no sucede con la CTL50, pero no son excesivamente fiables.

TABLA 2

Valores de CTI y CTL en las mostazas nitrogenadas

Índice toxicidad	*HN1*	*HN2*	*HN3*
CTI_{50}, inhalado	**200**	**100**	**200**
CTI_{50},vapor sobre piel	**9.000**	**4.000**	**2.500**
CTL_{50}, inhalado	**1.500**	**3.000**	**1.500**

Otro de los vesicantes más conocidos es la **lewisita,** que es un derivado arsenical, al que se llegó pensando en el carácter toxico del arsénico.

Su fórmula es Cl_2As-(CH=CHCl), es el clorovinil dicloroarsina. Con anterioridad se conocían ya la metil y etil cloroarsina, que por razones técnicas fueron abandonadas.

Se hidroliza con el agua, liberando ClH de los cloros unidos al As, y se genera un producto (2 clorovinil oxiarsina) que es algo menos activo que la lewisina

$$Cl_2As\ (CH=CHCl) + H_2O \leftrightarrow 2\ ClH + (OH)_2As\ (CH=CHCl)$$

$$(OH)_2As\ (CH=CHCl) \leftrightarrow OAs\text{-}CH=CHCl\ (2\ clorovinil\ oxiarsina) + H_2O$$

La lewisita es de las sustancias que actúan sobre las enzimas que tienen grupos tiol, impidiendo su acción. Tiene la ventaja de ser de los pocos *vesicantes con tratamiento específico, que es el 2,3 dimercaptol propanol:*

$CH_2SH\text{-}CHSH\text{-}\ CH_2OH$

Los índices de toxicidad de la lewisita son:

CTI_{50} inhalación	300
CTI_{50} sobre piel	1.500
CTL_{50} inhalación	1.400
Índice Haber	1.500

6. LACRIMÓGENOS

Estos agentes con conocidos como sustancias antidisturbios, porque su característica es producir de manera inmediata, aunque transitoria, una intensa irritación ocular, que obliga a cerrar los párpados. Como ya se ha podido observar hay otros agentes que también excitan los lacrimales pero no tienen la triple característica de la inmediatez, temporalidad, y que su órgano diana directo sea la mucosa ocular. Se conocen desde muy antiguo, sin que por otra parte se sepan bien sus mecanismos de acción. Si la concentración es alta se afectan también las vías respiratorias, apareciendo dolores en el pecho.

Para tratar a los pacientes suele bastar lavar los ojos con disoluciones diluidas de bicarbonato sódico o de tetraborato sódico.

Como lacrimógenos se han empleado un buen número de sustancias, pero en la actualidad se han quedado reducidas a dos: la cloroaceto fenona, conocida en la nomenclatura militar como **CN** y el orto cloro benzal malonitrilo, al que se denomina **CS.**

La **cloroacetofenona**, es un producto sólido a temperatura ambiente, de color blanco, poco soluble en agua, aunque soluble en algunos disolventes orgánicos, como etanol, éter, tetracloruro de carbono, cloroformo y benceno.

Su fórmula química es:

$C_6H_5\text{-}CO\text{-}CH_2Cl.$

Su solubilidad en estos disolventes permite emitirle en frío, o por explosión puesto que es estable a temperaturas moderadamente altas, e incluso en caliente en mezcla con una fumígeno.

A partir de concentraciones de 0,3 mg/m^3 se comienza a sentir su acción, y a 2,0 mg/m^3 ya es difícil de soportar.

El **orto-clorobenzal malonitrilo,** es el más empleado a partir de la segunda mitad del siglo XX, por tener un poder lacrimógeno superior al de la cloroacetofenona y, posiblemente, por tener un procedimiento de obtención más sencillo. Su fórmula química es

cloroacetofenona
Guerrero Pág. 139

Su acción fisiológica sobre los ojos es semejante a la de la cloroacetofenona pero, además, actúa con mayor rapidez sobre las vías respiratorias y la piel. Produce eritemas en la piel, fatiga y ahogo. Su CTI_{50} es de 20.

Algunos de estos productos proceden de plantas como la adormidera. Son gases a la temperatura ambiente, poco solubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos, siendo de esta manera como se realiza su dispersión en el aire.

La descontaminación es sencilla, pues basta con lavar las zonas afectadas con agua y jabón.

7. ESTORNUTÓGENOS Y EMÉTICOS

Son sustancias cuyos efectos se traducen en fuertes estornudos y en profundos vómitos, pero al igual que les sucede a los vesicantes y lacrimógenos, no son las únicas acciones que originan, aunque sí las más cualificadas.

Atacan, en general a las vías respiratorias, con escozores de garganta, accesos de tos, aumento de secreciones nasales y salivares, vómitos, cosquilleo, lagrimas, e incluso pueden llegar a producir diarreas.

Al igual que la lewisina, que es un vesicante, las sustancias estornutógenas y eméticas son compuestos derivados de las cloroarsinas, que no son gases, sino sólidos dispersos el aire que atraviesan los filtros de las

máscaras y acaban obstruyéndoles, lo que produce ahogos y mueve a quienes les padecen a quitarse las máscaras con lo que quedan desprotegidos ante otro agresivos químicos.

Los más habituales son la difenilcloroarsina, la difenilcianoarsina y la difenilaminocloroarsina.

La **difenilcloroarsina** tiene la fórmula $(C_6H_5)_2$= As-Cl, y en términos militares se denomina **DA**. Se conoce desde el siglo XIX y fue empleada por los alemanes en 1917. Es un sólido, que funde a 41º C lo que permite su volatilización con facilidad. Es poco soluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos volátiles, siendo esta otra forma de conseguir su dispersión en el aire y su inmediata conformación como partícula.

Reacciona de manera muy semejante a la lewisita, por lo que se hidroliza en el agua:

$$2\ (C_6H_5)_2 = As\text{-}Cl + H_2O \leftrightarrow [(C_6H_5)_2As]_2O + 2ClH$$

Sus índices de toxicidad son:

CTI_{50} ..... 15 mg/m^3

CTL_{50}. ..... 15.000 «

La enorme diferencia entre la CTL y la CTI, facilita su empleo sólo como incapacitante.

La **difenilciano arsina,** denominada militarmente **DC,** tiene la formula de $(C_6H_5)_2$=As-CN, de punto de fusión más bajo que la anterior (34 ºC), y también insoluble en agua y soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Asimismo, de reactividad muy análoga, y por ello se hidroliza, aunque ahora liberando CNH:

$$2\ (C_6\ H_5)_2 = As\text{-}CN \leftrightarrow [(C_6\ H_5)_2\ As]_2\ O + 2CNH$$

a pesar de liberarse CNH, siendo sus índices de toxicidad:

CTI_{50} ..... 25 mg/m^3

CTL_{50} ..... 10.000 «

Es decir, que a pesar de liberarse CNH, el CTI es un poco superior al de la difenilcloroarsina, pero el CTL es superior al de esta, como lógicamente le corresponde a la elevada toxicidad del CNH que se libera.

El último de los estornutógenos citados es el **difenilaminocloroarsina**, conocido como **DM**, y cuya fórmula es cíclica porque el grupo NH= enlaza cada una de sus valencias con un resto fenílico:

$$NH= (C_6H_4)_2= As\ Cl$$

DIFENILAMINOCLOROARSINA

Es también insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos, y tiene unos índices de toxicidad parecidos al del anterior

CTI_{50} ..... 10 mg/m^3
CTL_{50}..... 15.000 «

8. PRODUCTOS SOFOCANTES

Las sustancias sofocantes actúan sobre el sistema respiratorio, que tiene la misión de intercambiar el oxígeno del aire por el CO_2 que se forma a nivel celular al oxidarse la glucosa.

Las vías respiratorias, como es bien sabido, comprenden desde la boca y fosas nasales hasta los pulmones, en los que se alojan los bronquios que, a su vez, terminan en los alvéolos. Es en éstos donde, merced a un juego de presiones parciales de los gases implicados, e incluso de pH, la sangre intercambia el CO_2 con el oxígeno del aire, actuando de intermediaria la hemoglobina que llega a través de las venas en forma de carbóxihemoglobina y en los alvéolos se intercambia con el oxígeno formando oxihemoglobina y liberando el CO_2:

$$Carboxihemoglobina + O_2 \leftrightarrow Oxiheglobina + CO_2$$

El oxígeno llega a las células en forma de oxihemoglobina a través de las arterias, y el intercambio entre la oxihemoglobina y el CO_2 sucede también por un juego de presiones parciales y de pH.

$$\text{Oxihemoglobina} + CO_2 \leftrightarrow \text{Carboxihemoglobina} + O_2;\ pH>7$$

En la respiración celular se consume este oxígeno por reacción con las sustancias orgánicas y se genera energía, CO_2 y agua. Pero los aumentos de acidez, debidos a la facilidad de hidrólisis de estos agresivos químicos, alteran estos equilibrios en el sentido de estabilizar el CO_2, impidiendo la formación de carboxihemoglobina y la liberación de oxígeno.

Todo este mecanismo se puede cuantificar a través de los pK del ácido carbónico:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow CO_3H_2 \leftrightarrow CO_3H^- + H^+ \ pk_1 = 7$$

$$CO_3H^- \leftrightarrow CO_3^{=} + H^+ \ pk_2 = 11$$

Para pH < 7 hay CO_2 molecular, no hay reacción con la oxihemoglobina y no se genera O_2, con lo que no hay intercambio y se crea la situación de anoxia.

El mecanismo expuesto es, sin duda, una simplificación grosera, pues hay etapas intermedias mucho más complejas, donde pueden formarse radicales libres.

Por otra parte en las vías respiratorias altas, boca, nariz, faringe y laringe, se provocan irritaciones de garganta, estornudos y accesos de tos y fuerte lagrimeo en los ojos.

Las sustancias más usadas como sofocantes son cloro, fosgeno, difosgeno, trifosgeno y cloropicrina, de las cuales sólo las dos primeras son gases en los intervalos más frecuentes de temperatura ambiental; el disfosgeno es líquido con PE de 127 ºC, el trifosgeno sólido con un P.E. de 76 ºC y P.E a 206 ºC y la cloropicrina, también líquida con un P.E. de 112,3 ºC. Por tanto, el término de gases asfixiantes con que genéricamente se les denomina sólo es aplicable a los dos primeros.

El **cloro**, ya sea en forma salina o como compuestos organoclorados formados por las plantas y otros seres vivos, es un elemento ampliamente difundido en el planeta. A través de los análisis de meteoritos puede estimarse que su contenido en el planeta es de 22 Yg (yottagramos), es

decir de 22. 10^{24} gramos, estando distribuido en la litosfera, en los océanos, en las aguas superficiales y subterráneas, en la criosfera y en la atmósfera.

En la naturaleza se forman espontáneamente más de 2.600 compuestos organohalogenados, de los que más de 1500 contienen cloro y son producidos por plantas terrestres y marinas, por bacterias, hongos, líquenes, insectos, y diversas clases de animales marinos (esponjas, túnidos, etc.), así como por algunos animales superiores y por un reducido número de mamíferos. Continuamente se están descubriendo nuevos organohalogenados naturales y no se tardará mucho en que los conocidos superen las 3.000 especies.

Señalo estas circunstancias porque hay muchos compuestos de cloro cuyo uso se restringe hoy ante los riesgos que originan para la salud, riesgos generalmente comprobados aunque a veces no pasan de presunción preventiva. Estas circunstancias adquieren aún más fuerza al tratar del cloro como gas asfixiante. Terpenos, esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, aminoácidos y péptidos, alcaloides, heterociclos, quinonas, fenoles, etc., son todos compuestos naturales que contienen cloro.

El cloro tiene una serie de propiedades muy positivas: es un excepcional agente de síntesis, es esencial en la industria química y farmacéutica, al igual que sus sales, es un excelente antiséptico, más del 85% de las medicinas, incluidas algunas básicas para la salvaguarda de la vida, usan cloro en su fabricación, es esencial en la lucha contra el cáncer, aunque algunos organoclorados pueden ser cancerígenos y más de la mitad de los productos comercializados por la industria química se derivan de la industria del cloro. Más de 1.500 productos industriales que contienen cloro se emplean en la salud pública, en alimentación, en materiales textiles, transportes, cosméticos, actividades de ocio, etc.

Y frente a esto, sólo unas muy pocas de carácter negativo: Su riesgo de uso como gas bélico, la aludida formación de productos clorocarbonados con implicación carcinogénica o con riesgo de bioacumulación y su susceptibilidad para destruir el ozono estratosférico.

El cloro se obtiene a partir de los cloruros de sodio y de potasio, por oxidación:

$$Cl^{-} \leftrightarrow Cl^{0} + e$$

Industrialmente, se emplea la electrolisis como oxidante:

$$2\ ClNa + 2\ H_2O \leftrightarrow Cl_2 + 2\ NaOH + H_2$$

La obtención de 1 t de Cloro proporciona 0,0284 t de hidrógeno y entre 1,12 y 1,56 t de una disolución de sosa de concentración comprendida entre el 50% y el 33%. Entre las tecnologías electrolíticas más antiguas está la de amalgama, que tiene el peligro ambiental de que pierde mercurio al aire, al agua y a la sosa producida. En los últimos 10 años se ha hecho un esfuerzo considerable para reducir las emisiones hasta 1,25 gr. por t de capacidad instalada, cantidad despreciable comparada con otras fuentes tanto naturales como antropogénicas.

A pesar de todo, para disminuir las emisiones de mercurio, se ha desarrollado la tecnología de membranas, que mejora poco a poco, hasta haberse convertido en la mejor técnica disponible, BAT, según ha reconocido la UE, a través de su Instituto de Prospección Tecnológica de Sevilla en un documento BREF (BAT de referencia) de octubre del año 2000.

La producción de cloro en la UE, antes de su ampliación, estaba cercana a los 10 MM de t, de las que el 22% procede de instalaciones con membrana.

En la primera Guerra Mundial los alemanes utilizaron en 1915, con dudoso éxito. En el primer ataque utilizaron 180 t de cloro en un frente de 6 Km.; según sus fuentes el ataque produjo 15.000 bajas entre las fuerzas aliadas, de las cuales 5.000 muertos. En un ataque posterior llegaron a usar 260 t y disminuyó el número de muertos a 1000. El cloro es un gas muy irritante que daña al sistema traqueobronquial y a los tejidos pulmonares. El mecanismo base de su toxicidad es la formación de ClH y ClOH por reacción con el agua extra e intracelular, que una vez ionizados pueden atravesar las paredes de las células y formar oxígeno y radicales libres que reaccionan con las moléculas biológicas para dar cloraminas y compuestos oxidados de azufre.

En realidad se producen dos tipos de mecanismos: uno de irritación en la parte alta del tracto respiratorio, que puede manifestarse después de haber estado expuesto a una concentración de cloro tolerada; y otro de toxicidad, cuando se está sometido a dosis elevadas de cloro, caracterizado por edemas en las vías respiratorias y tejidos pulmonares, exudados en los alvéolos, destrucción de mucosas bronquiales, hemorragias. etc.

El **cianuro de hidrógeno**, es de alta toxicidad, pero prácticamente se ha dejado de utilizar como gas de guerra por la mayor eficacia ofrecida por otros productos. Es líquido que hierve a 26 ºC por lo que tiene una elevada volatilidad, haciendo difícil que al aire libre se logre concentración suficiente para que se alcancen resultados letales. Sin embargo, en lugares cerrados es muy peligroso y pequeñas concentraciones pueden causar la muerte, sin que se conozca antídoto suficientemente eficaz. Su mecanismo consiste en inhibir la acción de las enzimas promotoras de la oxidación celular que suministra energía a las células. Se empleó por Irak en la guerra contra los kurdos en los años 80.

El **fosgeno** o cloruro de carbonilo, conocido como **CG** en los medios militares, es gas estable a la temperatura ambiente, que se obtiene por oxidación del cloroformo

$$2\ CHCl_3 + O_2 \leftrightarrow 2\ COCl_2 + 2ClH$$

inicia su descomposición a los 300 ºC según:

$$COCl_2 \leftrightarrow CO + Cl_2$$

Y se hidroliza con facilidad generando ClH:

$$COCl_2 + H_2O \leftrightarrow CO_2 + 2ClH$$

Fue el más tóxico de los utilizados durante la Primera Guerra Mundial y fue el responsable del mayor número de bajas, porque el ClH que se libera causa un edema pulmonar. A concentraciones inferiores al CTI provocan una irritación ligera de manera inmediata, pero unos días después puede degenerar en edema pulmonar. Concentraciones superiores a las de CTL, bastan una o dos aspiraciones para causar la muerte a las pocas horas. Se protege bien con máscaras antigas que contienen Zn^{2+}, pero se ha demostrado que aumentan su eficacia con metales de transición en estado elemental, como el níquel, porque la reacción con iones cinc es más exotérmica, y los gases se retienen peor.

El **difosgeno** es el cloroformiato de triclorometilo $ClCOO\text{-}CCl_3$, líquido, soluble en la mayor parte de los disolventes orgánicos, que se descompone a fosgeno:

$$ClCOO\text{-}Cl_3 \leftrightarrow 2\ Cl_2CO$$

Asimismo, también se conoce el **trifosgeno, $OC=(OCCl_2)_2$,** que es un sólido cristalino, que se descompone en tres moléculas de fosgeno.

Por último, también hay que citar la **cloropicrina**, empleada como agresivo en la primera guerra mundial, de fórmula $Cl_3C\text{-}NO_2$, líquida y muy estable, muy irritante, pero no demasiado sofocante.

Los índices de toxicidad de todos ellos, se recogen en la Tabla III, para facilitar su valoración conjunta.

TABLA 3

Índices de toxicidad de los sofocantes

Índice	*Cloro*	*Fosgeno*	*Difosgeno*	*Cloropicrina*
Ind. HabberI	7.500	450	500	2.000
CTL_{50} *	19.000	3.200	3.200	20.000
CTI_{50} *	1.800	1.600	1.600	1.600

*** Las cifras se refieren a mg/min.m^3**

Los más tóxicos son los dos fosgenos y el cloro es el menos tóxico.

9. SISTEMAS DE PROTECCIÓN

La mejor protección es **detectar de forma tan prematura** como sea posible la situación de riesgo, y en segundo lugar **identificar**, también cuanto antes, el producto tóxico.

La mayoría de los sistemas de protección se basan en **barreras físicas**, como pueden ser máscaras antigás, ropas especiales, guantes y gotas, que después deben de ser adecuadamente descontaminadas. Las sustancias oxidantes débiles pueden ser muy útiles para la descontaminación.

10. NOTA FINAL

Después de tanto hablar de toxicidad y de agresividad, y pesar de que pueda parecer redundante, que sin duda lo soy, quiero terminar como em-

pecé: Destacando el hecho de que ya son pocos, si es que existe alguno, de los que creen en la neutralidad sociológica y ética de la Ciencia. La Ciencia ha influido de forma extraordinaria en el desarrollo social en tanto busca con precisión, rigor y generalidad el comportamiento de la materia y su mejor manera de aprovechar esas propiedades. El problema está en la valoración y empleo de las mismas. Y de ello es responsable la sociedad en su conjunto. La Ciencia ha dado paso a una sociedad y a una nueva cultura, que se superpone con la heredada, con un carácter liberador, aun cuando para ello necesite mantener los valores permanentes, para que no se convierta en opresora. Una cultura capaz de conocer, saber hacer y aplicar, dentro de lo que son usos correctos.

El conocimiento alcanzado sobre los organismos biológicos permitirá el desarrollo de sistemas para identificar con rapidez tóxicos y patógenos y establecer métodos de protección de amplio espectro. El pasado mes de agosto (2003), entre los días 23 y 28, el Cambridge Healthtech Institute, celebró una Conferencia sobre «Investigación, Tecnología y Aplicaciones a la Biodefensa», en la que entre otras cuestiones se trataron temas de superinmunización, nuevas vacunas e inmunoterapia, terapias antiinfectivas, nuevos métodos de descontaminación, inhibición y neutralización. Entre estos últimos las pulverizaciones con agua oxigenada pueden ser de especial eficacia frente a los agresivos químicos.

Por ello, y a modo de manifestación de intenciones, quiero terminar matizando que si bien la Ciencia es fuente de civilización y camino de la verdad, pero sólo en la medida en que se alcance una civilización equilibrada la humanidad también crecerá de forma semejante, a sabiendas de que «los átomos y las moléculas son los únicos medios de que dispone el hombre y la naturaleza para hacer cosas».

El instrumento para manejar átomos y moléculas es la Química, sin olvidar que la Naturaleza también los maneja, incluso en doble sentido, pues son de antiguo conocidas las plantas venenosas y las sustancias responsables de su toxicidad. La diferencia esencial es que mientras el hombre utiliza para ello su inteligencia, en las plantas es algo de carácter espontáneo e inherente con su vitalismo, y que los seres vivos no racionales tienen la suficiente racionalidad para saber rehusarlas. Deduzca cada uno de estas palabras las conclusiones que éticamente llevan implícitas.

BIBLIOGRAFÍA

(1) DEBOUZY, J. C. y otros. (2002). *«Cell biology and toxicology»*. 18(6), 397-408.

(2) FATAL, E. Y CARTER, E.(2000) «*Journal of Physical Chemistry*» 23, 104(11), 2248-2252.

(3) GUERRERO VILLARROEL, F Y GERRERO FLORES F. «Defensa Química» Ministerio de Defensa. Madrid.

(4) GREENFIELD, R. A. y otros.(2002) *«Americal Journal of the Medical Sciences»* 323 (6), 323-340.

(5) «Las armas químicas y Vieques» *www.viequessupport.org/docs*. 2002.

(6) RODRÍGUEZ, J. *www.ehu.es/zorrilla/juanma/armas/armamento.pdf*.

(7) WARIISHI, H. y otros.(2002) *«Biotechnology Letters»* 24(6), 501-505.

(8) WINDER, CH. (2001)*«Environmental Research Section A»* 85, 105-14.

Agresivos bloqueantes de la cadena respiratoria

ARMANDO MERINO

General Farmacéutico. Jefe de Apoyo y Ordenación Farmacéutica de la Defensa

Con la denominación de AGRESIVOS BLOQUEANTES DE LA CADENA RESPIRATORIA se conoce un grupo de Agentes Químicos de acción muy rápida y letal, pero de baja rentabilidad militar o terrorista.

Se engloban en este grupo diversos compuestos a base de cianuro, que tienen poca o nula capacidad irritante para las vías respiratorias altas y el parénquima pulmonar lo que les diferencia claramente del grupo de agresivos con toxicidad pulmonar, denominados gases neumotóxicos, asfixiantes o sofocantes (fosgeno, cloro, óxidos de nitrógeno, etc.), objeto de estudio en otra conferencia (Dr. Jiménez Gómez).

Los Agentes Cianógenos pertenecen a la 1.ª generación y fueron empleados por 1.ª vez durante la 1.ª Guerra Mundial. En la 2.ª Guerra Mundial fueron usados por Japón frente a China. Asimismo es conocido que Alemania utilizó ácido cianhídrico, al que denominaban gas ZYCLÓN, en las cámaras de gas de los campos de concentración. En 1.988 fue empleado por Irak contra los pueblos Kurdos.

Fuera de los conflictos bélicos antes citados, estos agentes también han sido utilizados para atentar contra la vida de civiles en unos casos, o se ha temido que pudiesen ser empleados con esa finalidad en otros.

Hoy día sabemos que la bomba que ocasionó 5 muertos y decenas de heridos en el World Trade Center de Nueva York, en 1993, contenía un explosivo tradicional y cianuro, que fue inactivado por el calor generado en la explosión.

Con fines terroristas también ha sido utilizado el cianuro, asociado a otros agresivos, por la secta del Guru Shoko Asahara, al menos en doce ocasiones contra la población civil en Japón.

Por otra parte, hay que tener en cuenta el riesgo ocasional de accidentes en la industria, tal como sucedió en 1.984 con un compuesto relacionado con el cianuro, el metil isocianato, que produjo en Bophal (India) unas 5.000 víctimas mortales y más de 200.000 afectados.

Tampoco debemos olvidar que el cianuro se encuentra normalmente en algunos alimentos como almendras, cerezas, fríjoles, melocotones y otros vegetales.

Características

Los Agentes cianurados poseen un olor típico a almendras amargas a concentraciones de 0.2 – 5 p.p.m.; pero su detección está genéticamente condicionada y no se da en un 20-40% de la población.

Son NO PERSISTENTES, es decir, que utilizados o dispersados, incluso en estado líquido o sólido, pasan rápidamente al estado de gas o vapor como consecuencia de su gran volatilidad.

Actúan principalmente bajo esta forma y no dejan contaminación alguna apreciable, poco tiempo después de su dispersión.

Se HIDROLIZAN lentamente en agua perdiendo su toxicidad y SE OXIDAN por oxidantes fuertes tipo permanganato.

Tienen GRAN AFINIDAD POR EL OXIGENO, siendo inflamables, lo cual hace que pierdan efectividad si el lanzamiento se realiza con proyectiles de artillería.

Son agentes DE EFECTOS INMEDIATOS, ya que su periodo o tiempo de latencia (tiempo transcurrido desde el momento en que se absorbe hasta la aparición de los primeros efectos) es muy corto, de segundos a minutos.

Son AGENTES LETALES porque provocan la muerte con dosis relativamente pequeñas y altamente tóxicos. La toxicidad, en el caso de los agentes químicos, dependerá de la concentración que hay en el ambien-

te y del tiempo que una víctima potencial está expuesta; esta concentración-tiempo (Ct) se expresa en mg. min/m^3.

Para el Ac. Cianhídrico la dosis media letal (LCt50) es de 2.000-4.000 mg. min/m^3.

Pasamos ahora a describir los principales agentes químicos de este grupo:

ÁCIDO CIANHÍDRICO (CNH)

Denominación OTAN: AC. Se conoce también como ácido prúsico y cianuro de hidrógeno. Es un líquido incoloro altamente volátil por lo que es difícil manejarlo puro; libera el gas cianhídrico, menos denso que el aire (se acumula en la parte superior de los recintos cerrados). Puede obtenerse a partir de una reacción entre el ácido sulfúrico y la sal sódica o potásica de cianuro. También se libera en los altos hornos y por pirólisis de diversas sustancias: poliuretano, poliacrilonitrilo, resinas acrílicas, celuloide, humo del tabaco y humos de incendios en general.

Se utiliza en la industria fotográfica, manufactura de plásticos, fumigación de barcos y locales industriales y para la síntesis de productos químicos (como los nitrilos), colorantes y productos farmacéuticos. Se emplea asimismo en galvanización, minería y metalurgia.

Su persistencia es de 5-10 min. (Tª: 15º C.) y de 10 min. a 1 h. (Tª: - 15º C) siendo su estado físico líquido (Tª: 20º C).

Se maneja absorbido en sustancias sólidas (ZYCLÓN B) o líquidas irritantes (ZYCLÓN A).

BROMURO DE CIANÓGENO (BrCN)

Es un sólido volátil, incoloro o blanco cristalino. Puede liberar Bromo, ácido bromhídrico y ácido cianhídrico en agua, ácidos y por descomposición térmica. Más denso que el aire, por lo que se acumulará en zonas inferiores.

YODURO DE CIANÓGENO (ICN)

Es un material sólido incoloro o blanquecino muy volátil. Puede liberar yodo, yoduro de hidrógeno y ácido cianhídrico en agua, ácidos y por descomposición térmica. Mas denso que el aire, acumulándose en zonas inferiores.

CLORURO DE CIANÓGENO (ClCN)

Su denominación OTAN es CK. Es un líquido altamente volátil que puede liberar Cloro, ácido clorhídrico y ácido cianhídrico en agua, ácidos o por descomposición térmica. Más denso que el aire, acumulándose en zonas inferiores.

Propiedades físicas de los dos agentes cianógenos más utilizados.

Propiedad	Cianuro de hidrógeno (AC)	Cloruro de cianógeno (CK)
Apariencia	Líquido incoloro que produce un vapor incoloro	Gas incoloro muy irritante
Fórmula Química	HCN	CNCl
Peso molecular	27,2	61,48
Densidad (g/cm^3)	0,687 (10º C)	1,18 (20º C)
Punto de fusión	–13,3º C	–6,9º C
Punto de ebullición	25,7º C	12,8º C
Densidad de Vapor	0,93	2,1
Presión de Vapor	165 (–10º C) 256 (0º C) 600 (20º C) 742 (25º C)	1,010 (20º C)
Volatilidad (mg/m^3)	37.000 (–40º C) 1.080.000 (25º C)	6.132.000 (25º C)

Mecanismo de acción

La Toxicidad de los agentes cianurados va unida a su capacidad de liberación del ión cianuro ($CN^{-)}$, un potente veneno celular.

Una vez absorbido, el ión CN tiende a fijarse en los hematíes y en las estructuras celulares moleculares que contienen metales como hierro, cobre o cobalto; la unión más crítica es la que se produce con el ión férrico (Fe^{+++}) de la enzima citocromo-oxidasa mitocondrial, bloqueando la respiración celular.

Al estar bloqueada la utilización de oxígeno, la célula pasa a usar el metabolismo anaeróbico, generando ácido láctico en exceso.

Los órganos diana más sensibles son los más necesitados de oxígeno: el Sistema Nervioso Central y el Cardiovascular.

Como mecanismo de defensa contra la acción tóxica del ión CN, el organismo implica varios sistemas enzimáticos, el principal de los cuales es la rodanasa de Lang, tiosulfato-transferasa hepática mitocondrial que transforma el cianuro en tiocianato, tras su combinación con tiosulfato. En forma de tiocianato es eliminado por la orina.

Respirar un ambiente con más de 50 p.p.m. supone ya un riesgo para la salud, mientras que una concentración ambiental de 270 p.p.m. durante 10 minutos se considera letal.

Una concentración de CN en sangre de 0.2 mg/dl es muy tóxica y si se sobrepasa los 0.3 mg/dl es generalmente mortal.

Clínica

En la FORMA SOBREAGUDA (>270 p.p.m.) el cuadro clínico suele ser fulminante y conducir a la parálisis cardiorrespiratoria en menos de 5 minutos.

Tan sólo un minuto después de iniciar la inhalación, y en función de la concentración ambiental, el intoxicado experimenta agitación, sofoco, palpitaciones, cefalea, vértigo y angustia, taquiapnea, sudoración, pérdida de conciencia y convulsiones.

En la exploración física está pálido, sin cianosis, taquicárdico, hipotenso y con trastornos del ritmo cardíaco que conducen a la asistolia y a la parada respiratoria en pocos minutos. También presenta acidosis metabólica grave.

En la FORMA AGUDA (100-200 p.p.m.) el paciente debuta con cefalea, vértigo y vómitos, seguido de disnea, respiración de Cheyne-Stokes y estupor. Luego convulsiones y fase terminal de coma flácido, respiración lenta y superficial, colapso cardiovascular y muerte en 30-60 minutos por parálisis respiratoria.

En la FORMA SUBAGUDA (<100 p.p.m.) la intoxicación se manifiesta con náuseas, sabor metálico, somnolencia, mareos, hiperapnea, irritación de mucosas, cefalea, vértigo, disnea y convulsiones.

La inhalación de bromuro, yoduro o cloruro de cianógeno podría desencadenar, además, signos y síntomas irritativos de las vías respiratorias, por los productos resultantes de su hidrólisis

Diagnóstico

Puede realizarse determinando el tóxico en sangre total, orina, contenido gástrico y tejidos; una concentración en sangre total igual o superior a 39 micromoles/litro es considerada tóxica por la mayoría de los autores.

Correlación entre la concentración en sangre total del ión cianuro y la sintomatología clínica.

Concentración micromoles/litro	*Síntomas*
19-38	Intoxicación ligera
38-96	Intoxicación moderada o subaguda
96-115	Intoxicación grave ó aguda
> 115	Intoxicación potencialmente letal o sobreaguda.

Las exploraciones complementarias, de mayor interés, son el equilibrio ácido-base y la determinación de ácido láctico, ya que todo paciente realmente intoxicado con cianuro debe presentar una acidosis metabólica con «Vacío aniónico» aumentado, debido a la presencia de ácido láctico.

Aunque una lactacidemia aumentada puede obedecer a muchas otras causas toxicológicas (monóxido de carbono, sulfhídrico, isoniacida, salicilato, etc) ó no (shock, parada cardiorrespiratoria, etc.), en el contexto de una posible exposición al cianuro encontrar un «vacío aniónico» superior a 16 m Eq/l ó una concentración de ácido láctico igual o mayor de 7 milimoles/litro sugiere este diagnóstico, que será confirmado por la cuantificación del cianuro.

Igualmente, una diferencia arteriovenosa de oxígeno hace sospechar un bloqueo de la respiración celular (arterialización de la sangre venosa).

Posibles secuelas: En cualquiera de los casos, tras la recuperación del intoxicado, pueden quedar secuelas en forma de parálisis, cefaleas, parkinson y trastornos psíquicos.

Tratamiento

Comporta, en primer lugar la retirada de la víctima del ambiente contaminado, actuación que puede ser de alto riesgo para los rescatadores si no van provistos de un equipo de protección respiratoria o si no se ha renovado el aire ambiental. Al ser el ácido cianhídrico muy ligero, tiene una vida media larga en el aire, pero se diluye rápido a concentraciones no tóxicas. Puede mezclarse con el agua. No se concentra en tierra ni alimentos. La descontaminación ambiental puede hacerse por dispersión del aire y spray con agua para depositar los vapores, ya que convierten el gas en líquido que es más pesado. Se destruye con la luz solar, lo cual se acelera con dióxido de titanio. Conviene neutralizar el agua con bicarbonato sódico o piedra caliza aplastada. También puede tratarse el agua con ozono, peróxido de hidrógeno o hipoclorito sódico o cálcico.

Aunque la descontaminación cutánea es innecesaria, se aconseja retirar toda la ropa del paciente y lavar la piel con agua y jabón o con hipoclorito sódico al 0,5 %.

También conviene lavar los ojos con agua durante 10-20 minutos.

La valoración inicial debe dirigirse hacia las constantes vitales utilizando, en caso necesario, medidas de reanimación cardiopulmonar básica o avanzada, en función del medio donde son aplicadas.

La perfusión de expansores plasmáticos, fármacos adrenérgicos y bicarbonato sódico, junto a la oxigenoterapia a la máxima concentración posible, constituyen también medidas inespecíficas, pero de gran valor, en el tratamiento sintomático de esta intoxicación.

Vemos, pues, como el tratamiento debe ser precoz e incluir medidas de soporte ventilatorio y hemodinámica, corrección de la acidosis metabólica, monitorización cardíaca y, como no, la administración de antídotos para formar complejos estables y atóxicos.

En relación con el tratamiento específico, ha habido una importante modificación en la estrategia antidótica en estos últimos años.

Metahemoglobinizantes

En 1934, Chen y Rose propusieron como tratamiento para la intoxicación por CN^- el empleo de substancias generadoras de Metahemoglobina (MHb) como el nitrito de amilo, el nitrito sódico y el 4-dimetil aminofenol (4-DMAP) por su capacidad de transformar el ión ferroso (Fe^{++}) de la hemoglobina en ión férrico (Fe^{+++}), el cual compite con el ión férrico (Fe^{+++}) de la enzima citocromo-oxidasa para fijar el ión cianuro (CN^-). Sin embargo, la metahemoglobinemia inducida es difícil de controlar, y aún más, tales substancias pueden causar vasodilatación que, a su vez, puede conducir al shock.

Actualmente se consideran de segunda elección:

1. NITRITO DE AMILO

El nitrito de amilo sólo es útil cuando se administra con presión positiva en un sistema respiratorio cerrado. Romper la ampolla cerca del rostro del sujeto o incluso dentro de la pieza facial de la máscara antigás es inadecuado. No debe emplearse al mismo tiempo que se administra

oxígeno debido al riesgo de explosión. El tratamiento con nitrito de amilo debe ir seguido por el tratamiento con tiosulfato sódico.

2. NITRITO SÓDICO

(a) El nitrito sódico debe administrarse por vía intravenosa. Se debe inyectar por vía intravenosa al paciente diez mililitros de una solución al 3% (300 mg) de nitrito sódico a lo largo de un período de 3 minutos. El índice terapéutico del nitrito sódico es muy bajo; la dosis indicada, adecuada para adultos, ha producido la muerte al ser administrada a niños. El nitrito sódico se administra para producir metahemoglobina, la cual se combina con el cianuro. El cianuro se retira del organismo como tiocianato tras la administración de tiosulfato sódico.

(b) La disminución de la presión sanguínea tras la administración de las inyecciones de nitrito sódico es despreciable a menos que se permita al paciente adoptar una postura erguida. La aparición de un ligero grado de cianosis es evidencia de un grado deseable de formación de metahemoglobina (metahemoglobinemia). No se prevé que con las dosis indicadas se produzca un grado de metahemoglobinemia extremo o perjudicial. Si se produjese debe ser tratado con administración de oxígeno.

3. HIDROCLORURO DE DIMETILAMINOFENOL (DMAP)

(a) El 4-hidrocloruro de dimetilaminofenol (DMAP) ha demostrado ser muy eficaz en el tratamiento del envenenamiento por cianuro debido a la rápida formación de metahemoglobina. El DMAP puede salvar la vida del sujeto, pero no es curativo; es preciso administrar por vía intravenosa tiosulfato para lograr la curación definitiva. El DMAP debe ser inyectado lentamente por vía intravenosa en una dosis de 250 mg. Si se emplea la inyección por vía intramuscular se produce necrosis muscular y, por tanto, esta vía debe ser evitada.

(b) Si no se dispone de inmediato de tiosulfato de sodio debe administrarse al paciente 250 mg de DMAP cada hora hasta que sea posible administrarle el tiosulfato; este último completa el tratamiento.

(c) Debe recordarse que el DMAP produce cianosis debido a la formación de metahemoglobina. Esto indica que el tratamiento es eficaz y no que sea preciso llevar a cabo la resucitación del paciente. En el caso de que se haya formado demasiada metahemoglobina puede administrarse azul de metileno para convertirla en hemoglobina (Hb).

4. EDETATO DICOBÁLTICO (EDTA-Co_2)

Hillman y colaboradores, en 1.974, introducen un gran avance al proponer al Edetato dicobáltico como quelante del cianuro, debido a la marcada afinidad entre los iones cobalto y cianuro. Por sus reacciones adversas, el tratamiento se debe aplicar, con diagnóstico confirmado, a dosis de 300-600 mg por vía intravenosa en 1 minuto y otros 300 mg. a los 10 minutos seguido de inyección de glucosa hipertónica. Conviene vigilar la presión arterial, el ritmo cardíaco y la aparición de angioedema.

5. HIDROXICOBALAMINA

En 1.993, diversos autores (Riou, Forsyth, Haueto, Band y sus respectivos colaboradores) introducen la hidroxicobalamina en el tratamiento de las intoxicaciones por agentes cianurados, basada también en la afinidad entre el ión cobalto y el ión cianuro. Se trata de un antídoto muy eficaz, con una gran capacidad para quelar Cianuro y, al mismo tiempo, con un amplio margen de seguridad a pesar de las altas dosis que se deben utilizar.

La administración de hidroxicobalamina se realiza por vía intravenosa durante 15-30 minutos y la dosis más recomendada es de 2,5 g en intoxicaciones leves, 5 g en intoxicaciones graves y 10 g en las de riesgo vital. No sobrepasar, en cualquier caso, los 15 g.

La hidroxicobalamina no induce efectos hemodinámicos o anomalías en el transporte de oxígeno. Su potencial capacidad alergizante debe ser tenida en cuenta, aunque el riesgo de shock anafiláctico es muy bajo. También debe recordarse que tiñe la orina y la vena de color rojo.

Aunque la mayor experiencia acumulada con la hidroxicobalamina ha sido en víctimas de incendios intoxicadas por inhalación de cianuro, se

considera que, ante el riesgo de desastres por accidentes industriales, transporte de materiales de riesgo, atentados terroristas o acción bélica con intervención de cianuro, debe ser el antídoto de primera elección.

6. TIOSULFATO SÓDICO

Es otro buen antídoto en el tratamiento de la intoxicación por agentes cianógenos, ya que es el substrato sobre el que actuará la RODANASA para convertir el cianuro en tiocianato, producto atóxico que será eliminado por la orina. La lentitud con la que actúa no lo hace aconsejable, ante una situación crítica, como fármaco de primera línea, pero es eficaz combinado con hidroxicobalamina o con nitritos, en distintos viales.

Se administra, por vía intravenosa, 50 ml de solución al 25% durante 10 minutos.

Antídotos específicos incluídos en el actual petitorio de los servicios farmacéuticos de la defensa

- **NITRITO SÓDICO AMPOLLAS DE 10 ml**:

Nitrito sódico,..... 300 mg.

Agua para inyección, ... c.s.

Forma farmacéutica y contenido del envase:

Envase con 10 ampollas de 10 ml, 300 mg.

Posología

Inyección intravenosa de 10 ml de Nitrito sódico al 3%, lo antes posible tras la intoxicación, a velocidad de 2,5 a 5 ml por minuto. A continuación, y por la misma vía, administrar 50 ml de solución de Tiosulfato sódico al 25%. Terminada esta operación, que puede salvar la vida del afectado, se realizará un lavado de estómago con solución de hiposulfito sódico o permanganato potásico al 2%, preferentemente esto último, para oxidar el cianhídrico remanente. Puede ser conveniente practicar respiración artificial con oxígeno y un 5 por ciento de carbónico. De producirse parada cardíaca, adrenalina intracardíaca (de 0,25 a 0,5 miligramos).

• **TIOSULFATO SÓDICO AL 25%**

Tiosulfato sódico, ...	12,5 g.
Fosfato bisódico anhidro, ...	396 mg.
Hidróxido sódico, ...	c.s.
Agua para inyección, ...	c.s.

Forma farmacéutica y contenido del envase:

Envase con 1 vial de 50 ml, 12,5 g.

Posología

Inyección intravenosa de 10 ml de nitrito sódico al 3%, lo antes posible tras la intoxicación, a velocidad de 2,5 a 5 ml por minuto. A continuación, y por la misma vía, administrar 50-100 ml de solución de Tiosulfato sódico al 25% (durante un periodo de infusión no inferior a 10 minutos). Terminada esta operación, que puede salvar la vida del afectado, se realizará un lavado de estómago con solución de hiposulfito sódico o permanganato potásico al 2%, preferentemente eso último, para oxidar el cianhídrico remanente. Puede ser conveniente practicar respiración artificial con oxígeno y un 5 por ciento de carbónico. De producirse paro cardíaco, adrenalina intracardíaca (de 0,25 a 0,5 miligramos).

Antídotos específicos que, por necesidad extraordinaria, podrían ser fabricados por los servicios farmacéuticos de la defensa:

— EDETATO DE COBALTO, ENVASE DE 10 AMPOLLAS.

— HIDROXOCOBALAMINA, ENVASE DE POLIPROPILENO CON 100 ml.

— 4-DIMETILAMINOFENOL (4-DMAP), 250 mg EN 5 ml, ENVASE DE 10 AMPOLLAS.

Terrorismo químico o biológico. respuesta sanitaria.recomendaciones

1. Dotar a las instalaciones sanitarias de sistemas de alerta frente a acciones terrorista QB.

2. Continua inspección y ensayo de los Equipos de Protección Individual contra ataques QB.
3. Tecnologías de detección más rápidas, simples, baratas y exactas.
4. Mejoras en la vigilancia local, provincial, regional y nacional y en la infraestructura.
5. Investigación de operaciones de descontaminación y clasificación de bajas masivas.
6. Almacenamiento, distribución y desarrollo de antídotos, vacunas y nuevas terapias.
7. Formación de los profesional sanitarios sobre agentes QB.
8. Simuladores para reconstrucción, valoración, predicción y toma de decisiones ante eventos.

BIBLIOGRAFÍA

(1) AMEDP-6(B)-Parte III. Manual OTAN sobre los aspectos sanitarios de las operaciones defensivas NBQ. Parte III – Química (1 de febrero de 1996).

(2) ARNOLD, J.L.; CBRNE-Chemical Warfare Agents. eMedicine Journal, Octubre, 2001; Vol. 2 (10). Dirección Web: *www.emedicine.com*

(3) BAUD, F. J.; (1994) Imbert M, Vicaut E et al: Time.course of lactic acidosis in acute cyanide poisonings treated with oxigen and high doses of hidroxocobalamin (abstract). EAPCCT XVI International Congress Vienna, Austria.

(4) BISMUTH, C.; CANTINEAU, J-P.; PONTAL, P. et al.;(1984) *Priorite de l'oxigenation dans l'intoxication cyanhydrique: A propos de 25 cas. J Toxicol Med 4*:107-121.

(5) CHEMICAL AND BIOLOGICAL TERRORISM. (2000) *Research and Development to Improve Civilian Medical Response. Jama, April 19, vol 283, n.º 15,* p. 2035

(6) DOMÍNGUEZ CARMONA, M.;*Aspectos Sanitarios de la Guerra Química. XIII Sesión científica. Academia Nacional de Medicina. Pp 260-314.*

(7) FOUYN, TH.; LISON, D.; WOUTERS, M.; (1991) *Management of chemical warfare injuries. Lancet; 337:* 121-122.

(8) HURST, CH. G.; *Decontamination in Textbook of Military Medicine. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Borden Institute. Walter Reed Army Medical Center 351-359.*

(9) IVARSSON, U.; NILSSON, H.; SANTESSON, J. A.; (1992) FOA briefing book on chemical weapons: threat, effects and protection. Umea, Suecia: National Defence Research Institute.

(10) PHYSICIANS FOR HUMAN RIGHTS.(1989): Winds of death: Iraq's Use of Poison Gas Against its Kurdish Population. Report of a Medical Mission to Turkish Kurdistan, Feb 1989.

(11) US ARMY.(1983) Proceedings of the symposium on Respiratory Care of Chemical Casualties. US Army Medical Research and Development Command, Nov 28-30, McLean, VA.

(12) ZAJTCHUK, R.; BELLAMY, R. F. eds. (1997) Textbook of military medicine-warfare, weaponry and the casualty (part 1): medical aspects of chemical and biological warfare. Washington, D.C.: Office of The Surgeon General Department of the Army.

La viruela como arma biológica

JUAN JESÚS GESTAL OTERO[1]

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

La utilización de agentes biológicos para la guerra es muy antigua. En la Edad Media, durante el sitio de la ciudad factoría genovesa, de Caffa (actual Feodosija-Ucrania) por el ejercito tártaro, este fue diezmado por una epidemia de peste, y antes de abandonar su asedio catapultaron cadáveres al interior de la ciudad. Los genoveses de retorno a su república introdujeron en Europa la enfermedad.[1]

La viruela fue utilizada como arma de guerra por las tropas inglesas en la guerra contra los franceses y amerindios (1754-1767), ocasionando una epidemia de viruela entre las tribus indias del valle del río Ohio. El descubrimiento de la vacuna por E. Jenner y su rápida extensión por todo el mundo, en la que nuestro país fue pionero hizo que la viruela dejase de tener interés como arma de guerra biológica.[2]

A raíz de los atentados del 11 de septiembre de 2001 el bioterrorismo ha cobrado un gran interés, pasando a ocupar las primera páginas de los medios de comunicación, y creando gran preocupación en los ciudadanos que se preguntan si los Estados están preparados para hacer frente a un ataque bioterrorista.

La difusión por la prensa del envío de cartas y paquetes con ántrax en EEUU nos hizo creer que estábamos ante una escalada de bioterrorismo (Tabla 1).[3] Sin embargo si miramos un poco hacia atrás (Tabla 2) vemos como estos incidentes ya eran comunes en EEUU con anterioridad a la destrucción de las Torres Gemelas.[4]

---

[1] Catedrático y Jefe de Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y Académico Numerario de la Academia de Farmacia de Galicia.

TABLA 1

Incidentes con ántrax en EE.UU. Año 2001

Tipo de caso	*Florida*	*N. York*	*N. Jersey*	*Washington*	*Total*
Confirmado	2	5	5	5	17
— Cutáneo	—	4	3	—	7
— Inhalación	2	1	2	5	10
Posible	—	3	2	—	5
— Cutáneo	—	3	2	—	5
— Inhalación	—	—	—	—	—
Casos totales	**2**	**8**	**7**	**5**	**22**

El terrorismo es una violenta y siempre letal forma de intimidación, que tiene como finalidad desestabilizar sociedades causando miedo, pánico, desorden social y caos económico. Las armas que suelen utilizar son generalmente las convencionales, pero a veces utilizan o amenazan con utilizar armas no convencionales (químicas, biológicas o nucleares).

TABLA 2

Incidentes con ántrax en EE.UU. Años 1992-1998

	1992	*1997*	*1998*
— N.º de incidentes	1	1	37
— N.º de afectados*	20	100	5.529
— Personas descontaminadas, tratadas o en cuarentena**	20	30	1.202

* Los datos son incompletos. Las cifras se basan en noticias de prensa.

** No se incluyen incidentes en los que no se dispone de cifras. La cifra total puede estar, por tanto, subestimada.

Fuente: Darcy Bender

Bioterrorismo es un término que se utiliza para denominar el uso terrorista de gérmenes o toxinas derivadas de gérmenes para producir muerte o enfermedad en hombres, animales o plantas.

La manifestación de la violencia con armas no sería posible si estas no existieran por tanto la industria y desarrollo armamentístico es causa necesaria. Igual sucede con el bioterrorismo que tiene sus raíces en los Programas de Guerra Biológica[5] que no han llegado nunca a llevarse a la práctica, tan solo en fase de ensayo.

Actualmente, si bien, al menos 140 naciones han renunciado al uso evidente de armas biológicas, el bioterrorismo supone un desafío real para la salud pública y la seguridad nacional. Potenciales bioterroristas comprenden los perturbados mentales y los sicóticos, fanáticos religiosos, extremistas políticos y organizaciones y naciones no dispuestas a obrar de acuerdo con la BWC de 1972.[5]

Además de la utilización del carbunco, se ha comenzado a comentar en los medios de comunicación la posibilidad de que se utilizasen otros agentes y entre ellos destaca el virus de la viruela, enfermedad erradicada del planeta en 1977, frente al que la población en general carece de inmunidad. Viruela y carbunco son dos enfermedades muy graves que pueden paralizar la vida de una ciudad o de una región.

En el documento «Plan estratégico para preparación y respuesta al terrorismo químico y biológico», elaborado por el Grupo de Trabajo de Planificación Estratégica del CDC[6], se clasifican los agentes biológicos críticos en tres categorías: A, B y C. (Tabla 3).

TABLA 3

Clasificación de los agentes biológicos del Grupo de Trabajo de Planificación Estratégica del CDC para la Preparación y Respuesta al Terrorismo Químico y Biológico».[16]

Categoría A
— Gérmenes de máxima prioridad
— Riesgo elevado para la seguridad nacional
— Pueden diseminarse fácilmente o transmitirse persona-persona
— Causan elevada letalidad
— Gran impacto sobre la salud pública
— Causan pánico en la población y alteración social
— Requieren una preparación de salud pública

— Comprenden:
Viruela, carbunco, peste, botulismo, tularemia y fiebres hemorrágicas (Ébola, Marburg, Lassa y Fiebre Hemorrágica Argentina).

Categoría B

— Agentes moderadamente fáciles de diseminar
— Causan moderada morbilidad y baja mortalidad
— Requieren:
aumento específico de la capacidad diagnóstica de los laboratorios de salud pública
incremento de la vigilancia epidemiológica

— Comprenden:
— Fiebre Q, brucelosis, muermo, encefalitis (EEV y EEW); toxina del ricino; toxina épsilon del *C. perfringens* y enterotoxina del *S. aureus.*
— *Subclase B:** Agentes patógenos transmitidos por el agua y los alimentos: *Salmonella spp, Shigella dysenteriae, E. coli O157:H7*; *Vibrio cholerae* y *Cryptosporidium parvum*.

Categoría C

— Patógenos emergentes que pueden ser utilizados para su diseminación masiva en el futuro
— Fácil disponibilidad
— Facilidad de producción y diseminación
— Potencial gran impacto sobre la salud pública: elevada morbilidad y mortalidad
— La preparación frente a ellos exige la puesta en marcha de investigaciones para mejorar la detección, diagnóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades que causan.

— Comprenden:
Virus Nipah, hantavirus, v. de la fiebre hemorrágica transmitidos por garrapatas, v. de las encefalitis trasmitidos por garrapatas, v. de la fiebre amarilla y *M. tuberculosis* multidrogorresistente.

* Agentes patógenos que son transmitidos por el agua y los alimentos.

Las declaraciones de Kenneth Abilek[7-8], un antiguo diputado, director del programa de armas biológicas de la antigua URSS, ha aumentado el interés por el asunto de que la viruela pudiese ser utilizada como arma biológica.

Abilek[7-8] comunicó que el gobierno soviético se embarcó en 1980 en un exitoso programa de fabricación de grandes cantidades de virus variólico y su adaptación para su uso en bombas y en mísiles interconti-

nentales. El programa tiene capacidad industrial para producir muchas toneladas de virus variólico anualmente. Más aún, Abilek comunicó que Rusia, incluso ahora tiene un programa de investigación que pretende producir cepas recombinantes que sean más virulentas y contagiosas. Puesto que el soporte financiero para los laboratorios ha disminuido bruscamente en estos últimos años, ha aumentado la preocupación de que los conocimientos (pericia, técnicos) puedan haber caído en manos no rusas.

Desde la erradicación de la viruela, el número de centros que conservan el virus se ha ido reduciendo de forma gradual. En la actualidad, sólo dos centros colaboradores de la OMS lo poseen: el Center for Disease Control (CDC) de Atlanta (Georgia-EE.UU), y el Instituto de Investigación Vektor en Novosibirsk, cerca de Kazajstán, a 6400 Km. al sureste de Moscú, en cuyo Instituto de preparaciones virales estuvo hasta 1994.[9]

Existe el temor de que a pesar de las barreras físicas y de los controles internos y externos, establecidos en Novosibirsk, algún trabajador se hubiese dejado sobornar dado su bajísimo salario (55 euros al mes), y que el virus de la viruela hubiese podido pasar a manos de terroristas o de países que los apoyan.

La deliberada reintroducción de la viruela puede ser un crimen internacional de impredecibles proporciones. La liberación de un aerosol de virus de la viruela puede diseminarse muy extensamente, dado que los ortophoxvirus son muy estables en aerosoles[10] y la dosis infecciosa es muy pequeña.[11]

Durante los años 60 y 70 en Europa, cuando la viruela era importada en el período de alta transmisión, entre diciembre y abril, se solían producir de 10 a 20 casos secundarios a partir de un único caso. Con brotes de poco más de 100 casos se producía pánico dando lugar a un amplio despliegue de medidas urgentes de control.[12]

La viruela supone un serio problema para la población civil por su elevada letalidad, 30% ó más entre personas no vacunadas, y por la carencia de tratamiento específico. La viruela ha sido siempre temida, como la más devastadora de las enfermedades infecciosas. Pues bien, su potencial devastador es actualmente mucho mayor que antes de su erradicación, ya que la mayoría de la población carece de inmunidad al haber-

se interrumpido la vacunación en muchos países hace más de 25 años. En una población ahora muy susceptible y móvil, la viruela puede extenderse muy rápidamente a través del país y del mundo.

La viruela es una enfermedad exclusivamente humana que se transmite de persona a persona a través de núcleos goticulares y aerosoles[13] expelidos de la orofaringe de personas infectadas, y por contacto directo También a través de fómites contaminados, como vestidos o ropa de cama.

El reservorio y fuente de infección es el hombre enfermo, siendo el período más infeccioso desde el inicio de la erupción hasta 7-10 días después (primera semana tras la erupción), cuando se forman las costras. El paciente deja de ser infeccioso cuando todas las costras se han desprendido, 3-4 semanas después del comienzo de la erupción.

Las primeras lesiones que aparecen son en la boca y en la faringe y se ulceran rápidamente debido a la ausencia de estrato córneo, liberando grandes cantidades de virus en la saliva.[14] Los títulos virales en la saliva son elevados durante la primera semana de la enfermedad correspondiendo con el período en el que los pacientes son más infecciosos. Aunque el virus, en algunos casos, puede ser detectado en un frotis de orofaríngе 5-6 días antes de que se desarrolle la erupción[14] la transmisión no ocurre durante este período. No se inicia hasta que las lesiones orofaríngeas se ulceran y se liberan grandes cantidades de virus a la saliva.

Aunque las costras contienen gran cantidad de virus viable, estudios epidemiológicos y de laboratorio indican que no son especialmente infecciosas presumiblemente a causa de que los viriones están fuertemente unidos en la matriz de fibrina.[15]

Se ha comprobado que persisten hasta tres semanas a 35-36 ºC y humedad relativa del 65%, y más incluso a más bajas temperaturas. A 26 ºC y elevada humedad relativa sobreviven 8 semanas y hasta 12 semanas cuando la humedad relativa es inferior al 10%. Se ha visto que el virus de la viruela puede persistir en las costras hasta 13 años.

En la contagiosidad también influye la forma clínica de la enfermedad. Son mucho más contagiosos los pacientes con formas clínicas graves o medias que los que padecen formas frustradas, gripales, faríngeas o varioloides, que eran más frecuentes en vacunados. Pero como pueden pasar desapercibidas y, por ello, sin que se aíslen los casos, suponen un mayor riesgo social.

Su velocidad de transmisión en la población es menor que la del sarampión o de la varicela. Los pacientes transmiten la viruela fundamentalmente a sus contactos domiciliarios y hermanos. No son frecuentes brotes de importancia en escuelas debido a que la transmisión del virus no ocurre hasta el comienzo de la erupción, y para entonces muchos pacientes están confinados en cama a causa de la alta fiebre y malestar de la fase prodrómica de la enfermedad. Por ello los contactos secundarios ocurren usualmente solo en aquellos que tienen contacto con los pacientes, usualmente en casa o en el hospital.

La supervivencia de los Orthopoxvirus en los aerosoles es inversamente proporcional a la temperatura y a la humedad[10] por ello la mayor incidencia de la enfermedad tenía lugar durante el invierno y comienzos de la primavera.

El virus de la vacuna liberado en un aerosol y no expuesto a radiación UV, puede sobrevivir 24 horas e incluso más en condiciones favorables. Cabe pensar que lo mismo ocurra con el virus de la viruela[16]. En una atmósfera con elevada temperatura (31-33 ºC) y humedad relativa (80%) se destruyen completamente en 6 horas, perdurando más tiempo (24 horas) cuando la temperatura (10-11 ºC) y humedad relativa (20%) son bajas.[16]

El virus es muy termolábil, pues se inactiva en 30-40 días a 18-20 ºC, en 48 horas a 36 ºC y en 20 minutos a 55-60 ºC. Resiste mucho a temperaturas bajas, conservándose dos años a –15 ºC e indefinidamente a –60 ºC. Es poco resistente a la luz solar, rayos ultravioleta y desecación (aunque la liofilización lo conserva). El pH óptimo es el de 7-8, conservándose peor a medida que se aleja de ese pH, sobre todo hacia el lado ácido. Muy lábil frente a los desinfectantes habituales, en especial el hipoclorito y los derivados del amonio cuaternario, indicados para la desinfección de superficies.

El virus se excreta por orina y si hay conjuntivitis, también por esta vía, siendo la eliminación más importante y duradera en los casos graves.

El personal que manipule la ropa de cama y la ropa sucia de los pacientes también tiene un riesgo muy importante de contagio, y la habitación donde ha estado el enfermo, en tanto no se desinfecte convenientemente, también puede suponer un medio de contagio.

Se han descrito transmisiones por cartas, y bolsas de algodón, lo cual pudiera tener importancia actualmente si se llegase a utilizar el virus varioloso para fines bioterroristas.

Es excepcional la transmisión por contactos del enfermo sin que ellos mismos, por estar vacunados, enfermen.

La distribución etaria de los casos depende primariamente del grado de susceptibilidad de la población. Actualmente, dado que prácticamente una gran parte de la población no tiene inmunidad, la distribución de casos seguiría la distribución por edades de la población.

En España la vacunación de la viruela era obligatoria. Fue la primera nación que decretó por Real Orden de 1815, la vacunación de los niños de modo obligatorio para poder ser admitidos en la escuela.

A partir de mediados de los años 70, del pasado siglo, disminuyó su utilización para finalmente, una vez erradica la enfermedad, suspenderse oficialmente. Por tanto, al menos las personas menores de 30 años (alrededor de 14 millones de 40) ya no fueron vacunadas de la viruela. Por otra parte el resto de la población que ha sido vacunada, al haber transcurrido más de 20 años, en su mayoría habrán perdido la inmunidad. Algunas estimaciones señalan que el 20% de las personas vacunadas podrían conservar inmunidad.

La duración de la inmunidad se basa en la experiencia de personas susceptibles expuestas de modo natural y nunca ha sido medida satisfactoriamente. Se ha señalado que los anticuerpos neutralizantes reflejan los niveles de protección, aunque esto no se ha validado sobre el terreno. Estos anticuerpos se ha visto que descienden substancialmente durante un período de 5-10 años.[17] Así, incluso aquellos que recibieron la recomendada única dosis de vacuna cuando niños no tienen inmunidad para toda la vida. Sin embargo, en un grupo que han sido vacunados al nacer y revacunados a los 8 y 18 años, como parte de un estudio, se ha visto que los niveles de anticuerpos neutralizantes permanecían estables durante un período de treinta años.[18] Dado que pocas personas han sido vacunadas con éxito en más de una ocasión, puede asumirse que la población en general es susceptible a la infección.

Recuerdo clínico

La infección natural ocurre tras la llegada del virus a la orofaringe o a la mucosa respiratoria. No se conoce la dosis infecciosa, pero se estima que es muy baja, solamente unos pocos viriones.[11]

Figura 1. *Paciente de Mozambique con viruela (1968) de la que se recuperó. Observación personal y cortesía del Profesor Henrique Lecour (Porto).*

El período de incubación tiene una duración de 12-14 días (con un rango de 7-17 días). Al final del mismo el paciente presenta fiebre alta, malestar y postración con dolor de cabeza. A veces se presenta dolor abdominal severo y delirio. Entonces aparece una erupción maculopapular sobre la mucosa de la boca y faringe, cara y antebrazos y se transmite al tronco y a las piernas. En uno o dos días la erupción se transforma en vesículas y después en pústulas característicamente redondas, tensas y profundamente incrustadas en la dermis (figura 1). Las costras comienzan a formarse al 8º-9º día de la erupción. A diferencia de la varicela las lesiones en cada área se encuentran en la misma fase de evolución.

Además de la forma clásica (90%) de los casos, hay otras formas difíciles de reconocer de la viruela, la viruela hemorrágica que es fatal y la viruela maligna, con una muy elevada letalidad. La mujer embarazada es inusualmente susceptible a la viruela hemorrágica.

Hay poca información sobre como responden a la viruela las personas inmunodeficientes, ya que esta enfermedad se erradicó antes de la aparición del VIH, pero es probable que la causa subyacente de algunos casos de viruela hemorrágica o de viruela maligna fuese una respuesta inmune defectuosa. La vacunación de personas inmunodeficientes resulta en una continuada extensión de la lesión primaria, viremia persistente e infección viral secundaria de muchos órganos. Hay un caso documentado en un soldado vacunado que tenía infección por VIH.[19]

La confirmación del diagnóstico se realiza en el laboratorio rápidamente por examen al microscopio electrónico del líquido de la vesícula o pústula o de las costras, visualizando el virus con la característica forma en ladrillo de 200 por 250μ. Los acúmulos de virus en las células infectadas forman los llamados cuerpos de Guarnieri, inclusiones intracitoplasmáticas de aproximadamente 10μ. de diámetro. Cuando ya se ha establecido que la epidemia está causada por el virus de la viruela, los casos típicos no requieren confirmación por el laboratorio.

La identificación y definitiva caracterización de los virus implica su crecimiento en cultivos celulares o en membrana corioalantoidea de embrión de pollo, y caracterización de la cepa por ensayos biológicos (PCR y RFLP: restriction fragment-length polymorphism).[20-21] Los últimos estudios pueden completarse en unas pocas horas.

PREVENCIÓN

Vacuna clásica

La vacuna clásica[22] es una vacuna atenuada que consta de linfa de ternera (o de carnero). El virus vacunal se cultiva sobre piel de ternera (o de carnero), y se recolecta la linfa, y la vacuna se conserva mediante liofilización. La vacuna americana (Wyeth DryVax®) se reconstituye con un diluyente que contiene 50% de glicerina, 0.25% de fenol y 0.005% de verde brillante.

Se inocula por vía intradérmica con una aguja bifurcada. La longitud de las dos puntas es tal que permite depositar la dosis vacunal en el cuerpo de Malpighio tras puncionar la piel. La cantidad de vacuna que se retiene entre las dos puntas es de unos 0,0025 ml. Tras sumergir la aguja bifurcada en la vacuna, se hacen entre 5 y 15 punciones rápidas, por lo general en la zona lateral y superior del brazo.

Su eficacia es elevada, superior al 90 %, y dura varias décadas, sobre todo en lo que respecta a evitar casos mortales.

De 3 a 5 días después de la administración de la vacuna se produce una pápula rodeada por un eritema, que más tarde se transforma en vesícula y, después, en pústula, alcanzando su tamaño máximo tras 8-12 días. Se forma una costra que se cae a las 2-3 semanas, y deja la típica cicatriz. Con frecuencia, la pústula va acompañada de fiebre ligera, adenopatías en la cadena linfática más próxima y sensibilidad. Los anticuerpos neutralizantes aparecen a los diez días de la primovacunación y a los siete tras la revacunación. El lugar de la inoculación debe ser inspeccionado a los 6-8 días para determinar si la vacunación ha prendido.

La vacuna puede ser administrada junto a otras inmunizaciones, sin interferir en la protección inducida de los restantes preparados. Esto se ha comprobado con las vacunas antipoliomielítica Sabin, BCG, fiebre amarilla, sarampión y DTP. No se dispone de datos sobre su administración junto a vacunas aparecidas más tarde por razones obvias.

Indicaciones

En situación normal la vacuna de la viruela sólo está recomendada para personal de laboratorio directamente relacionado con v. de la viruela o muy relacionado con ortopoxvirus[23-24]: personal de los laboratorios que trabajen con orthopoxvirus no variolosos (v. de la vacuna y v. de la viruela de los monos), y aquellos que trabajen en animalarios en los que se realicen estudios con orthopoxvirus. Estos trabajadores deben documentar evidencia de una vacunación satisfactoria frente a la viruela en los tres años precedentes. En 1991, se incluyeron también los trabajadores que participen en ensayos clínicos en los que se utilicen vacunas recombinantes con virus de la vacuna, y extendido la recomendación de revacunación cada 10 años

para las personas que trabajen con virus de la vacuna, virus de la vacuna recombinantes u otros orthopoxvirus no variolosos.[25]

No obstante, algunos países han vacunado en el pasado e incluso recientemente a sus ejércitos (en EEUU hasta 1990 y de nuevo en el 2002), por el peligro potencial del uso del virus de la viruela como arma biológica.

En caso de ataque bioterrorista está indicada en todos los expuestos.

Contraindicaciones

Cinco grupos de personas se consideran corrientemente como con especial riesgo de complicaciones tras la vacunación de la viruela: Personas con eccema u otro importante trastorno exfoliativo de la piel (acné, quemaduras, heridas, incisiones recientes, impétigo, dermatitis de contacto); pacientes con leucemia, linfoma o con cáncer generalizado que estén recibiendo tratamiento con agentes alquilantes, antimetabolitos, radiaciones o grandes cantidades de corticoides; pacientes VIH+ y personas con inmunodeficiencias hereditarias; mujeres gestantes, y personas con alergia a componentes de la vacuna (sulfato de polimixina B, sulfato de estreptomicina, hidroclorhidrato de clortetraciclina, sulfato de neomicina. En situación normal, a estas personas con contraindicaciones no se les administrará la vacuna.

Durante una emergencia de viruela, si ha habido exposición al virus de la viruela (contacto próximo con un paciente con viruela), no hay contraindicaciones para la vacuna ya que el riesgo de complicaciones de la viruela es mucho mayor que el de las complicaciones de la vacuna. Si se dispone de IGV se le administrará junto con la vacuna a una dosis de 0.3 ml/kg de peso corporal para prevenir las complicaciones. En cualquier caso, aunque no se disponga de IGV, se recomendará la vacunación. Si no ha habido exposición se mantienen las mismas contraindicaciones que en las situaciones de no emergencia.

Complicaciones

Las complicaciones ocurren más frecuentemente entre los primovacunados. En la tabla 4 se exponen las complicaciones ocurridas en EEUU en 1968, con la vacuna elaborada con la cepa New York Board Health.[26]

Podemos clasificarlas en leves y graves. Las complicaciones leves comprenden el eritema multiforme, la infección estreptocócica o estafilocócica de la lesión vacunal, la autoinoculación en diferentes lugares como la cara, párpados, boca, genitales, etc, y la transmisión a contactos íntimos. Muchas lesiones curan sin problemas, aunque la IGV fue utilizada en algunos casos de implantación periocular.

Las complicaciones graves podemos subdividirlas en menos graves (vacuna generalizada y eccema vacunal) y más graves (encefalitis postvacunal y vacuna progresiva. De estas, la vacuna generalizada (1/50.000) y el eccema vacunal son las más frecuentes.

TABLA 4

Complicaciones de la vacunación en EEUU (cepa NYBH). Año 1968. Datos de vigilancia del CDC

	Primovacunación (*)	*Revacunación*	*Contactos*	*Total*
Complicaciones (nº de casos):	5.594.000	8.574.000		14.168.000
— Encefalitis	16(4)	0	0	16(4)
— Vacuna progresiva	5(2)	6(2)	0	11)4)
— Eccema vacunal	58	8	60(1)	126(1)
— Vacuna generalizada	131	10	2	143
— Infección accidental	142	7	44	193
— Otras	66	9	8	83
Total	**418**	**40**	**114**	**572**

Fuente: Lane JM, Ruben Fl, Neff JM, Millar JD. Complications of smallpox vaccination, 1968: national surveillance in the United States. N Engl J Med 1969; 281: 1201-8

Entre paréntesis las muertes atribuibles a la vacunación.

(*): Se incluyen 31 pacientes con estado vacunal desconocido.

La vacuna generalizada es una erupción secundaria que se produce casi siempre después de la primovacunación, y es debida a la diseminación hemática del virus. Las lesiones aparecen entre el 6º y el 9º día tras la vacunación y pueden ser pocas en número o generalizadas. Esta complicación es usualmente autolimitada. En los casos severos debe administrarse IGV.

El eccema vacunal ocurre en algunos vacunados y sus contactos con eccema activo o curado. Las lesiones se extienden y cubren toda o parte del área corrientemente afectada por el eccema. En ocasiones es una complicación seria. La IGV es terapéutica.

La encefalitis postvacunal aparece entre los 8 y 15 días tras la vacunación. Ocurre con una tasa de 1/300.000 vacunaciones y se ha observado solo en primovacunados. La cuarta parte de los casos fueron fatales y algunos quedaron con lesiones neurológicas permanentes.

La vacuna progresiva ocurre tanto en primovacunados como en revacunados. Es una complicación generalmente letal en aquellos que tenían inmunodeficiencias. La lesión vacunal no cicatriza y progresa afectando la piel adyacente con necrosis tisular, transmitiéndose a otras partes de la piel, huesos y vísceras. Para el tratamiento se ha utilizado con éxito en un soldado con SIDA IGV y ribavirina.[26]

No se ha comprobado que sea teratógena ni que aumente la frecuencia de abortos o de recién nacidos muertos, pero se ha comprobado vacuna fetal en algunos casos.

TABLA 5

Preparación para situaciones de urgencia en la Unión Europea

- Mejorar la capacidad de coordinación de la UE en materia de preparación ante situaciones de urgencia.
- Coordinar la evaluación de las necesidades colectivas explotando la experticia de los Estados miembros.
- Reforzar y desarrollar más las capacidades de respuesta rápida.
- Mejorar la capacidad de análisis (laboratorios) y los sistemas de vigilancia y alerta.
- Desarrollar medios de comunicación claros y con autoridad.
- Reforzar la formación de los profesionales de primera línea de atención urgente(médicos, veterinarios, farmacéuticos).
- Prever el reparto de la carga de medios logísticos onerosos.
- Coordinar la cooperación internacional con organizaciones y países colaboradores (OMS, OCDE, EEUU)

Disponibilidades actuales de vacuna

Las cantidades existentes de vacuna son muy limitadas y totalmente insuficientes para hacer frente a una epidemia masiva como vamos a comentar.

EEUU dispone de 6 a 7 millones de dosis[27] (otras fuentes hablan de 12-15 millones de dosis)[28] para 260 millones de ciudadanos. Recientemente se ha descubierto la existencia de gran cantidad de vacuna almacenada de la que no se tenía noticia y también la posibilidad de diluirla y de multiplicar por tanto el número de dosis vacunales. Dicha vacuna, que está bajo el control del CDC, fue fabricada en 1970 por el Laboratorio Wyeth en ternera con la cepa de la Oficina de Salud de Nueva York y tras su purificación fue liofilizada y envasada en viales de 50 dosis, y está almacenada a -20ºC.

Otros países (Canadá 365.000 dosis[28] Francia, etc,) también tienen algunas reservas. La OMS tiene 500.000 dosis[29].

Debido a las pequeñas cantidades de vacuna disponibles, un programa de vacunación preventiva para proteger a determinados colectivos como el personal de servicios de emergencias y el personal sanitario, no es una opción en este momento. Si en algún momento se dispusiese de una cantidad mayor de vacuna, en la decisión de vacunar a un sector de la población habría que sopesar los riesgos de las complicaciones de la vacunación frente al riesgo de contraer la viruela.

Un último impedimento para una vacunación extensa es la todavía más limitada disponibilidad de inmunoglobulina frente al virus de la vacuna (IGV), también conservada en EEUU por el CDC, recomendada para el tratamiento de las reacciones cutáneas severas tras la vacunación, o para administrarla conjuntamente con la vacuna en las personas con riesgo de complicaciones[30]. Se ha estimado que por cada millón de personas vacunadas unas 250 sufren reacciones adversas que requieren la administración de IGV.[27]

Hoy en día ningún país puede protegerse completamente en caso de una gran epidemia. En el brote ocurrido en Yugoslavia, en febrero de 1972, que comentaremos más adelante, se vacunaron 20 millones de personas, a pesar de tratarse de una población vacunada.[31] Hoy se estima que

serían necesarios 40 millones de dosis para hacer frente en un primer momento a la aparición de un caso de viruela.[27, 32]

Vacunas de Segunda Generación

Las disponibilidades actuales de vacuna de la viruela se limitan a los depósitos fabricados en los años 70. Laboratorio Wyeth dejó en 1983 de fabricarla para uso general.[33] La amenaza de un ataque bioterrorista que utilice el virus de la viruela aconsejan producir una nueva vacuna, moderna con menos efectos secundarios, y en cantidades suficientes para hacer frente a cualquier eventualidad en caso de que la amenaza se materializase.

Los métodos previos de producción ya no están disponibles y hoy tampoco serían aceptables, entre otras razones porque son propensos a la contaminación con bacterias y otros agentes extraños, y con antígenos y alergenos, de las proteínas animales acompañantes, que pueden producir sensibilización alérgica.

Hay que desarrollar una nueva vacuna frente a la viruela utilizando un substrato celular para su crecimiento, evaluando su eficacia y seguridad por comparación directa con la vacuna antigua en adecuados modelos animales, mediante métodos de determinación de la inmunidad humoral y celular e indicadores cutáneos de éxito de la vacunación.[34]

La preparación de una nueva vacuna frente a la viruela plantea tres grandes cuestiones:[34] ¿Qué cepa utilizar? ¿Cuál debe ser el substrato celular? y ¿Cómo probar su seguridad e inmunogenicidad?

1. ¿Qué cepa utilizar?

Durante la campaña de erradicación de la viruela se usaron vacunas derivadas de diversas cepas vacunales (15 cepas principales y algunas otras más). En EEUU se utilizaron las cepas N York City linfa de ternera y N York City membrana corioalantoidea, ambas derivadas de la cepa N York City Board Health. En la antigua URSS se usó la cepa EM-63. En China la cepa Templo de Heaven. En Europa y en otras partes del

mundo se usó ampliamente la cepa Lister o Elestree, preparada en piel de carnero. Cepa que parece causar menos efectos secundarios que las otras cepas vacunales, y que fue distribuida por el Centro de Referencia Internacional de la OMS a los laboratorios de producción, siendo la cepa más utilizada en el mundo de 1968 a 1971.[11] Todas las cepas utilizadas fueron efectiva para eliminar la enfermedad.

Desde un punto de vista científico y de una perspectiva normativa, muchas cepas de las vacunas de la viruela pueden ser adecuadas para fabricar una nueva vacuna siempre y cuando el fabricante pueda demostrar que la nueva vacuna es segura, prende y produce una respuesta inmune análoga a la de la vacuna autorizada.

El problema de la elevada prevalencia de población inmunodeprimida exige fabricar una vacuna con una cepa atenuada que no pueda diseminarse en los huéspedes inmunodeprimidos.

Una cepa candidata es la LC16m8, cepa atenuada desarrollada por Japón en 1975 para la primovacunación, deriva de la cepa Lister, tras 36 pases a través de células primarias de riñón de conejo a baja temperatura (30ºC).[35-36] Esta cepa tiene una tasa de prendimientos del 95% en comparación con el 93.7% de la cepa Lister; la frecuencia de fiebre fue del 7.7% frente al 26.6% de la Lister, y baja neurovirulencia en un experimento en monos. La bajas tasas de fiebre y de neurovirulencia son consideradas indicaciones de que es una vacuna segura.[37] En los primeros 30.000 vacunados no se observaron complicaciones severas; el título de anticuerpos y el tamaño de la induración fueron menores que con la cepa Lister[36,] sin embargo, el efecto de su menor inmunogenicidad sobre la capacidad de esta vacuna para proteger frente a la infección por el v. de la viruela es desconocida, puesto que la vacuna nunca se ha usado en una región endémica.

Otra cepa candidata es la MVA (Modified Vaccinia Ankara), una de las cepas más atenuadas, con más de 570 pases en fibroblastos de embrión de pollo. Es incapaz de infectar células humanas y de otros mamíferos. Ha sido preparada por Anton Mayr.[38] No forma lesión pustulosa en el lugar de la inoculación y no se observaron reacciones adversas en los ensayos clínicos en personas de alto riesgo con lesiones cutáneas.[39] Se sabe que no se disemina en ratones neonatales irradiados, pero nunca se administró a personas VIH+ ni a macacos con infección por SIV pree-

xistente.[40] Debido a su menor reactogenicidad se usó para la primovacunación en regiones donde la viruela no era endémica. La vacuna es segura y con ella se vacunaron más de 120.000 personas en Turquía y Alemania hacia el fin de la campaña de erradicación.

2. Substrato celular

Los substratos celulares candidatos para una nueva vacuna de la viruela comprenden las líneas celulares continuas o cepas de células diploides de origen humano o animal.

La FDA ha autorizado vacunas de virus vivos como la de la varicela o la rubéola, preparadas en substratos de células diploides (MRC-5, WI-38). Recientemente MRC-5 fue utilizado como substrato en la preparación de una vacuna de viruela experimental en fase 1.[41]

Otra cepa de células diploides, FrhL-2 también ha sido usada como substrato celular para una vacuna de rotavirus y otras vacunas de virus vivos testadas en ensayos clínicos en humanos.[34]

La línea celular continua Vero, también se ha usado para preparar la vacuna inactivada de la polio autorizada en EEUU, y aunque la FDA no ha autorizado ninguna vacuna viva fabricada en una línea celular continua, la experiencia internacional con las células Vero sugiere que puede ser un adecuado substrato para una vacuna de la viruela.[42]

Una nueva vacuna de la viruela idealmente no debe ser menos inmunógena que la vacuna antigua. Las propiedades de un amplio rango de *Poxviridae*, virulencia y composición del genoma se ha visto que cambian después de muchos pases en cultivos celulares. Para mantener las propiedades de la nueva vacuna de la viruela, el número de pases en el cultivo celular debe reducirse al mínimo.

Por otra parte el substrato celular debe ser ampliamente analizado para descartar contaminaciones virales exógenas y endógenas. Deben describirse las medidas para eliminar, inactivar o prevenir su contaminación de cualquier agente extraño presente en el substrato celular. Cuando sea aplicable, deben realizarse estudios cuidadosamente diseñados de eliminación viral con diferentes métodos de inactivación o de eliminación de

virus en el mismo proceso de producción para lograr la máxima eliminación viral, y comprobar que se ha logrado dicha inactivación y eliminación viral.

3. Estudios sobre seguridad e inmunogenicidad

Los ensayos clínicos sobre la seguridad e inmunogenicidad de las nuevas vacunas frente a la viruela plantean algunas dificultades como el demostrar que generan una respuesta inmune protectora, en los ensayos en fase 1, y la imposibilidad de realizar estudios de eficacia clínica a gran escala, dado que no hay actualmente ninguna población con riesgo de infección natural por virus de la viruela. También es necesario definir planes para obtener datos adecuados sobre seguridad en especial referente a su uso pediátrico.

El tema de proporcionar substancial evidencia de eficacia cuando los tradicionales estudios de eficacia en humanos no pueden realizarse es un asunto que concierne a las Agencias gubernamentales como es el caso de la FDA en EEUU. En relación con este asunto la FDA ha publicado y requerido comentarios sobre una propuesta de norma sobre estudios de eficacia de nuevas drogas y productos biológicos frente a substancias tóxicas letales o que producen discapacidad permanente[43] proponiendo estudios apropiados en animales. El amplio rango de huéspedes de los poxvirus puede potencialmente llevar a la exploración de un modelo de viruela de los monos.

Vacuna de la viruela Baxter/Acambis[44]

A raíz del contrato subscrito con el CDC por Acambis en el año 2000, con el compromiso de suministrarle 54 millones de dosis de vacuna de la viruela, llevó a su unión con Baxter, laboratorio con amplia experiencia en el uso de líneas celulares en la fabricación de vacunas, al objeto de fabricar una nueva vacuna de la viruela. Firmando en diciembre de 2001 un contrato con el US Department of Health and Human Services, para la fabricación de más de 155 millones de dosis de su nueva vacuna de la viruela.

Para la preparación de la nueva vacuna Baxter/Acambis, se utilizó la cepa Acam, derivada de la cepa Oficina de Sanidad de la Ciudad de Nue-

va York (cepa de la vacuna DryVax® de Wyeth). Esta cepa había mostrado, en estudios en primates y en ratones, ser superior, en cuanto a producción de anticuerpos neutralizantes, a la cepa de la vacuna DryVax®, siendo tan segura como esta en cuanto a neurovirulencia y al menos tan inmunógena.

Para su preparación se utilizaron células Vero, tecnología recientemente autorizada en Holanda al aprobarse la vacuna de la gripe de Baxter PrefluCel® fabricada con dicha tecnología.

Actualmente está disponible dentro del Programa de Nuevas Drogas en Investigación de EEUU.

Inmunoglobulina antivariolosa

Se obtenía de reclutas hiperinmunizados y se administraba en las personas con riesgo de complicaciones junto con la vacuna para prevenir los efectos secundarios o para su tratamiento, así como en los contactos de los casos de viruela.

En la prevención de complicaciones se administraba con la vacuna a dosis de 0.3 ml/Kg y en el tratamiento de las complicaciones de la vacuna (vacuna progresiva, eccema vacunal, vacuna generalizada grave e infecciones perioculares), se administraba intramuscularmente a dosis de 0.6mL/Kg de peso repartido en varias dosis en un período de 24-36 horas, pudiendo repetirse si no ha habido mejoría y se considera necesario después de 2-3 días. Está contraindicada para el tratamiento de la queratitis vacunal y no tiene efecto sobre la encefalitis postvacunal.

Los datos sobre la eficacia de la inmunoglobulina antivariolosa (IGV) en determinadas situaciones son limitados: En un ensayo realizado en Madras (India) en contactos domiciliarios se observó una eficacia del 70% en la prevención de la viruela natural.[45] En otro estudio en más de 106.000 reclutas se observó efecto preventivo de la encefalitis postvacunal.

Actualmente se conservan cantidades limitadas de IGV, lo que llevó al CDC a contratar con Cangene la fabricación de 100.000 dosis en un período de cinco años.[44]

Cangene ha preparado C-VIG a partir de plasma de donantes de EEUU revacunados con la vacuna de la viruela. Dicho plasma ha sido testado para VIH 1 y 2, VHC, HBsAg, ALT, VHB, VHA y parvovirus B19 y sometido a los procedimientos actuales de eliminación e inactivación de virus. Se administra por vía intravenosa, y está disponible dentro del Programa de Nuevas Drogas en Investigación en EEUU.[44]

Se sugiere la administración de 6.000 U/ Kg de peso, por vía intravenosa, para el tratamiento o prevención de efectos secundarios de la vacuna.[44]

Antivirales

Aunque ningún tratamiento antiviral ha sido aprobado para el tratamiento de las infecciones por el virus de la vacuna u otros poxvirus, incluido el de la viruela, algunos antivirales han demostrado, en estudios en animales, ser activos frente a estos virus, en particular el Cidofovir® un análogo de los nucleosidos, inhibidor de la DNA-polimerasa, desarrollado para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus. Se ha mostrado activo para prevenir la infección por el v. de la viruela en cultivos celulares y protege al ratón frente a una exposición letal[46-47] y se ha sugerido la posibilidad de que puede ser útil para prevenir la infección por el virus de la viruela si se administra en el 1º o 2º día después de la exposición.[27] De todos modos, hasta la fecha no hay evidencia de que el cidofovir sea más efectivo que la vacunación en ese temprano momento. Mas aún, la potencial utilidad de esta droga es limitada, teniendo en cuenta el hecho de que debe ser administrada intravenosa y su uso siempre se acompaña de toxicidad renal seria.[48]

Otras posibilidades son la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales humanizados o fragmentos de anticuerpos producidos en animales.[34]

Es necesario también, desarrollar un test diagnostico sencillo y rápido que permita identificar el virus de la viruela en la orofaringe durante la fase prodrómica o tempranamente en la fase exantematosa de la enfermedad.[27]

Control post-exposición

La amenaza de la viruela persiste y el mundo está desprotegido y desprevenido. La declaración de la erradicación de una enfermedad no la relega a la historia. Solo un esfuerzo internacional concertado de vigilancia epidemiológica e intervención rápida y de reposición de los suministros de vacuna e IGV ofrecerá una medida razonable de seguridad frente a una epidemia de proporciones desconocidas.[31]

Los CDC están preparando equipos formados por médicos, epidemiólogos y trabajadores de laboratorio, que han sido vacunados contra la viruela y están asistiendo a cursos de entrenamiento de preparación en los CDC para identificar y contener epidemias de viruela.[49]

En el ámbito de la UE, el Consejo Europeo celebrado el 19 de octubre de 2001 en Gante, invitó a la Comisión a preparar un programa con vistas a mejorar la cooperación entre los Estados miembro en materia de evaluación de riesgos, alerta e intervención, almacenamiento de materiales y equipamiento, así como detección e identificación de los agentes infecciosos y tóxicos, incluida la prevención y el tratamiento de los ataques químicos y biológicos. Las dos partes actuales de la red: el despistaje de enfermedades y la alerta rápida, ya establecidas en la UE deben completarse con una tercera: la preparación para situaciones de urgencia.[50] (Tabla 6).

TABLA 6

Objetivos del Plan común del G-7 y la UE para mejorar la seguridad sanitaria frente a las amenazas del bioterrorismo

— Examinar las posibilidades de colaboración para el aprovisionamiento en vacunas y antibióticos.
— Diálogo constructivo sobre:
— puesta a punto de test diagnósticos rápidos.
— investigación de nuevas vacunas.
— Marcos normativos respectivos para la elaboración de vacunas, sobre todo antivariólicas
— Incrementar el apoyo a la red de vigilancia epidemiológica de la OMS
— Participar los planes de preparación ante situaciones de urgencia.
— Colaboración internacional para la evaluación y gestión de riesgos.

— Mejorar la relación entre los laboratorios (nivel 4).

— Cooperación en materia de preparación y respuesta frente a incidentes químicos y nucleares

— Participar:

  — los datos de vigilancia de los laboratorios nacionales de salud pública

  — las informaciones sobre contaminaciones de agua y alimentos

  — las informaciones sobre estrategias de reducción de riesgos para garantizar la seguridad del aprovisionamiento alimentario.

El 7 de noviembre de 2001 se reunieron en Ottawa, los Ministros y Secretarios de Estado de los países del grupo de los 7 (Canadá, EEUU, Japón, Alemania, Reino Unido, Francia, Italia), México, y el Comisario Europeo de Salud y Protección de los Consumidores, David Byrne, al objeto de establecer un plan común para mejorar la seguridad sanitaria frente a las amenazas potenciales del bioterrorismo. Señalaron la imperiosa necesidad de reforzar inmediatamente la preparación para situaciones de urgencia en todos los países y mejorar eficazmente los mecanismos comunes de alerta precoz y de respuesta. El terrorismo, sobre todo el biológico, es un problema internacional que demanda una respuesta internacional. Una epidemia de viruela que se declare no importa en que lugar del mundo, es un peligro para todos los países, siendo la colaboración internacional indispensable. Acordaron establecer un nuevo marco de colaboración para tratar la delicada cuestión de la protección de la salud y la seguridad públicas, figurando entre sus objetivos, en los primeros lugares, examinar las posibilidades de colaboración para el aprovisionamiento en vacunas y antibióticos y establecer un diálogo constructivo sobre investigación de nuevas vacunas y sobre los marcos normativos respectivos para elaboración de vacunas, sobre todo antivariólica.[51] (Tabla 7).

Vigilancia epidemiológica

La vigilancia epidemiológica es fundamental. Es preciso alertar y formar a los profesionales sanitarios sobre los aspectos clínicos y diagnósticos de la enfermedad y la importancia de la declaración urgente de cualquier caso sospechoso. También hay que tener previstos los medios para la confirmación del caso.

Entre la liberación de un aerosol con virus de la viruela y el diagnóstico del primer caso transcurren como mínimo dos o más semanas, dado que su período de incubación es de 12-14 días y deben pasar unos días más para que la erupción sea lo suficientemente diferente para sugerir el diagnóstico de viruela. En la práctica el tiempo será seguramente mayor.

En el brote ocurrido en Yugoslavia en febrero de 1972[31] por un peregrino que regresó a su hogar desde la Meca con fiebre, tardaron cuatro semanas en saber que se estaban enfrentando a la viruela, y eso que todavía no se había logrado su erradicación mundial.

El factor de expansión se estima en 10 a 20 veces o más en cada generación de casos.[9, 11] En el brote de Yugoslavia antes mencionado[32] dos semanas después de regresar el peregrino enfermo, 11 de sus amigos y miembros de la familia desarrollaron fiebre y exantema. Uno de ellos, un maestro de treinta años, se encontraba en estado grave con petequias en la piel y mucosas, fue tratado en la clínica local, trasladado a un hospital urbano, y trasladado de nuevo a la sala de un hospital de la capital. En el momento en que falleció sin un diagnóstico, el maestro había infectado a 38 individuos, incluyendo dos médicos, dos enfermeras y dos trabajadores del hospital. En las cuatro semanas desde que por primera vez el peregrino experimentó fiebre, tiempo que como dijimos tardaron los médicos y autoridades sanitarias en saber que se estaban enfrentando a la viruela, 150 individuos se infectaron en todo el país.

Una campaña masiva de salud pública limitó los estragos. Fueron vacunados 20 millones de individuos, 10.000 contactos conocidos fueron puestos en cuarentena durante, al menos, dos semanas, y las naciones vecinas cerraron sus fronteras. No obstante, contrajeron la viruela 175 individuos y en el brote de nueve semanas fallecieron 35. Estos acontecimientos tuvieron lugar en una población vacunada adecuadamente.[31]

Aislamiento de casos sospechosos

En cuanto se realice el diagnóstico de un caso de viruela, todos los sujetos en los que se sospeche la enfermedad, deben aislarse inmediatamente. Siempre que sea posible en el domicilio o en otro centro, evitando el hospital, dada su gran transmisibilidad, o dedicando un hospital o un pabellón exclusivamente para estos enfermos.

Vacunación

Si la vacuna se administra en los primeros días después de la exposición y quizás como muy tarde hasta el 4º día, puede prevenir o reducir de modo significativo la gravedad de la enfermedad. Está por ello indicado poner en marcha un programa de vacunación empezando por las personas que han estado expuestas a la liberación inicial de virus, y aquellas otras que han tenido contacto cara a cara, o contacto próximo (menos de 2 metros) con un caso confirmado o sospechoso de viruela en algún momento desde el comienzo de la fiebre hasta que todas las costras se han desprendido. Además se les someterá a vigilancia.

Simultáneamente se realizará la vacunación en círculo de toda la población del entorno de los casos y de diferentes colectivos con mayor riesgo de exposición, tales como:

— Personal sanitario de clínicas y hospitales que puedan recibir pacientes: personal involucrado en la atención médica, cuidado y transporte de los pacientes confirmados o sospechosos de viruela; personal de laboratorio involucrado en la recogida y procesamiento de especimenes clínicos de pacientes sospechosos o confirmados de viruela, y otras personas que tengan una mayor probabilidad de contactar con materiales infecciosos de un paciente de viruela, como el personal encargado de la recogida de residuos; de hacer las camas y recoger la ropa sucia, y de desinfectarla y lavarla, y de la limpieza y desinfección de las habitaciones, en el centro donde se atienda a pacientes con viruela.

— Personal de servicios de emergencia esenciales como: policía, bomberos, transportes, personal de salud pública y personal de gestión de emergencias.

— Personal de mortuorios y funerarias que puedan manejar cadáveres.

En la medida de lo posible se procurará asignar para la atención de los enfermos a aquellas personas que hayan sido vacunadas en el pasado, mejor incluso si habían sido revacunadas, a las que se les vacunará de nuevo lo antes posible, dado que las personas que han sido vacunadas en el pasado posiblemente muestren una respuesta inmune acelerada.

En la atención de los enfermos se adoptarán precauciones de aislamiento de contacto y aéreo (batas, guantes, gafas o pantallas faciales, respiradores FFP3 y calzas para evitar el transporte del virus fuera del área), al menos hasta que se demuestre la existencia de inmunidad postvacunal (6-8 días tras la vacunación).

Es importante localizar, con discreción a todos los contactos de los pacientes, para asegurar, con la extensión que sea posible, que la vacunación y la adecuada vigilancia se ha aplicado a todos aquellos con mayor riesgo.

Se entiende por contacto a los que viven en la misma casa del sujeto infectado o que han tenido un contacto cara a cara con el paciente después del comienzo de la fiebre (los pacientes no transmiten hasta después de la fase prodrómica de la enfermedad, cuando ha comenzado la erupción.

El aislamiento de los contactos puede ser difícil y en la práctica es innecesario. Lo que deben hacer es controlarse diariamente la temperatura, preferiblemente al atardecer. Cualquier aumento superior a 38ºC durante los 17 días que siguen a la exposición al caso, puede sugerir el desarrollo de la viruela[11] y ser causa para el aislamiento inmediato hasta que se confirme o descarte el caso. Todos los contactos íntimos de los pacientes deben ser inmediatamente vacunados.

Si se presume que el contacto no va a colaborar observando las normas, debe establecerse, a través de la autoridad sanitaria (Real Decreto de Medidas Especiales en Salud Pública de 1986) su cuarentena forzosa.

Desinfección

Para la desinfección de superficies se utiliza el hipoclorito y los derivados del amonio cuaternario.

La ropa de cama de los enfermos y cualquier otra contaminada se tratará en autoclave o se lavará con agua caliente (95 ºC) a la que se ha añadido lejía.

Prevención de la transmisión por contacto del virus vacunal

Desde los días 2-5 y hasta los 14-21 tras la vacunación, en que caen las costras, el virus vacunal puede transmitirse a otra área o a otra persona, a través del contacto con la lesión vacunal, debiendo por tanto adoptarse medidas especiales para evitarlo.

Dichas medidas consisten en cubrir el lugar de la vacunación con un apósito poroso (hipoalérgico en personas con hipersensibilidad) hasta que se desprendan las costras. No debe utilizarse un vendaje oclusivo de modo rutinario para evitar que se produzca la maceración de la lesión vacunal. Los apósitos se cambiaran cada 1-2 días.

El sitio vacunal debe mantenerse seco, aunque se puede seguir duchando. No se aplicaran cremas ni ungüentos. Los desechos de las curas y las costras deben recogerse en bolsas de plástico y eliminarse como residuos biosanitarios especiales. Las ropas y otro material contaminado se descontaminará mediante los procedimientos rutinarios de lavado a 95 ºC en agua con lejía.

Especiales medidas de precaución adoptará el personal sanitario recién vacunado para evitar la transmisión a los pacientes no vacunados, en particular a aquellos aquejados de inmunodeficiencias.

Si no puede evitarse el contacto continuo con pacientes no vacunados, se cubrirá el sitio vacunal con un apósito más oclusivo del tipo de los apósitos semipermeables de poliuretano y se extremaran las medidas de lavado de manos.[52]

BIBLIOGRAFÍA

(1) GESTAL OTERO, J. J. (1997) Enfermedades Infecciosas Emergentes. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia. Dirección Xeral de Saúde Pública. Documentos Técnicos de Saúde Pública. Serie B nº 12.

(2) STEARN, E. W.; STEARN, A. E. (1945) The effect of smallpox on the destiny of the amerindian. Boston, Mass: Bruce Humphries.

(3) CDC. Casos confirmados y exposiciones a ántrax en seres humanos a niveles Local, Estatal y Federal. Comunicado de Prensa, 4 de noviembre de 2001.

(4) (*http://www.cdc.gov/spanish/esmedia/antraxupdt10.htm*)

(5) STERN, J. (1999) *The prospect of domestic bioterrorism*. Emerg Infect Dis; 5(4): 517-22.

(6) CHRISTOPHER, G. W.; CIESLAK, TH. J.; PAVLIN, J. A.; EITZEN, E. M. (1997) *Biological warfare. A historical perspective.* JAMA; 278 (5): 412-417.

(7) Biological and Chemical Terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response. Recomendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. MMWR 2000; 49: RR4.

8) Kenneth Abilek's prepared statement before the Joint Economic Committee, United States Congress. Terrorist and Intelligence operations: potential impact on the US economy on World Wide Web URL: *http://www.house.gov/jec/hearings/intell/abilek.htm*

(9) ABILEK, K.; (1999) Biohazard. New York: Random House Inc.

(10) Éradication de la variole: Destruction des stocks de virus variolique. Relevé des maladies transmisibles au Canada 2002; 28-05 (*http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/02vol28/rm2805fb.html*)

(11) HARPER, G. J. (1961) *Airborne micro-organisms: survival test with four viruses.* J Hyg.;59:479-486.

(12) WEHRLE, P. F.; POSCH, J.; RICHTER, K. H.; HENDERSON, D. A. (1970); *An airborne outbreak of smallpox in a German hospital and its significance with respect to other recent outbreaks in Europe.* Bull World Health Organ.; 43:669-679.

(13) FENNER, F.; HENDERSON, D. A.; ARITA, I.; JEZEK, Z.; LADNYI, I. D.; (1988) Smallpox and Its Eradication. Geneva, Switzerland: World Health Organization:1460.

(14) US Congress. Biological testing involving human subjects by the Department of Defense, (1977): Hearings before the Subcommittee on Health and Science Research of the US Senate, 95th Cong, 1st Sess. Washington, DC: US Congress; march 8 and May 23.

(15) SARKAR, J. K.; MITRA, A. C.; MUKHERJEE, M. K., (1973) *De SK.* Vi- rus *excretion in smallpox, 2: excretion in the throat of houschold contacts.* Bull World Health Organ; 48:523-527.

(16) *Rao AR. Infected inanimate objects (fomites) and their role in transmission of smallpox*. (1972) Geneva, Switzerland: World Health Organization; WHO/SE/72.40.

(17) HARPER, G. J.;(1961) *Airborne micro-organisms: survival test with four viruses.* J Hyg; 59: 479-486.

(18) DOWNIE, A. W.; MCCARTHY, K.;(1958) *The antibody response in man following infection with viruses of the pox group, III: antibody response in smallpox.* J Hyg.;56:479-487.

(19) El-Ad, R.; Roth, Y.; Winder, A.;(1990). *The persistence of neutralizing antibodies after revaccination against small-pox.* J Infect Dis.;161:446-448.

(20) Redfield, R. R.; Wright, C. D.; James, W. D.; Jones, S. T.; Brown, C.; Burke, D.;(1987) *Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV).* N Engl J Med.;316:673-676.

(21) Ropp, S. L.; Knight, J. C.; Massung, R. F.; Esposito, J. J.;(1995) *PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses.* J Clin MicrobioL; 33:2069-2076.

(22) Esposito, J. J., Massung, R. F.;(1995) *Poxvirus infections in humans.* In: Murray PR, Tenover F, Baran EJ (eds). Clinical Microbiology. Washington, DC: American Society of Microbiology;1131-1138.

(23) CDC.(2001) Vaccinia (smallpox) vaccine. Recomendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP),. MMWR (2001); 50 (No. RR-10)

(24) National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 1st ed. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, (1984;66). DHHS publication no. NIH 88-8395.

(25) CDC (1983). Smallpox vaccine available for protection of at-risk laboratory workers. MMWR; 32:543.

(26) CDC. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). MMWR (1991); 40(RR-14): 1-10. Erratum: MMWR (1992); 41:31.

(27) CDC (1980) Smallpox vaccine: recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). MMWR -29:417-20.

(28) Henderson, D. A.; Inglesby, Th. V.; Bartlett, J. G.; Ascher, M. S.; Eitzen, E.; Jahrling, P. B.;(1999) et al. *Smallpox as a biological weapon. Medical and public health management.* JAMA; 281 (22): 2127-37.

(29) Comité Consultatif National de l'Immunisation. Declaration sur la vaccination antivariolique. Relevé des Maladies Transmissibles au Canada; (2002); 28 DCC-1(*http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/02vol28/28sup/dcc1.html*)

(30) World Health Organization. Smallpox vaccine and seed virus survey. Working document for the meeting of the WHO Ad Hoc Expert Committee on Orthopoxvirus lnfections; January 14-15,(1999); Geneva, Switzerland.

(31) Sharp, J. C. M.; Fletcher, W. B.;(1973) *Experience of antivaccinia immunoglobulin in the United Kingdom.* Lancet.;1:656-659.

(32) Editorial. ¿Es historia la viruela?. Lancet en español (1999); 35 (3): 107.

(33) Meltzer, M. I.; Damon, I.; LeDuc, J. W.; Millar, J. D.; (2001) Modeling potential responses to smallpox as a bioterrotist weapon. Emerg Infect Dis; 7(6).

(34) (*http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no6/meltzer.htm*)

(35) CDC. (1983) Smallpox vaccine no longer available for civilians-United States. MMWR; 32: 387.

(36) ROSENTHAL, S. R.; MERCHLINSKY; KLEPPINGER, C.; GOLDENTHAL, K. L.; (2001) Developing new smallpox vaccines. Emer Infect Dis 7(6).(*http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no6/rosenthal.htm*)

(37) SUGIMOTO, M.; YAMANOUCHI, K.(1994) *Characteristics of a attenuated vaccinia virus strain, LC 16m8, and its recombinant virus vaccines. Vaccine*; 12:675-81.

(38) HASHIZUME, S.; YOSHIZAWA, H.; MORITA, M.; SUZUKI, K.;(1985) *Properties of attenuated mutant of vaccinia virus, LC16m8, derived from Lister strain.* In: GV Quinnan (ed). *Vaccine virus as vectors for vaccine antigens.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Pub; 87-99.

(39) HIRAYAMA, M.;(1975) *Smallpox vaccination in Japan.* In: H Fukumi (ed). *The vaccination: theory and practice.* Tokyo: International Medical Foundation of Japan; 113-24.

(40) MAYR, A.; STICKL, H.; MULLER, H. K.; DANNER, K., SINGER, H.(1978); *Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische struktur, erfahrungen mit der parenteralen schitzimpfung und verhalten im abwehrgeschwachten organismus.* Zentralbl Bakteriol B; 167: 375-90.

(41) SUTTER, G.; MOSS, B.(1995); *Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus.* Dev Biol Stand; 84: 195-200.

(42) BLANCHARD, T.; SMITH, G. L.; WHITTLE, H.;(1999) *Vaccines for smallpox.* Lancet; 354: 422.

(43) MCCLAIN, D. J.;(1997) *Harrison S, Yeager CL, Cruz J, Ennis FA, Gibbs P, et al. Immunologic responses to vaccinia vaccines administered by different parenteral routes.* J Infect Dis; 175:756-63.

(44) F-D-C Reports, (2000)*Inc. Vero cell standardized tests for adventitious agents urged by FDA panel.* The Pink Sheet; 62: 19-20.

(45) *Food and Drug Administration.* (1999) *New drug and biological drug products: evidence needed to demonstrate efficacy of new drugs for use against lethal or permanently disabling toxic substances when efficacy studies in humans ethically cannot he conducted.* Federal Register; 64: 53960-70.

(46) *Smallpox. The Forgotten disease*. (2003) Vienna: Baxter Vaccine AG. October.

(47) KEMPE, C. M.; BOWLES, C.; MEIKLEJOHN, G.; BERGE, T. O.; VINCENT, L. S. T., SUNDARA BABU, B. V.;(1961) et al. The use of vaccinia hyperimmune gamma-globulin in the prophylaxis of smallpox. Bull World Health Organ; 25: 41-8.

(48) Bray, M.; Martinez, M.; Smee, D. F.; Kefauver, D.; Thompson, E.;(2000) Huggins JW. Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. J Infect Dis; 181: 10-9.

(49) Institute of Medicine. Assessment of future scientific needs for live variola virus. Washington: National Academy Press (1999).

(50) Lalezari, J. P.; Staagg, R. J.; Kuppermann, B. D. et al. (1997); Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS: a randomized, controlled trial. Ann Intern Med.; 1 26:257-63.

(51) CDC. CDC prepara equipos de respuesta para un posible brote de viruela. Comunicado de Prensa, 4 de noviembre de 2001. (*http://www.cdc.gov/spanish/esmedia/antraxupdt10.htm*)

(52) Le commissaire Byrne (2001): examine les réponses à la menace potentielle du bioterrorisme dans le cadre de la réunion du G7+ à Ottawa. IP/01/1546. Bruxelles, 7 novembre. (*http://europa.eu.int/*)

(53) Le G7+ adopte un plan de coordination globale des réponses face au bioterrorisme. IP/01/1553. Bruxelles, 8 novembre 2001. (*http://europa.eu.int/*)

(54) Graham, B. S.; Belshe, R. B.; Clements, M. L. et al.(1992) *Vaccination of vaccinia-naive adults with human inmunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial.* J Infect Dis; 166: 244-52.

Las toxinas como agresivos químicos: micotoxinas

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Las toxinas son substancias producidas por muchos y diversos organismos, desde microbios a animales superiores. Aunque algunas como la ricina y la botulínica tienen alguna utilidad terapéutica, todas tienen actividad nociva para la salud, que hace que algunas se puedan emplear como agresivos químicos. Algunos, debido a su procedencia, las consideran agresivos biológicos, pero dado que muchas se obtienen sintética o semisintéticamente, que su mecanismo de acción es semejante a los de muchas substancias químicas, y que a diferencia de los agresivos microbiológicos, su efecto suele ser rápido y como argumento más importante para incluirlas como agresivos químicos es que sus agentes no se reproducen en los afectados y que estos no transmiten el proceso. Algunos, eclécticamente los llaman a mi juicio innecesariamente, «agentes de espectro medio».

El Protocolo de Ginebra de 1925, las incluyó entre las biológicas y el artículo I del Convenio (CPABT), que prohíbe el desarrollo, producción y almacenamiento de armas bacteriológicas (biológicas) incluye a «otros agentes microbianos o toxinas», sea cual fuere su origen o método de producción y el de su destrucción, firmado en Londres, Moscú y Washington el 10 de abril de 1972, cuya ratificación publicó el BOE n.º 165, 11 de julio de 1979. La Convención para armas químicas (CWC) de 1993 ya las considera como químicas. La Convención (CPAQ) sobre la prohibición del desarrollo, la producción, el almacenamiento y el empleo de armas químicas y sobre su destrucción, hecho en Paris el 13 de enero de 1993, ratificado publicado en el BOE n.º 300, de 13 de diciembre de 1996 con corrección de errores en el BOE n.º 163 de 9 de julio de 1997, incluyen solo a la ricina y

a la saxitoxina. El manual de la OTAN de 1996 señalaba, que las toxinas no poseen las características de los agentes biológicos de infectividad, virulencia, patogenicidad, periodo de incubación y transmisibilidad.

En la antigüedad los cazadores y luego los guerreros impregnaban las puntas de sus flechas para aumentar su efecto, con diversos venenos entre ellos toxinas orgánicas obtenidas de plantas y hasta de animales. Los indígenas precolombinos, en especial los que vivían en la selva amazónica, emplearon flechas envenenadas con pacuruniara, curare, batracotoxina, escopolamina y glucósidos del borrachero y de la yuca brava que son cianogénicos. Los cinta larga, (nombre debido al cinturón de serpiente que utilizan) pequeña etnia de Rondonia vasta región amazónica emponzoñan sus flechas con «xajara» veneno que obtienen de un hongo.

El cosmógrafo Juan de la Cosa, compañero de Colón, a quien se debe el primer mapamundi, sufrió los efectos de una de esas toxinas. Los cronistas del Descubrimiento se refirieron a estas substancias como las que «con solo picarles matan en veinticuatro horas». Precisamente la palabra toxina procede de la griega «toxon» que significa «arco» de cuya forma el toxoplasma recibió su nombre, asimilando el concepto de toxina al de arco, confiriendo a este su significado agresivo. Por haber sufrido los efectos de estas flechas emponzoñadas, el primer Hospital de Cartagena de Indias se dedicó a San Sebastián.

Las toxinas orgánicas son metabolitos producidos por seres vivos, especialmente por hongos como las faloidina y las micotoxinas, de algas como la microcistina, de bacterias como las toxinas botulínica, tetánica, la enterotoxina estafilococia que incapacita unas horas o las fitotoxinas procedentes de plantas como la ricina, el curare, la estricnina, o del plancton como la saxitoxina o de animales como la cobratoxina de serpientes y la palitoxina de invertebrados marinos como los celentéreos y otras de organismos marinos, insectos y anfibios.

El mecanismo tóxico de las toxinas, más sutil que el de los agresivos inorgánicos, no depende de su origen, de su pm, ni de su estructura que son muy variados. La mayoría son neurotoxinas que interfieren con la transmisión de los estímulos nerviosos a menudo de forma reversible, que pueden causar la muerte, o dar síntomas análogos a los de los órganofosforados, como miosis y convulsiones; pueden ser inmunógenas humoral y célularmente; algunas pueden actuar como haptenos.

Uso militar de las toxinas

Todas las toxinas, son aplicables a la guerra si sus propiedades lo permiten, pero también por el terrorismo o para cometer asesinatos. En principio una toxina, tendrá más valor cuanto más tóxica sea; hay 19 extremadamente tóxicas, las 19, cuya DL_{50} es menor de 0,050 µg/ kg ratón, entre las cuales tenemos:

Toxina	*µg por kilo de ratón*
Botulínica	0,00005. (otros dan la de 0,001 y otros 0,05)
Tetánica	0,0001 (otros 0,1)
Batrachotoxina	3
Tarichatoxina	0,5

También podrían usarse las 100 toxinas, cuya DL_{50} está entre los 0,050 a 8,5 µg/ kg como la batrachotoxina cuya DL_{50} es 3 y la saxitoxina que es 8, y hasta algunas de 000 las 400 toxinas, moderadamente tóxicas cuya DL_{50} es mayor de 8,5 µg/ kg como la enterotoxina B estafilocócica cuya DL_{50} es 0,05 mg/kg o la toxina tetánica que es 1 mg. La toxina más importante es la botulínica cuya DL_{50} es 0,00005 µg/ kg; 50 µg de toxina botulínica distribuidas equitativamente podrían matar a 1.000 kilos de seres vivos o sea a 150 personas 0,25 mg para matar a 1 millón de hombres se necesitarían 3,5 mg y con 25 g se podría matar a la humanidad.

Cuando se dispersa un agresivo en el aire interesa conocer el valor LCt_{50} que es la cantidad que produce un determinado efecto que puede ser la muerte, en la mitad de los expuestos expresado en $mg{\cdot}min/m^3$, valor relacionado con la DL_{50}, expresada por kg de peso (Calder y cols.) que en general guarda relación con la obtenida en animales como el ratón. La $LCt_{50,}$ depende del volumen respiratorio por minuto, del porcentaje de polvo, aerosol o niebla que se retiene durante la exposición. La LCt_{50} de la toxina botulínica es 0.0225 $mg{\cdot}min/m^3$ para el ratón y para el rhesus mientras que la de la enterotoxina B estafilocócica es 80-100 $mg{\cdot}min/m^3$ para el ratón.

Hay que tener en cuenta la difusión vertical y los factores meteorológicos. Por cada km^2,se necesitaría dispersar 1,5 kg de toxina con una DL_{50} de 0,050 mg/ kg para matar a la mitad de los expuestos, pero la cantidad necesaria sería mucho mayor para toxinas con una DL_{50} grande. Hay como mucho 30 toxinas que reúnen estas propiedades en grado suficiente para uso militar. El peso molecular influye en muchos aspectos y en cuanto a las toxinas se consideran de alto peso molecular las que pesan más de 1.000 daltones: el p.m. influye en la persistencia en el ambiente, en la susceptibilidad a la descontaminación etc.

Las toxinas se pueden obtener fácil y económicamente con poca tecnología y como se conoce su estructura, las de pequeña molécula se pueden obtener por síntesis química y ya se han sintetizado algunas toxinas de las serpientes coral. Como se pueden clonar sus genes y obtener la proteína tóxica por ingeniería genética, se pueden obtener en gran cantidad haciendo utilizables substancias poco tóxicas.

Son de difícil detección pues los aparatos usados para los agresivos químicos convencionales son insensibles a las toxinas. Las dificultades para tratar a los afectados podrían ser otra característica a tener en cuenta. Son estables en el almacenado y en el ambiente, cualidad que depende de su estructura y del medio en el que se suspende, que puede mejorarse permitiendo introducirlas en proyectiles, lo que los ingleses llaman «weaponization».

No son volátiles y el calor las descompone, por lo que solo se pueden usar como aerosoles, dispersando en el aire, una gran cantidad de toxina para lograr con una exposición breve el efecto deseado; el ataque se haría preferentemente por la noche, para ocultarlo, o al anochecer, cuando el aire es más húmedo. El diámetro aerodinámico de las partículas determina que penetren y se retengan menos que los vapores o el polvo; el diámetro más útil es el de 0,5 a 5 μm, que son las que se retienen en el pulmón, pues la mayoría de las menores no llegan a depositarse en las vías respiratorias y las grandes quedan retenidas en el moco y deglutidas posteriormente. La carga electrostática de las partículas debe ser neutra para evitar que se aglomeren entre sí.

La dispersión en el aire puede temerse en el teatro de operaciones, en ciudades, centros logísticos o en el interior de edificios, en este caso podrían ser utilizadas toxinas con poca toxicidad incluso a través de conductos de ventilación.

La dispersión aérea pretende la entrada respiratoria y en el caso de los trichotecenos, la lingbiatoxina y algunas toxinas producidas por las algas verde azules causan dermitis en los que se bañan en aguas con esas algas. Los afectados por aerosoles (o por vapores) pueden desprender de su aparato respiratorio y de su piel y vestidos estos aerosoles que pudieran afectar a los sanitarios. Los locales críticos deben estar protegidos por medio de filtros, y las personas mediante máscaras y gafas que cierren las órbitas.

Puede utilizarse la entrada digestiva que es como se producen las intoxicaciones naturales, contaminando el agua o los alimentos pudiendo esperarse su uso contra animales. El empleo de aerosoles pudiera contaminar el agua pero a baja concentración. La ósmosis inversa es efectiva frente a la ricina, a la microcistina, a la toxina T-2, a la saxitoxin y probablemente frente a las toxinas botulínica y a la enterotoxina B del S aureus. La coagulación-floculación no elimina la ricina, la microcistina, la toxina T-2 la saxitoxina ni las toxinas estafilococia y botulínica. El hipoclorito a 5 mg/ L durante 30 minutos destruye las toxinas botulínicas y la estafilocócica pero no la ricina, la microcistina, la toxina T-2 ni la saxitoxina. Por ello es de temer que si se pretende contaminar el agua, se añada la toxina después de haber sido depurada, aunque el cloro residual puede destruir a las toxinas. La presencia de microcistina en el agua podría deberse a las algas acuáticas y no a una contaminación agresiva. El agua contaminada debe desecharse y el material y fómites descontaminados por sosa al 5% durante al menos seis horas.

Algunas toxinas, como la saxitoxina o la microcistina, causan su efecto a los pocos minuto otras lo hacen al cabo de unas horas como las enterotoxinas estafilocócicas y otras después de unos días como la toxina botulínica o la ricina. La prevención específica, se basa en vigilar el agua, y el aire teniendo en cuenta que ninguna toxina es detectable por el color, olor o por el sabor. Hay detectores que pueden monitorizar continuamente el aire; algunos equipos de campo pueden detectar las toxinas en unos 30 minutos dando tiempo para la protección; los métodos quí-

micos son sensibles entre unos pocos microgramos a muchos nanogramos. La identificación definitiva requiere unas dos horas, pero eliminar previamente, la matriz orgánica, puede requerir varios días; los mejores tests, son los inmunológicos, pero son caros pues deben incluir anticuerpos específicos para cada posible toxina. Las muestras para su transporte al laboratorio deben introducirse en envases de politetrafluoroetileno y mantenidos en ambiente seco y frío.

Las técnicas analíticas aplicadas a los fluidos y tejidos pueden dar resultados negativos pues las concentraciones capaces de causar efectos pueden ser indetectables. Por ello es mejor tomar muestras de moco nasal por el escobillonado de la nariz en donde se pueden encontrar las toxinas retenidas; los escobillones deben guardarse en nevera hasta su estudio. El ELISA es sensible entre 1 a 10 ng/ mL, se hace en unas 4 horas, factible en el teatro de operaciones. La PCR puede detectar restos de ácidos nucleicos de la fuente de la toxina dada su gran sensibilidad. Un método altamente sensible, combina el inmunoensayo con el PCR. La determinación de la IgG o de la IgM especificas en afectados, permite hacer el diagnóstico retrospectivo.

Se estudian vacunas frente a las toxinas inmunógenas, empleables como agresivos como la botulínica o la ricina. Tres inyecciones de 0,5 µg/ kg de cobratoxina a los ratones separadas dos semanas produce un alto título de anticuerpos determinables por ELISA por lo que Lipps la considera un superantígeno; convertida en toxoide con o sin adyuvantes estimula mucho la inmunidad. Igualmente se podrá disponer de anticuerpos específicos como los disponibles contra la toxina botulínica. Para su empleo habría que saber cuales son las que el enemigo podría utilizar teniendo en cuenta que se necesita mucho tiempo para obtener estos productos y para su aplicación y una vez logrado esto deben transcurrir al menos 4 a 6 semanas y si se trata de vacunas muertas que requieren varias inyecciones unas 12-15 semanas. El uso de antígenos microencapsulados, libera lentamente al antígeno. Si el riesgo es inmiminente se puede iniciar una vacunación acelerada anticipando las dosis de recuerdo a la 2 y a las 10 semanas, que estimulan a linfos B, cuya memoria persiste meses o aún años. No todos los vacunados con dos dosis quedan protegidos.

La inmunización pasiva mediante suero desespeciado de animales vacunados podría ser útil para proteger como mucho un mes con el riesgo

de causar reacciones alérgicas y la enfermedad del suero. La IgG humana no tiene esos inconvenientes, reduce la necesidad de ventilación asistida, pero es cara y escasa aunque la protección puede llegar a los 6 meses; los anticuerpos monoclonales aislados o combinados podría abaratar a los policlonales. La IgG administrada poco después de la exposición tiene la ventaja de poder inyectar el anticuerpo especifico pero debe hacerse antes de haber aparecido los síntomas pues en este caso, la toxina se ha fijado a su blanco y no se modifica por las Ig.

Protectores cutáneos

La irritación cutánea causada por la toxina T-2 en ratas hembra Porton se reduce mucho si se recubre la piel al menos 10 minutos antes con una solución de jabón, pero es ineficaz si se tarda más de 60 minutos en aplicarla o cuando la dosis es alta. Los TPS 1 y 2, aplicados a la piel del conejo 60 minutos antes de la exposición a 50 μg de toxina T-2 impiden la irritación de la piel, al menos durante seis horas (Wannemacher 1994). El M258A1 descontamina la piel pero algunos de sus componentes son muy irritantes y caústicos llegando a matar a las ratas y conejos a los que se aplica (Jederberg y cols 1981); el M238A1, descontamina y neutraliza a los tricotecenos (Wannemacher y cols 1983). El XM291, contiene la resina XE-555 eficaz contra muchos agresivos y bastante seguro para el hombre y la resina XE-556 que elimina físicamente la toxina T-2 (Wannemacher 1987). Si se retrasa la aplicación de estos productos, puede aparecer eritema, picor y sensación de quemadura, calmables con calamina o con cremas con metanol o alcanfor al 0,25%. Los ojos se deben descontaminar con lavado profuso con SS.

Tratamiento

Algunas toxinas actúan tan rápidamente que no hay tiempo para aplicar un tratamiento eficaz. Otras tardan más pero los efectos son irreversibles, matando al intoxicado si se tarda más de 12 a 24 horas en tratarlos. El tratamiento básico es mantener normales las constantes fisiológicas, para lo cual se le deberá colocar una vía hemática, para inyectar expansores de vo-

lumen y medicamentos vasoactivos contra el shock e intubar a los pacientes con distrés respiratorio grave y someterlos a ventilación mecánica a los intoxicados por la toxina botulínica o por la saxitoxina, y oxigenoterapia en las que lesionan la membrana alveolo-capilar como la ricina y atropina y en su caso oximas para las toxinas anticolesterásicas.

Si la entrada fue oral se debe lavar el estómago con polietileno-glicol o dándole carbón superactivado, que liga a las micotoxinas incluso a los intoxicados por vía cutánea. Se prevé emplear bloqueantes de los receptores o substratos que compitan con los naturales para las que tienen actividad enzimática para la ricina o para la toxina botulínica o aumentando la liberación de un neurotransmisor bloqueado en el caso de la toxina botulínica. Las diamino piridinas revierten la intoxicación botulínica.

Descontaminación de las toxinas

Las toxinas contaminan menos la piel, las ropas etc. que los restantes agresivos químicos por lo que la descontaminación es menos importante; basta un lavado profuso con agua jabonosa o simplemente con agua y en caso de desear la destrucción de los residuos que pudieran quedar en la piel por el hipoclorito sódico al 0,1% mantenido 10 minutos. La atención de los intoxicados acarrea poco riesgo para el personal asistencial, ya que las toxinas no son volátiles y solo se tomarán precauciones en las exposiciones intensas o frente a intoxicados por las toxinas botulínica o enteroxina estafilocócica B.

Los fómites, especialmente el equipo las superficies y los residuos orgánicos contaminados deben ser manejados con guantes, pues las toxinas se pueden adherir a los dedos e intoxicar al manipulador deben sumergirse o lavarse con hipoclorito sódico al 0,2 % durante 10 minutos.

Estudio especial de las principales toxinas utilizables en guerra

MICOTOXINAS

Se trata de secreciones de elevado pm de los hongos de los géneros Fusarium, Trycothecium, Verticimonosporium, Stachybotrys y Tricho-

derrma. Las toxinas se obtienen fácilmente de los cultivos de los correspondientes hongos; el producto bruto es un líquido amarillo-pardo que al evaporarse deja los cristales amarillos de la toxina.

Como ocurre con muchos xenobióticos, el efecto depende de sus metabolitos y de su detoxificación. Por eso influye mucho la expresión de determinados enzimas constitutivas e inducibles, cuyo control está situado en la región 5' de los genes; la existencia de mecanismos de control permite hacer una quimioprotección. Las principales micotoxinas son:

AFLATOXINAS

Descubiertas a comienzos de los años 1960. Son las micotoxinas más importantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Las aflatoxinas bloquean los grupos sulfhidrilos de los enzimas, por lo que inhiben la síntesis del ADN y de las proteínas. Por ello tienen efecto antibiótico. Las aflatoxinas inhiben a algunos microorganismos del suelo como los Bacillus brevis y megaterium,y tal vez contra el anthracis, regulando la flora bacteriana del suelo. Por su efecto inhibidor del ADN, las aflatoxinas son potentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos, inmunosupresores, nefro, hepato, dermo y neurotóxicos y anticoagulantes. Debido a estos efectos las aflatoxinas pueden producir en animales y en el hombre cáncer primitivo del hígado. La sosa al 3-5% o el tratamiento por el calor a 82ºC durante 10 min, o 49º C, durante 30 min. destruyen la toxicidad.

Debido a su toxicidad, a la facilidad de obtención, de dispersión en forma de polvo, gotas, aerosoles, humos, distribuidos por granadas, morteros, proyectiles de todo tipo se considera a las aflatoxinas como agresivos potenciales.

El gobierno de Sadam Hussein, antes de la Guerra del Golfo, reconoció que había montado en la ciudad de Salman Pak, un laboratorio de investigación microbiológica, que había producido entre otros agresivos microbiológicos, 16 bombas con aflatoxina y en diciembre de 1990 un mes antes del inicio de la Guerra del Golfo, había desplegado 200 armas biológicas entre ellas mísiles Scud con cabezas con-

teniendo aflatoxinas, Sadam Hussein se comprometió a destruir los agresivos microbiológicos así como los químicos, pero el presidente de la Comisión de NU Rolf Ekeus expresó al Consejo de Seguridad el 26 de agosto de 1995, su gran preocupación porque «algunos agentes biológicos puedan estar escondidos»: los arsenales iraquíes fueron destruidos por UN en 1996.

Otras MICOTOXINAS potencialmente utilizables como agresivos son:

— Las **Ochratoxinas** agente de la enfermedad nefrotóxica endémica de los Balcanes.

— Las **Zearalenonas**, que tienen efecto estrogénico.

— Se ha pensado que podrían emplearse en guerra, las Fumonisinas que se sospecha que intervengan en la génesis del cáncer de esófago y las rubratoxinas.

— La **Wortmanina** es la 1, 6b, 5, 7, 8, 9a, 10, 11, 11 b-octahidro-1-hidroxi- metoximetil)- 9ab, 11b(.-dimetil-3H-furo[4,3,2-de] indeno(4,5-h)-(2 benzopireno-3,6,9-trioneacetato). Esta toxina obtenida en cultivos con arroz tiene una absorbancia máxima para los UV en las longitudes de onda de 210,254 y 292 nm, sin que los UV de corta y larga longitud de onda, produzcan fluorescencia en ella. El espectro en infrarrojos demuestra grupos carbonilo en los 1,675 y 1,750 cm^{-1}y un grupo eter en los 1,215 cm^{-1}. La toxina produce en ratas hemorragias en estómago, intestino, timo y corazón por lo que fue llamada H-1. La Wortmanina es un metabolito esteroide de una micotoxina del Myrothecium roridium y del Penicillium wortmanni, que Abbas y cols encontraron en el Fusarium oxysporum, hongos ampliamente distribuidos que se encuentran a menudo en plantas y granos usados como alimento humano y para pienso. Abbas y cols. (1988) encontraron la wortmanina, en una cepa de Fusarium oxysporum aislada en un área herbácea de Lakselv, en el ártico noruego. Sus efectos varian según la especie intoxicada. Su administración a ratas y otros animales de laboratorio, causa anorexia, pérdida de peso, hemorragias en estómago, intestino, miocardio, timo provocando hemoglobinuria y hematuria y muerte. Gunther y cols. (1989) dieron a ratas y ratones

durante una o dos semanas, pienso con cultivos de Fusarium oxysporum. Los animales bajaron de peso, en su timo había menos linfocitos T y en suero menos IgG e IgM con disminución de la respuesta humoral primaria a antígenos T-dependendientes e independientes y la respuesta proliferativa de las células esplénicas al mitógeno «pokeweed». La ausencia de toxicidad para células en cultivo de timo o bazo, sugiere que los efectos se deben a metabolitos.

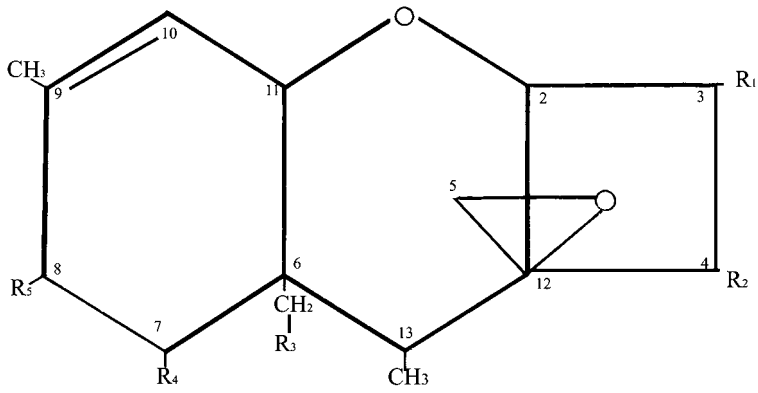
TERRITREM B (TRB)

Es un metabolito fúngico sintetizado por el Aspergillus terreus, que se une estoicométricamente uno a uno con la acetilcolinesterasa a la que inhibe selectiva (Chen y cols 1999) e irreversiblemente sin que la regenere las oximas, la urea 8M, deshaga la unión el que indica que la unión no debe ser covalente a diferencia del diisopropilfluorofosfato y de la neostigmina, también inhibidores irreversibles de la AChE a la que se unen covalentemente.

TRICOTECENOS

Son micotoxinas cuyo pm es 250 a 550d, con un punto de fusión específico de cada tricoteceno; no son volátiles, sin color olor ni sabor, lo que los hace indetectables, poco solubles en agua pero lo hacen bien en los solventes orgánicos Estables a la luz, al aire y al calor incluso a 120ºC. Se inactivan por el hipoclorito sódico entre el 3% al 5%, especialmente si se adiciona un poco de sosa (lejía comercial). La mayoría de los tricotecenos se presenta como cristales incoloros. Su caracterización es a veces compleja, requiriendo técnicas físicas y espectroscópicas.

Son sesquiterpenoides que tienen como esqueleto estructural, el epoxi-12,13 tricoteceno-9 tetracíclico, cuyo núcleo es el anillo tricoteceno, que tiene una unión olefínica en C-9 y C-10 y el epóxico en C-12 (Godtfredsen y cols. 1967). El grupo 12,13.epoxy le confiere una gran estabilidad frente a los nucleofílicos.



ESQUEMA 1. *Tricoticenos.*

Los más importantes de los al menos 83 tricotecenos no macrocíclicos o normocíclicos, son:

Fusarenon X	Toxina T-2	Toxina THT-2
T-2 tetraol	Nivalenol o NIV	Deoxinivalenol o DON o Vomitoxina
15-acetildeoxinivalenol o 15 ADON	3-acetildeoxinivalenol o 3 ADON	Diacetoxicispernol o DAS o Anguidina
DASD	Satratoxina G	Satratoxina H
Escirpeno	Tricodermol	Verrucaron
Diacetoxiescirpeno	Tricodermina	Verrucarina A
15-desacetilcalón	Escirpentriol	Tricotecina
Wortmanina		

Cadenas laterales de los tricotecenos

Tricoteceno	R_1	R_2	R_3	R_4	R5
Escirperno	H	H	H	H	H
Tricodermol	H	OH	H	H	H
Verrucarol	H	OH	OH	H	H
Tricodermina	H	Oac	H	H	H
4,15 Diacetoxiescirpenol	OH	$OCOCH_3$	$OCOCH_3$	H	H
15-Desacetilcalonectrina	Oac	H	OH	H	H
Escirpentriol	OH	OH	OH	H	H
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	H
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH	=O
Reicotecina	H	OOOCH=CHMe	H	H	O
Fusarenon X	OH	Oac	OH	OH	O
Toxina T-2	OH	$OCOCH_3$	$OCOCH_3$	H	O-CO-CH2-CH=$(CH_3)_2$
Toxina HT-2	OH	OH	$OCOCH_3$	H	O-CO-CH_2-CH=$(CH_3)_2$
Tetraol	OH	OH	OH	H	OH
Macrocíclicos	H	OR´	O	H	H

El radical R'de los macrocíclicos es un éster o un puente éster-éter entre los carbonos 4 y 15. Las verrucarinas son los tricotecenos más importantes de los 65 macrocíclicos, que se designan por letras mayúsculas, más las roridinas y la satratoxina H.

La ebullición prolongada en un pH muy alto reordena la estructura molecular del esqueleto que pasa a un anillo apotricoteceno insoluble en agua pero si en lípidos, en acetato de etilo, en propilen glicol y en dimetil sulfóxido en los que se pueden conservar mucho tiempo (Shepherd y Gilbert 1988). Los tricotecenos que tienen un grupo ester tratados con una base se hidrolizan a su alcohol (Wei y cols. 1971), el cual se acila fácilmente.

Ueno dividió en 1977 a los tricotecenos, según su grupo funcional en cuatro clases:

La primera clase o tipo A, la más numerosa, se caracteriza por un grupo funcional, no acetónico en el C-8. Son solubles en solventes moderadamente polares como el cloroformo, el éter etílico, el etil acetato y la acetona. En ella se incluye la Toxina T2 y el diacetoxiscirpenol (DAS). En general los tricotecenos del tipo A son producidos por los F. tricinactun, F. sporotrichioides, F. poe y F. equiseti.

La segunda clase o tipo B, está formada por los tricotecenos que tienen una función carbonilo en C-8 requieren solventes de mayor polaridad que los A como metanol-agua o acetonitrilo-agua. Comprende el 4-deoxivalenol (DON) y nivalenol (NIV). Los producen el F.graminearum (Gibberella zeae) y al F. culmorum.

La tercera clase, o tipo C esta caracterizada por un segundo grupo epóxido en C-7,8 o en C-9,10., están producidos solo por unas pocas especies.

La cuarta clase o tipo D, contiene un anillo macrocíclico entre C-4 y C-15 con dos uniones ésteres; tienen un típico espectro en UV, Están producidos por varios géneros de hongos, incluyendo Myrothecium y Stachybotrys. De estos el más importante para la salud hombre y animales es el Stachybotrys satra que produce la satratoxina un tricoteceno macrocíclico.

Hongos productores de tricotecenos

Los tricotecenos son metabolitos, muy tóxicos, producidos a partir del Farnasíl-pirofosfato, por hongos filamentosos, cuya síntesis depende del substrato, de la temperatura,(se producen más tricotecenos a temperaturas bajas),de la humedad etc. Los más importantes son los producidos por el género Fusaríum, hongos que se desarrollan sobre la materia orgánica especialmente en el suelo, en muy diversos, hábitats desde saladares, altas montañas, desiertos etc. Los hongos productores de micotoxinas se identifican por criterios morfológicos, y actualmente por los espaciadores intergénicos transcritos de la unidad ribosómica (ITS), que aunque son poco polimórficas dentro de algunas especies,

bastan para diferenciar otras y cuando en algunos casos las ITS no son lo suficientemente polimorfas, para hacer la identificación se emplean marcadores más resolutivos como secuencias de genes de evolución más rápida que las ITS y microsatélites polimórficos etc; esto ocurre con las especies comprendidas en los complejos del Fusarium graminearum y del Botrytis cinerea, agente de la podredumbre gris de numerosas plantas y el de la podredumbre noble de las parras, una de las 25 especies del género, Botrytis es, en realidad un complejo que tiene al menos las dos especies crípticas simpátricas B. cinerea Grupo I y B. cinerea Grupo II (Fournier y cols. 2003). Bakan y cols. (2002) están secuenciando los ITS y otros marcadores nucleares de varias cepas europeas de F graminearum.

Hay al menos 52 especies de Fusarium cada una de ellas produce al menos tres tricotecenos.

Los Fusarium más conocidas son el F.tricinactum, (o sporotrichioides), el F.solani, el F, nivale, productor entre otros tricotecenos del Fusarenón X, que es el 3(.7(-15-trihidroxi-4(-acetoxi-8-oxo-12,13-epoxi-tricoteceno, el F. poae, el F. culmorum, las 8 especies incluidas en el complejo F.graminearum, (Bakan y cols.2002) crípticas, el F. episphae, el F.lateritium, el F.rigidisculum, el F solani, el F.roseum.

El Fusarium oxysporun es un hongo frecuente en los suelos agrícolas. El Fusarium graminearum y el F.culmorum causan la fusariosis del trigo, cebada y centeno, (el pink ear rot del centeno o el pinkscab del trigo). La toxina T-2, el DON, el NIV, y con menos frecuencia el DAS, y los 3 y el 15-ADON se encuentran en cereales especialmente en el centeno. Shotwell y cols. (1985) observaron que en el trigo había una gran correlación entre la concentración del DON y el porcentaje de granos con hongos, y con defectos. Teich y Hamilton, (1985) creen que la rotación de las sementeras aumenta la contaminación fúngica. En las bananas se han encontrado ésteres de ácidos grasos de la tricotecolona, del escirpenetriol, y de la T-2 tetraol (Chakrabarti y cols 1986). Los Fusarium además de afectar a los vegetales causan numerosas micotoxicosis de animales y del hombre.

También producen tricotecenos los Verticimonosporium, algunas especies de Myrothecium, de Trichoderma de Trichothecíum: de Cephalosporium, de Stachybotrys, algunas especies de hongos imperfectos e incluso algunas plantas

El tricoteceno más importante es la Toxina T-2. Es una sustancia cuya LCt_{50} es 200 mg•min/m_3. Es muy estable especialmente al calor. Para su detoxificación hay que usar sosa o hipoclorito sódico.

Obtención de los tricotecenos

Los tricotecenos se pueden obtener de la naturaleza pero especialmente por la fermentación de substratos, que pueden ser sólidos, que rinden unos 9 g por kg (de toxina T-2). De los productos naturales o de los fermentadores se pueden extraer los tricotecenos por acetona, metanol, etanol, cloroformol, acetato de etilo, acetonitrilo y propilen glicol (al acetonitrilo y al metanol se les puede añadir agua),, dejando al evaporarse unos 2,5 g de la toxina (Burmeister 1971) en forma de cristalitos grasientos, amarillentos; los cristales de la toxina pura son blancos. Los cristales permiten hacer pruebas químicas, cromatográficas, determinación de la absorción en los UV del derivado fluorescente del producido al tratar los tricotecenos con álcalis o con formaldehído y con acetato amónico y acetoacetato de metilo, o la detección electroquímica o espectrometría de masas o por inmunología como el ELISA. Heyndrickx y cols. (1984) los extraen de muestra homogenizadas con 3 x 20 ml de acetonitrilo. El extracto se filtra y evapora hasta dejar unos 3 ml. Se añaden 15 ml de agua y de la mezcla de acetonitrilo-agua se extrae con 30 ml de cloroformo que se seca con sulfato sódico anhidro y evaporado hasta sequedad. El residuo se redisuelve con 150 microlitos de metanol diluido, con 2,5 ml de agua y transferido a una columna Los extractos se analizan por cromatografía gaseosa.

Toxicidad

Los tricotecenos son tóxicos para las células eucariotas, afectando a mamíferos, peces, aves y plantas con discretas diferencias según el tricoteceno y la especie inoculada. La DL_{50} suele determinarse por i.p. en el ratón y expresa la toxicidad aguda; la DL_{50} de la verrucarina A y B, es 0,5 mg/kg. la del fusarenon-X, 3,4, las del NIV, 4,1; la de la toxina T-2, 5,2. la de la toxina HT-2 9,0, la del diacetilnivalenol, 9,6, la del neoso-

laniol (8-hydroxidiacetoxyscirpenol), 14,5, la del DAS 23,0 la del acetil-deoxi-nivalenol, 49,0 la del DON 70,0; y la de la crotocina 810,0. La DL_{50} de la toxina T-2 subcutánea es en el ratón recién nacido 0,15 mg/kg de peso del animal,(0,5 (g por ratón) la del DAS, 0.17 y la del fusare-non-X 0,23 (Ueno y cols. 1973).

La crotocina y la tricotecina son tricotecenos poco tóxicos. La siguiente tabla construida con datos de Ueno (1989), Wannemacher y cols. (1989,1991),Jarvis y col. (1991) expresa las DL_{50} de varios tricotecenos según el animal de prueba:

Tricoteceno	*Ratón*	*Rata*	*Cobaya*	*Conejo*	*Gato*	*Perro*	*Cerdo*	*Mono*
Toxina T-2	5,2 IV	0,9 IV	1,0 IV	1,0 IM	<0,5 subcutáneo <0,5 subcutáneo	—	1,2 IV	0,8 IM
Toxina HT-2	9,0 IP	—	—	—	—	—	—	—
DAS	12,0 IV	1,3 IV	—	1,0 IV	—	1,1 IV	0,38 IV	—
Nivalenol	6,3 IV	—	—	—	—	—	—	—
DON	43 subcutáneo	—	—	—	—	—	—	—
Verrucarina A	1,5 IV	0,8 IV	—	0,54 IV	—	—	—	—
Roridina A	1,0 IV	—	—	—	—	—	—	—
Satratoxin H Satratoxin H	1M0 IP	—	—	—	—	—	—	—

La siguiente tabla expresa la DL_{50} en mg/kg, de la Toxina T-2 según la vía de administración y la especie animal según datos de Ueno (1989), Wannemacher y cols. (1989,1991),Sharma y cols. (1991):

Especie	*Ratón*	*Rata*	*Cobaya*	*Conejo*	*Gato*	*Cerdo*	*Mono*
Intravenosa	4,2-7,3	0,7-1,2	1,0- 2,0	—	—	1,2	—
Intraperitoneal	5,2-9,1	1,3-2,6	—	—	—	—	—
Subcutánea	2,1-3,3	0,6-2,0	1,0-2,0	—	< 0,5	—	—
Intramuscular	—	0,5-0,9	1,0	1,1	—	—	0,8
Intragástrica	9,6-10,5	2,3-5,2	3,1-5,3	—	—	—	—
Intranasal	—	0,6	—	—	—	—	—
Intratraqueal	0,16	0,1	—	—	—	—	—
Inhalación	0,24	0,05	0,6.2,0	—	—	—	—
Intracerebral	—	0,01	—	—	—	—	—
Dérmica disuelta en DMSO	6,6	4,3	2,2	10	—	—	> 8,0
Dérmica en metanol	—	> 380	>80	—	—	—	—

La toxicidad se puede objetivar por la necrosis del epitelio asociada al folículo del saco vitelino causada por la inyección de 5 mg/kg de toxina; es más activa la toxina T-2, que el Fusarenon X o el NIV que son 40 veces menos tóxicos que la ciclofosfamida. También se puede evaluar por su efecto sobre suspensiones de glóbulos rojos o por la viabilidad de líneas células. A los cinco minutos de haber añadido a un cultivo de células Vero, toxina T-2 ya se objetivan lesiones que llegan a su máximo a los 60 minutos; otros tests se basan en técnicas de clonación. (McLaughlin y cols. 1977,Yoshizawa y col. 1977).

Hoerr y cols. (1981) vieron que 4 mg/kg oral de la Toxina DAS o 5 de la T-2 disueltas en dimetil-sulfóxido a pollitos broiler machos de 7 días, necrosaban el hígado, vesícula biliar, intestino y especialmente en el tejido linfoide y de la médula al cabo de una hora, seguida de rápida depleción células, con muerte a las 72 horas. La combinación de las dos toxinas incrementó la letalidad..

Los tricotecenos ejercen efectos sistémicos sobre los órganos, traduciéndose en anorexia, diarrea, vómitos, pérdida de peso, alteraciones de los

sistemas nerviosos central y periférico pudiendo aparecer ataxia por degeneración medular. Pueden producirse lesiones cardiovasculares que dependen de la especie, de la dosis y de la duración de la exposición. En las ratas anestesiadas la inyección ip. o la venosa, baja la frecuencia respiratoria, enletece el pulso y disminuye la tensión durante varias horas pudiendo llegar al shock. Aplicada en la piel la irrita y necrosa; se ha observado que disminuye la fertilidad. (Ueno 1989, Wannemacher y cols. 1991). Los animales recién nacidos son más sensibles a los tricotecenos que los adultos.

Patogenia

Los efectos iniciales dependen mucho de la vía de ingreso en el organismo. Los tricotecenos en polvo que contactan con la piel se absorben lentamente pero lo hacen enseguida si están disueltos vg. con el dimetilsulfóxido, por su gran lipofilia, lesionando la piel. Las tricotecenos ingresados con los alimentos y parte de los inhalados al ser deglutidos con la saliva y el moco llegan al intestino, lesionan la mucosa y pasan rápidamente a la sangre en la que alcanza su acmé a la hora (Kemppainen y cols. 1884). La entrada por vía respiratoria, no lesiona a esta mucosa, probablemente por el escaso tiempo de contacto.

Una vez en la sangre se distribuyen, al menos la toxina T-2, por el organismo, acumulándose en el estómago, intestino, músculo, hígado, y bilis. Corley y cols. (1986) encontraron que a las 4 horas de haber inyectado venosamente toxina T-2 marcada, al cerdo, el tracto gastrointestinal contenía el 15-24% de la dosis, el músculo el 2,9-3,2%, el hígado el 0,7-1,7% 0,5 al 1 en los demás tejidos.

Yoshizawa y cols. (1981) administraron a terneras de Jersey una cápsula diaria con 180 mg de Toxina T-2 tritiada durante varios días, encontrando que a las 72 h, se había eliminado casi toda la dosis, pero a los tres días la bilis contenía aún 27,2 mg/kg, 18,6 el hígado, 13,9 mg/ kg el riñón, 13, 3 mg/ kg en sangre, 11,3 en mama, 10,2, en plasma, 10,1 en el corazón 10 en los ovarios, 9,4 en el bazo, 8,8 en los músculos 8,8 y 4,7 en la grasa. También midiendo la radioactividad en el cobaya, pollo y cerdo, Pace y cols. (1985) encontraron que excepto en el intestino grueso y en la bilis la máxima concentración se producía a los 30 minutos, bajando rápidamente en ellos.

La administración a pollitos broiler de 6 semanas, de 2 mg/ kg con el pienso durante 5 semanas y luego por intubación una sola dosis de 0,5 mg/ kg de T-2 se logra la máxima concentración tisular a las 4 horas salvo en piel, músculo y bilis que ocurre a las 12 horas. La toxina pasa a huevos y leche como lo demuestra la presencia en ellos de toxina marcada.

Los tricotecenos aumentan, en relación con la dosis, la permeabilidad de los vasos abdominales, con aumento de la absorción de la D-xilosa (Matsuoka y Kubota, 1981), y la del azul de Evans, pero la sodemia disminuye. Los villis intestinales están acortados y hay extravasación de los hematíes a la lámina propia intestinal. El aumento de permeabilidad vascular dilata el intestino delgado origina diarrea acuosa sin melena a las 36-60 horas no mediada por la serotonina, ni por la histamina, norepinefrina, prostaglandinas, leucotrienos, o tromboxanos (Matsuoka y col.1987) ni por el sistema de los nucleótidos cíclicos como ocurre con la toxina colérica, ya que no están aumentadas la GMPc y la AMPc de la mucosa intestinal.

En cambio la inyección venosa o la colocación por sonda en el yeyuno de fusarenon-X o de la toxina T-2, reducen 1 a 4 veces la absorción de la 3-0 metil-glucosa alterando específicamente el transporte activo y la difusión de los monosacáridos (Kumagai y col. 1988).

Parte de los tricotecenos absorbidos van a bilis reabsorbiéndose parcialmente y el resto se excreta con las heces. Una gran parte se excreta por orina; una pequeña fracción sin modificar y la mayoría previa conjugación hepática con glucurónico mecanismo de detoxificación de muchos xenobióticos. El 63% de los productos tricotecénicos excretados por orina, durante las cuatro horas siguientes a haber inyectado toxina T-2 tritiada en vena al cerdo están glucuronizados así como el 77% de los que van a la bilis (Corley y cols. 1985). El metiltiazolidina-4-carboxilato aumenta el glutation hepático y la superviviencia (Fricke y col. 1991) posiblemente aumentando la glucuronización. La puerta de entrada y la especie influyen en el patrón de los metabolitos que se excretan por la orina. La mitad del DON absorbido se elimina en 6-7 horas si ingresó por vía digestiva y en 15 a 200 minutos si lo hizo por la via venosa (Prelusky y cols.1985). El 73% de la toxina T-2 inyectada en vena se elimina por orina y el 22% por las heces. El tiempo necesario para eliminar la mitad del

DON administrado a una oveja por vía oral va desde 1 a 125 minutos, requiriendo 2 a 3 horas para su eliminación total. Los tricotecenos a diferencia de las aflatoxinas no necesitan metabolizarse para ejercer su actividad biológica.

Las bacterias intestinales deacilan a la toxina T-2, que se metaboliza especialmente en el hígado. En muchas especies la carboxilesterasa [EC 3.1.1.1] de los microsomas del hígado y también la de los hematíes, leucocitos, cerebro, intestino, riñón y bazo, hidrolizan selectivamente al grupo acetilo del C-4 de la toxina T-2 produciendo toxina HT-2 (Johnsen y cols. 1986).El citocromo P-450, cataliza la hidroxilación de las cadenas laterales de isovalérico en las C-3 y C-4 de las toxinas T-2 y HT-2.

Otra vía catabólica es la oxidación de C-3 y C-4 de las cadenas de las toxinas T-2 y HT-2 (Yoshizawa y cols. 1984, Westlake y cols. 1987, Swanson y cols. 1988). Casi todos los catabolitos de los tricotecenos conservan el grupo epoxi, sobre el que no actúan la epoxi-hidrasa ni la GSH-transferasa, por lo que continúan siendo tóxicos, pero en algunos se efectúa la desepoxidación, perdiendo el oxígeno del anillo epóxido de los C-12 y 13, dejando entre ellos un doble enlace. A partir de este cuerpo se forman metabolitos desprovistos de epóxidos atóxicos.

Los tricotecenos circulantes excitan el centro emético bulbar que unido al reflejo en el caso de la ingesta, provoca náuseas y vómitos, que pueden ser intensos, prevenibles, pero no tratables con clorpromazina o con metaclorpropamida, como vieron Matsuoka y cols. (1979) con el fusarenon-X. Los vómitos son uno de los más importantes síntomas de la intoxicación aguda en el perro, gato cerdo y en el patito; los vómitos eliminan una fracción de la toxina ingerida.

Una vez que los tricotecenos atraviesan la membrana las células interaccionan con numerosos blancos especialmente con los ribososomas, a los que se adhieren con gran afinidad. (Middlebrook 1989). El grupo epoxi permite que los tricotecenos inhiban intensamente la síntesis proteica ya que alteran la iniciacion, el elongamiento y la terminación de la translación, interfiriendo con la actividad de la peptidiltransferasa, y con la disgregación de los polirribosomas especialmente cuando están en mitosis es decir sobre las células con muchas mitosis como las del intestino, gónadas y órga-

nos hematopoyéticos en cuyos centros germinativos, incluidas las placas de Peyer hay cariorrexis causando anemia, trombopenia y leucopenia.

Los tricotecenos no lesionan directamente a los ácidos nucleicos, ni causan mutaciones en los cultivos celulares (Busby y col. 1981), salvo a concentraciones superiores a las que inhiben la síntesis proteica, (Thompson y col. 1990); 0,0236-1,889 mmol de fusarenon-X por litro inhiben a la ARN polimerasas ADN dependientes del hígado de la rata (Tetrahymena pyriformis) pero curiosamente una concentración baja de toxina T-2 aumenta la ADN polimerasas, y las deoxinucleotidil transferasas. Como consecuencia disminuye la síntesis del ADN, reduciéndose la incorporación de timidina al ADN en células de línea (Tashiro y cols. 1979), y la del ARN (se inhibe un 85% la síntesis del ARN en células HeLa, pero solo el 15% en las Vero.

Entre las proteínas cuya síntesis esta disminuida tenemos los factores de la coagulación. La toxina T-2 disuelta en DMSO inyectada intravenosamente al conejo, disminuye en el 40% los factores VII, VIII, IX, X y XI a las seis horas con aumento del fibrinógeno a las 24 horas, sin repercusión clínica y sin que la vitamina K redujera el efecto. Cosgriff y cols. (1986), encontraron que la toxina T-2 disuelta en etanol inyectada intramuscularmente a diferentes intervalos al Cynomolgus, alargaba a las pocas horas, el tiempo de protrombina, el tiempo de activación de la tromboplastina y disminuía los factores de la coagulación que se normalizaban a los tres días, sin que se degradara la fibrina-fibrinógeno y sin que llegara a producirse el síndrome hemorrágico; en la autopsia se encontraron petequias en el colon y en el corazón, así como necrosis de tejidos linfoides. La trombopenia unida a la disminución de los factores de la coagulación determina la producción de hemorragias generalizadas, cutáneas, meningeas, hemoptisis, hematemesis, cuadro que no causa la iperita.

Al menos algunos tricotecenos inhiben la síntesis de anticuerpos, el rechazo de aloinjertos, la hipersensibilidad retardada y la respuesta blastogénica a las lectinas y como consecuencia disminuye la resistencia a infecciones. Tryphonas y cols.(1986) encontraron en cerditos destetados a los que habían dado diariamente durante 25 días 5 mg/kg de toxina T-2 una disminución del 40-50% de la respuesta inmune evaluada por la transformación blastica, la formación de rosetas inmunes y células IgG positivas así como la cifra de leucocitos. La administración de 2, 5, o 25

mg/kg de DON en la dieta durante 2 o 8 semanas, deprime la formación de placas de cultivos de bazo con hematíes de oveja en ratones B6C3Fl. La Toxina T-2 disminuye la producción de anticuerpos estimulados por la vacunación contra la enteritis B. Es decir que la toxina T-2 tiene un efecto inmunosupresor ya al comienzo de la inducción de la respuesta inmune por alteración de los linfocitos B y T.

El Fusarenon X, es un potente inmunosupresor que inhibe la producción de lgG, de lgE, de anti-DNA, y la respuesta de los linfocitos a los mitógenos. El Fusarenon-X deprime la respuesta proliferativa de las células T a los mitogenos, en menor grado a los mitogenos de B e inhibe la formación de anti-DNP, IgE e IgG. Inyectado intraperitonealmente a ratones BALB/c (Másuda y cols. 1982), deprime la formación de anticuerpos monoclonales por parte de linfocitos esplénicos en respuesta al mitógeno pokeweed (PWM) inhibe la actividad de las células sin Ig superficial, que comprende principalmente linfos T y un pequeño número de células no linfos. La toxina T2 y el diacetoxiscirpenol, son también inmunosupresores de la formación de Ig y del rechazo de injertos en ratón. La inmunosupresión y la leucopenia favorecen las infecciones secundarias especialmente las septicemias, a los que contribuye el aumento de actividad adrenocortical. (Rafai y Tuboly 1982). El factor activador de las plaquetas, es un importante mediador de la acción tóxica de T-2.

Los tricotecenos y concretamente la toxina T-2 por su carácter anfofílico, peroxida a los lípidos de las membranas de las células de hígado, riñón, bazo, timo (Bunner y col. 1988) y médula ósea (Suneja y cols. 1989).

Los tricotecenos actúan también sobre la membrana de las mitocondrias, (Pace y cols. 1988) inhibiendo el sistema de transporte de electrones de muchas células eucariotas, contribuyendo a la citotoxicidad. También inhiben a la succinil dehidrogenasa.

La destrucción de células, sea cual fuere su causa, activa el ciclo celular y con ello el riesgo de cancerogénesis. El extracto acuoso de cebada contaminada con el Fusarium sporotrichioides es blastogénico para el ratón, apareciendo en el suero de este animal α-fetoproteina aunque se creía que en los hepatomas causados por las micotoxinas no había α-fetoproteina. (Akhmeteli y cols. 1972).

Patología en animales

Los tricotecenos pueden causar epizootias muy graves. Los animales domésticos especialmente en Centroeuropa, sufren brotes de un grave y letal proceso diarreico con vómitos, hemorragias intestinales, en serosas, en mucosas y submucosas con gran alargamiento del tiempo de protrombina, rechazo de la comida, pérdida de peso, necrosis cutánea, debilidad, hinchazón de genitales y muerte. Atribuido inicialmente al Bacterium pyosepticum viscosum que en 1929 se había encontrado en las excretas, y hocico de los animales por lo que se consideró una piosepticemia. Hoy se sabe que que el cuadro se debe a diversos tricotecenos, especialmente a la toxina T-2 contenidos en el heno o paja enmohecidos. Un importante brote que mató al 25% de las vacas de una granja se debió a centeno que contenía F.tricinactum y unos 2 mg de toxina por kg de peso seco.

En 1975 se produjo un brote por la toxina T-2 en diversos animales debido a cebada enmohecida. Los cerdos intoxicados, dejaban de comer y tuvieron vómitos y diarrea. Los caballos parecían deprimidos y tenían sialorrea. En los patos y gansos se apreció necrosis de la mucosa esofágica y del proventrículo. Vesonder y cols (1973) encontraron DON en el maíz que causó vómitos en cerdos. Sin embargo parece que la causa más frecuente son las satratoxinas G y H del Stachybotrys satra (Eppley y col. 1973). Es decir el cuadro es una botriotoxicosis.

A finales de los años treinta apareció en Ucrania un proceso letal en caballos; una comisión, curiosamente nombrada en 1939 por Kruschev, descubrió que los piensos estaban contaminados con Stachybotrys productores de tricotocenos. En 1982, el 8,1 % de las 1.200 ovejas de de una granja húngara murieron después de haber comido paja muy contaminada con Stachybotrys satra. Los extractos en metanol de la paja revelaron la presencia de satratoxinas G y H (Harrach y cols. 1983).

La toxicosis de los bóvidos se produce por piensos con centeno o maíz enmohecidos que bajan la protrombina llegando a causar un síndrome hemorrágico, Las terneras (Mann y cols. 1983), que ingieren con el pienso 0,6 mg de toxina T-2 por kg de peso durante 43 días presentaron disminución de las proteínas totales, de la albumina, y de las Ig. Pier y cols. (1976), dieron a 4 terneras 0,08-0,6 mg de toxina T-2 por kg de

peso oral en cápsulas durante 30 días. Con 0,6 la ternera muere a los 20 días con enteritis, úlceras en el intestino y en el rumen. A partir de una dosis de 0,16 mg/kg ya aparecen síntomas y de la de 0,32 hay melenas. La GOT estaban aumentadas en las terneras que recibieron dosis altas.

Rukmini y cols. (1980) dieron a tres rhesus adultos toxina T-2 pura en 20 ml de leche por intubación gástrica comenzando por 1 mg/kg durante 4 días y luego con 0,5 mg por kg de peso del animal durante ocho días. Todos los animales murieron por fallo respiratorio con síntomas semejantes a los de la aleuquia alimentaria humana, afectándose los músculos esquelético y miocardico; el cuadro fue más grave en los machos.

La Toxina T-2, y la Verrucarina A, causan extensas y graves hemorragias gastroentericas, así como marcado edema en el abomasum.

Intoxicaciones humanas causadas por tricotecenos

Las intoxicaciones naturales en el hombre se producen por la ingesta de alimentos contaminados por los hongos productores de los tricotecenos. Los efectos dependen de las cadenas laterales que tenga el esqueleto, del o de los tricotecenos ingeridos, de su concentración en los alimentos y de la dosis total recibida.

Dada la gran ubicuidad de los fusarium, es frecuente que el DON y el NIV se encuentren en el trigo, en las harinas y derivados, pero es raro que superen 1 mg/kg. El proceso de elaboración de los alimentos disminuye la concentración de tricotecenos. El centeno pierde en la molienda húmeda el 66% de la toxina T-2 de la que el 4% queda en el agua. Un 4% va al almidón y el resto se distribuye entre el germen, el gluten y la fibra cosa lógica dada la gran solubilidad de la toxina T-2. Lo mismo ocurre con el DON, el cual se concentra en el germen que se usaba para pienso. El centeno se contamina fácilmente (Gilbert y cols 1983). El lavado y la molienda del trigo reducen la toxicidad en un 6 a 10%; La wortmanina se concentra más en el salvado que en la harina en cuyas fracciones se distribuye por igual. El cocinado de la harina, también reduce la concentración de toxinas en un 24 a 71 % (Abbas y cols. 1985), pero El-Banna y cols. (1983) no encontraron disminución de DON en pan egipcio. Las enfermedades debidas a tricotecenos son:

La Aleuquia aguda alimentaria o la panleucopenia, era un proceso epidémico que afectó a Rusia al menos desde comienzos del siglo XX (Joffe 1971): entre 1942 al 1947 mató a más del 10% de los habitantes de Orenburg. Esta aleuquia se debe al consumo de trigo, cebada y mijo, contaminados con tricotecenos, especialmente con la toxina T-2. (Yagen y cols. 1977). La enfermedad comienza con el cuadro agudo de la intoxicación por tricotecenos que comentamos posteriormente seguida de petequias en cara, gran leucopenia por neutropenia, que va dejando paso a linfocitosis marcada, atrofia folicular del bazo y ganglios y aumento de susceptibilidad a infecciones secundarias especialmente a las neumonías: la enfermedad era por ello más grave en los niños y ancianos o en personas con enfermedades debilitantes. Si la ingesta se prolonga aparece la coagulopatía, brotando en unas cuantas zonas un rash petequial rojo brillante o color cereza intenso, llegando en los casos graves a ulcerarse que luego se extienden; la afectación de la laringe causan gangrenas y muerte por sofocación. Se producen hemorragias en boca, nariz, estómago e intestino. La supresión del tóxico lleva a la curación al cabo de unos dos meses.

La stachybotriotoxicosis se ha señalado en granjeros de Rusia, Yugoeslavia y Hungria (Forgacs 1972, Hintikka 1977). Se debe, al menos en parte a la satratoxina producida por el Stachybotrys atra. (Eppley 1977). Croft y cols.(1986) describieron unos casos en USA en las personas que habitaban una casa dañada por el agua en la cual se desarrollaban una gran cantidad de S. atra.

La inhalación de polvo de algodón contaminado con verrucarina causada por el Myrothecium verrucaria (Dendrochium toxicum), produjo un cuadro pulmonar (Jarvis 1991).

En Japón, especialmente en su costa oriental y en las afueras de Tokio, se presenta la enfermedad por el «moho rojo» causada por nivalenol, el deoxinivalenol, y el monoacetil-nivalenol (fusarenon-X) del Fusarium nivale, desarrollado sobre cereales especialmente en el arroz. La distribución geográfica podría ser debida al empleo de técnicas muy sensibles para determinar tricotecenos.

Los tricotecenos pueden causar cuadros del tipo de los del edificio enfermo. Croft y cols. (1986) encontraron los macrocíclicos, satratoxina H, verrucarinas B y J y tricoverrinas A y B, en el polvo del aire captado

en una casa en Chicago, en la que sus moradores padecían varios procesos recurrentes entre ellos catarros y dermatitis.

Los trabajadores expuestos a heno o al polvo de los silos con stachibotris sufren una enfermedad profesional, caracterizada por irritación e inflamación intensa de la piel (Forgacs 1972) que tardan en curar más de una semana, cuadro que tienen los que trabajan con hongos productores de tricotecenos (Bamburg y cols. 1968), aunque se trate de toxinas con baja toxicidad como la crotocina y la tricotecina. Basta una gota (unos 10 µg)de una solución en acetato de etilo de Toxina T-2 para causar una intensa irritación de la piel, aunque se lave enseguida la zona con detergente.

Repetidas inyecciones intravenosas han causado una intoxicación crónica de DAS. para tratar el adenocarcinoma.

Uso militar

Las características de los tricotecenos que los hacen candidatos para su utilización ofensiva son: obtenibles con relativa facilidad, es factible adecuarlos como arma; se pueden dispersar como aerosoles o en el agua o en los alimentos. Son estables especialmente la toxina T-2 y por ello son persistentes permaneciendo mucho tiempo en el terreno así como en vestidos e incluso en la piel y son difíciles de detectar en el teatro de operaciones. Se pueden aplicar como polvo, gotas, aerosoles desde aviones o por proyectiles de artillería, mísiles, cohetes, minas, incluso por aparatos portátiles productores de sprays. Aunque son menos tóxicos que la toxina botulínica, bastan nanogramos de la toxina T-2, la que se piensa que es la más adaptable a uso bélico, el deoxinivalenol, el diacetoxiscirpenol para causar irritación y hasta necrosis de piel y mucosas, nauseas, vómitos, debilidad, hipotensión (Wannemacher y cols. 1985). La exposición a aerosoles con alta concentración de tricotecenos mata a al ratón, a la rata, al cobaya al cabo de 1-12 horas sin afectar al pulmón. El cuadro clínico que tendrían los afectados deducido de las necropsias y de los datos recogidos en afectados en Vietnam, Laos, Camboya y Afganistán, depende del modo de dispersión, del vehículo utilizado para ello, de la concentración ambiental, de la dosis recibida, de las condiciones climáticas, del estado de salud, especialmente nutri-

cional del afectado etc. lo cual significa que los cuadros clínicos de los intoxicados pueden ser muy variables.

La piel que contacta con los tricotecenos sufre lesiones, entre los cinco minutos a varias horas; aparecen áreas de eritema, que puede ser generalizado y acompañarse de picor, sensación de quemadura, comezón y aun de dolor. Se han señalado manchas rojas esparcidas, evanescentes, que pueden pasar a pápulas rojizas, y luego a vesículas, a veces grandes, que posteriormente se tornan negras y con costras, o bien se ulceran tardando meses en cicatrizar Los tricotecenos son vesicantes primarios ya que concentraciones bajas irritan intensamente el ojo y la piel y con mayores incapacita y matan al cabo de unos minutos a horas.

En los casos graves se desprenden amplias zonas de piel, como una quemadura. Las máculas y las úlceras pueden afectar a la boca. El cuadro cutáneo se asemeja al causado por la iperita aunque las micotoxinas actúan más tardía y extensamente. Lógicamente, la lewisita causa un cuadro semejante al de las micotoxinas pero las lesiones aparecen al cabo de unos minutos y las hemorragias internas son menos frecuentes. La oxima fosgeno causa efecto inmediato sobre el ojo y la piel y origina pocas hemorragias internas. La entrada respiratoria puede causar edema agudo de pulmón.

Los tricotecenos se pueden absorber, aunque lentamente a través de la piel intacta y más rápidamente cuando está irritada. La mayor concentración tisular se alcanza entre las 1-4 horas después de la exposición.

En el Sudeste asiático los testigos informaron que las agresiones por tricotecenos fueron utilizados por sprays diseminados por helicópteros, por bombas y mísiles aire-tierra que producían nieblas amarillentas, polvos como los que se producen al diseminar plaguicidas. Los aspersores de uso agrícola producen aerosoles cuyas partículas de 1 a 5 μm, tienen poca eficacia (Spertzel y cols. 1993) pero se pueden obtener aerosoles muy eficientes.

Los afectados en el Sudeste asiático en los años 1970 comenzaron a sentir los síntomas a los pocos minutos de haber explotado la bomba aérea, o el misil liberadores de nieblas de gotitas oleosas amarillas caídas en un radio de 100 m, niebla que al ser directamente in-

halada, deglutida y especialmente la depositada en la piel, o indirectamente desde los vestidos, terreno, agua y alimentos, causaron cuadros agudos y la muerte de personas y animales. Concentraciones altas de tricotecenos en aerosol, pueden matar entre unos minutos a horas. La LCt_{50} de la toxina T-2 inhalada es de 200 a 5.800 mg•min/m^3, similar al de la iperita o al de la lewisita cuyas LCt_{50} son de 1.500-1.800 mg•min/m^3 La DL_{50} de la toxina T-2 por vía cutánea oscila entre 2 a 12 mg/kg, superior al de la lewisita liquida (DL_{50} de unos 30 mg/kg o al de la iperita líquida cuya DL_{50} es de unos 100 mg/kg.La letalidad depende de la especie intoxicada y de la vía de intoxicación (Marrs y cols. 1986, Creasía y cols. 1987, 1990). La letalidad de la toxina T-2 por aerosol es 10-50 veces mayor que inyectada.(Creasía y cols. 1987).

Concentraciones mínimas de tricotecenos especialmente de la toxina T-2, causan intensa irritación ocular (Stahl y cols. 1985), queratitis y eritema, edema, vesículas y necrosis. (Seagrave 1981.Ember 1984). La toxina T-2 es mucho más potente que la iperita para causar lesiones cutáneas (1 ng de toxina T-2 equivale a 400 de iperita). (Bunner y cols. 1985). 0,1 a 0,2 DL_{50} causan vómitos y diarrea.

Episodios del empleo de tricotecenos como agresivos

Después de la guerra, de Vietnam, (1975-1981) la etnia Hmong que había presentado una gran resistencia contra las tropas comunistas del Pathet Lao y del gobierno vietnamita, colaboraron con USA en la guerra contra el Vietcong y contra él.»Ejército de Liberación del pueblo laosiano. «Los soviéticos atacaron a los campesinos Hmong, que vencidos en Phou Bia, (Laos) siguieron oponiendo cierta resistencia aunque muchos se acogieron a las tropas vietnamitas de ocupación. En los ataques fueron utilizados los tricotecenos además del fosgeno, de la oxima del fosgeno, de la iperita, del sarín, somán, y hasta del BZ, aisladamente o en mezclas incluso con tricotecenos, por las tropas soviéticas y sus aliados, en Laos y Camboya según informes de Haig (1982), Rosen y col. (1982), Mirocha y cols. (1982, 1983) Greenhalgh y cols. (1985), entre otros, desde 1974 a 1981.

A partir de 1976, los Hmong, denunciaron haber sufrido agresiones químicas tanto en sus tropas como en poblados. Equipos médicos del ejército americano e internacionales fueron enviados a Tailandia, ya que no podían acceder a las zonas estancadas de Laos, pero no llegaron a una conclusión definitiva del empleo de agresivos químicos ya que habían transcurrido semanas hasta que los afectados fueron examinados.

Los Hmong refugiados en Tailandia huyendo de la tremenda situación en que estaban en Camboya explicaron que habían sufrido ataques, desde 1978 y comienzos de los años 1980, debidos en un 82%, a aviones que lanzaron sprays líquidos espesos, humos de varios colores polvo y bombas con agresivos químicos que mataron a muchas personas de sus pueblos, al recibir una lluvia (ya que hacía el sonido de esta) amarilla a lo que se debió el famoso nombre de «yellow rain» acuñado por periodistas occidentales; se atribuyó el color, al pigmento producido por los hongos, en realidad a los cristalitos de tricotecenos, o al extracto crudo de especies de Fusaria cultivadas: también se llamó «medicina caída del cielo» no en el sentido de medicamento sino de substancias con gran actividad. En algunos casos la «lluvia» era roja, blanca, verde o parda. Las gotas se secaban enseguida, dejando un polvo amarillento.

El Dr. Harruf que había atendido durante el primer semestre de 1980 a refugiados indochinos en el importante campo de refugiados de Ban Vinai en Tailandia; vió a numerosos pacientes que se quejaban de procesos pulmonares con las mismas características que las de la stachibotriotoxicosis, que les habían aparecido después de haber sido atacados en Laos con agresivos químicos lanzados por los vietnamitas.

Los norvietnamitas en Camboya emplearon municiones de mortero de 60 mm, cohetes de 107 y de 120-mm, granadas M-79 bombas etc conteniendo agresivos químicos así como lanzaron ataques con aviones T-28 (1979-1981) que dispersaban aerosoles de agresivos proporcionados por la URSS, contra las tropas del «Khmer Rouge». En las personas expuestas a la lluvia les aparecieron enseguida, síntomas incapacitantes, necrosis extensas de la piel, hemorragias profusas con pérdida de sangre por todos los orificios y muerte rápida. Los tricotecenos se habían dispersado disueltos en un solvente volátil, generalmente por vía aérea sobre distintas zonas incluyendo pueblos. Se calculó que se habían efectuado 226

ataques con tricotecenos en Laos, que ocasionaron al menos 6.310 muertes y 124 ataques en Camboya que produjeron 981 muertes.

El Dr. Harruf estaba convencido de la veracidad de las denuncias de los Hmong y en 1983, después de haber salido de Tailandia, propuso que se investigaran las alegaciones así como las secuelas que hubieran persistido.

En marzo de 1981, un grupo de la resistencia de los Hmong recogió un polvo amarillento de la de la superficie de un tallo de bambú, afirmando que había causado la muerte de muchos de sus vecinos a varios kilómetros al sudeste de Ban Long Tien, pueblo del área de Phou Bia, en un vial de cristal y lo llevó al campo de refugiados en Tailandia llamado Ban Vinai. Un Hmong le dio a un médico del equipo médico, americano una muestra de esta sustancia. El vial fue recogido por Charles Whitney, administrador del Hospital de Ban Vinai, quien a requerimiento de la American Broadcasting Company News División la llevó a Tittle (USA), en donde por encargo de la ABC News, un técnico dividió la muestra en dos partes, dando una al doctor Jarvis, de la Universidad de Maryland, y otra a la Rutgers University. Se encontró que la muestra tenía 48 ppm de la toxina T-2, 42 ppm de diacetoxiscirpenol, 58 ppm de deoxinivalenol. 265 ppm de zearalenona, composición que no se encuentra en la naturaleza, pues los hongos que producen un determinado tricoteceno, sintetizan escasa cantidad de los otros. Además el toxicólogo canadiense Bruno Schiefer señaló en 1982 que los tricotecenos no se forman naturalmente en el sudeste asíático en cantidad suficiente para producir enfermedad (producen afiatoxina, ocratoxinas y zearalenona en Tailandia y probablemente en países limítrofes).

La muestra tenía polen, parte del cual procedería de las abejas, por lo que algunos pensaron que se trataría de un fenómeno natural. La lluvia amarilla serían las heces de abejas sudorientales, y el color amarillo, el del polen, sobre el cual se habrían desarrollado los Fusarium. Marshall (1983), Nowicke y cols. (1984), Seeley y cols. (1985), Dashek y cols. (1986) atribuyeron la lluvia amarilla a las heces de las abejas desprendidas de ellas en sus vuelos de limpieza, a las que se uniría parte del polen recogido: pero los análisis efectuados en las heces de áreas no atacadas no contenían micotoxinas, y que no hubo intoxicados ni muertes en

expuestos a heces de abejas y que en el sudeste asiático las abejas han existido siempre.

Hay que recordar el crujido como de gotas de lluvia al caer originado por la lluvia amarilla, sonido que no hacen las heces de abeja y sobre todo que la muestra contenía, según Rosen (1982) polietilenglicol, sustancia no natural usada como vehículo de insecticidas. El polen se habría adherido a las gotitas de tricotecenos dispersadas desde los aviones. El clima cálido del sudeste asiático no es el más propicio para que los hongos produzcan tricotecenos, aunque los Hmong vivían en montañas.

La URSS presentó a la ONU un informe de científicos soviéticos que atribuía el síndrome a que por la desfoliación causada por USA, permitió que se desarrollaran hongos productores de tricotecenoas en el Sudeste asiático que antes no se desarrollaban allí. El F. semitectum var semitectumen encontrado sobre hojas del sudeste asiático no produce tricotecenos ni se han encontrado estos en los alimentos de estas regiones y por otro lado en las hojas en las que había depósitos de lluvia amarilla no había Fusarium. Sin embargo Rosen y col. (1982), hallaron tres tricotecenos sobre muestras de hojas; Mirocha (1982), especialista en micotoxinas de la Universidad de Minnesota, encontró en una muestra vegetal de Kampouchea 109 ppm de nivalenol, 59,1 ppm de DON y 3,15 ppm de T-2. Norman y Purdon, expertos canadienses en NBC, hicieron un informe en 1982 sobre los análisis de muestras tomadas en el sudeste asiático. En hojas encontraron pequeñas cantidades de DAS, HT-2, y aunque en el ambiente cálido del sudeste asiático se hallan los ubicuos Fusaríum, la presencia simultánea en una misma hoja de los tres tricotecenos indica que no son de origen natural. En el contenido de una bolsa de plástico recogido dos años antes y que se piensa que se pudo haber utilizado para diseminar el agente, había entre 52 a 117 ppm de HT-2, 85 a 230 ppm de T-2, aun cuando los servicios de Agricultura canadiense sólo hallaron un año después 6,0 y 6,3 ppm. Piensan que las diferencias se deberían al tiempo transcurrido y a la poca homogeneidad de la muestra, pues la analizada por los investigadores tenía más puntos amarillos y menos pardos que la analizada por el Servicio de Agricultura. El microscopio electrónico de scanner demostró que el polvo amarillo de las hojas era polen, mientras que los del saco

estaban formados por polvo amorfo sin polen. En un ensayo preliminar de polvo de una hoja, el servicio canadiense de Agricultura detectó también altas concentraciones de DON (6 a 26 ppm), HT-2 (11-15 ppm), y T-2 (310 a 355). Los análisis subsiguientes con espectrometría de masas no confirmaron esto, lo que podría ser debido a la destrucción de la toxina tras el tiempo transcurrido.

Durante mucho tiempo hubo gran escepticismo por parte del Departamento de Estado ya que los síntomas relacionados no se asemejaban a los de los agresivos químicos conocidos, ninguno de los cuales se había encontrado en ninguna muestra. En agosto de 1981, con escasas pruebas el Departamento de Estado informó del hallazgo de tricotecenos en plantas de Laos y señaló las similitudes de los efectos producidos por estas substancias, con los que presentaban los Hmong. Lo confirmaron los análisis efectuados en sangre y tejidos de afectados de Laos y Camboya por organismos gubernamentales y privados de USA. En ello se basó Estados Unidos para acusar a la URSS de haber empleado la 'lluvia amarilla» en Laos y Kampuchea (Dashek y cols. 1983). Stahl y cols. (1985) encontraron en victimas de la lluvia amarilla autopsiados a las 24 a 48 horas de haber sido atacados, una grave gastroenteritis hemorrágica en la parte distal del esófago, estómago y duodeno.

Un estudio realizado por el Grupo toxicológico de la Universidad de Saskatchewan (Canadá) por encargo del Ministerio de Asuntos Exteriores, sobre tropas del Khmer rojo afirmaba en 1986, que los soldados que estaban entre los 100 y los 300 m de donde habían caído proyectiles de artillería tuvieron a los 2 a 5 minutos después lagrimeo, visión borrosa, sensación de quemadura síntomas similares a los de la stachibotriotoxicosis, enfermedad que no se presenta en el sudeste asiático; en uno de los tejidos obtenidos en la autopsia se halló T-2, HT-2 y diacetoxi-scripenol, concluyendo que se habían utilizado agresivos químicos.

Un informe epidemiológico presentado al Surgeon General del Cuartel General de la Defensa, de Canadá concluyó que se habían usado agresivos químicos contra tropas no protegidas y contra civiles y acusaba a los científicos que dijeron encontrar tricotecenos, de haber contaminado deliberadamente las muestras. Hay que señalar que los

análisis ambientales, efectuados en Porton Down en 1986 fueron negativos. Pero como reconocieron los ingleses las muestras fueron recogidas mucho tiempo después de haberse producido los ataques. Después de varias denuncias por parte de USA, NU envió a un grupo de expertos; en 1981, un año después de haberse constituido el grupo durante el cual hizo una breve visita al campo de refugiados, elaboró un informe sin resultados concretos; En diciembre de 1982 presentaron un segundo informe después de haber visitado campos de refugiados en Paquistán y Tailandia y aunque tampoco el informe fue concluyente, esperable después del tiempo transcurrido, el informe, apoyado en datos circunstanciales concluyó que se habían usado agresivos químicos. En ninguna de las muestras recogidas por el grupo en el campo de refugiados se hallaron tricotecenos quedando sin explicar su presencia en las muestras estudiadas por USA, rechazando las explicaciones soviéticas sobre la presencia de tricotecenos. En 1985 Stahl y cols. comprobaron la presencia de mezclas de tricotecenos. Podemos resumir que aunque no hay plena seguridad, los indicios apoyan fuertemente el uso deliberado de tricotecenos para atacar tropas y civiles en Laos, Camboya y Tailandia basándonos en las descripciones de las victimas supervivientes, la clínica que presentaron; correspondía con el efecto de los tricotecenos, el hallazgo sobre plantas, piedras y plásticos de tricotecenos y de mezclas no naturales de ellos (Watson 1984); el hallazgo de tricotecenos en el 10% de 50 muestras ambientales, y en el 32% de 60 muestras de sangre y tejidos de afectados, frente a solo el 2% (Marshall 1986), encontradas en los habitantes de zonas no atacadas, procedentes en este caso de los alimentos, unido a los informes de los servicios de inteligencia, los epidemiológicos, los interrogatorios de los aviadores laosianos y de oficiales nortvietnamitas prisioneros de guerra, la presencia de técnicos rusos, el hallazgo de substancias fabricadas en la URSS y para terminar la rehúsa de Rusia a discutir estos hechos.

Los tricotecenos podrían haberse empleado por las fuerzas soviéticocubanas de Angola. Seagrave (1981) recogió el rumor de que, disponían de micotoxinas y que había fallecido un agente cubano como consecuencia de un síndrome hemorrágico causado por ellas. Se acusó a los egipcios o a los soviéticos de haber empleado tricotecenos contra el ejercito del Reino del Yemen (Ricaud 1983).

IRAK-IRÁN

En la guerra Irán-Irak se emplearon tricotecenos junto a la iperita en 1983-1984. (Ember y col 1984). Heyndrickx y cols. (1984) y Vycudilik y col (1984) identificaron Iperita, T2, HT2, nivalenol y verrucarol, en sangre, orina y heces de iraníes hospitalizados en Viena víctimas de ataques con agresivos químicos en la primavera de 1984 cerca de las islas Majnoun con fuertes quemaduras por vesicantes. Hubo informes semejantes de hospitalizados en Bélgica, Francia, Alemania federal, Suecia y Suiza, pero ninguno de ellos fue confirmado y en el caso de Suecia las autoridades rechazaron el informe correspondiente. El equipo de UN que inspeccionó los cadáveres de los iraníes fallecidos en Suecia no hizo estudio toxicológico de los mismos, pero no encontraron micotoxinas en armas ni el terreno, empleando una técnica capaz de detectar concentraciones de micotoxinas del 0,00005 por ciento. Heyndrickx catedrático de toxicología de la Universidad de Gante con sus colaboradores han repetido muchas veces que en su laboratorio han encontrado, en muestras de sangre, orina y heces de iraníes víctimas de agresivos químicos hospitalizados en Viena, además de iperita, T2, HT2, nivalenol y verrucarol pero no se hicieron estudios por otros equipos, y lo mismo ocurrió con enfermos hospitalizados en Bélgica, Francia, Hamburgo, Munich, Ewclinghausen, Lausana y Suecia, aunque las autoridades de este país rechazaron este informe. Heyndrickx encontró en muestras de 30 iraníes afectados en la isla de Majnoon en 1984, y en los atacados en Halabja el 19 de agosto tricotecenos, que no había en las de iraníes no afectados que habían comido los mismos alimentos y habían estado en el mismo campo de batalla. Sin embargo en las muestras obtenidas por la Misión de NU obtenidas en otros soldados iraníes afectados por agresivos químicos o en el contenido de proyectiles estudiados no se detectaron micotoxinas pese a que el método podía detectar concentraciones de 5.10^{-5}.

Algunos prisioneros de guerra, en Afganistán atribuyeron al ejército soviético haber bombardeado a las guerrillas de los mujahidines (1979-1981) causando 3.042 muertes con un tricoteceno, al menos tan potentes como los usados en el sudeste asiático, que se encontró sobre vegetales y en el filtro de la máscara antigás de un soldado soviético.

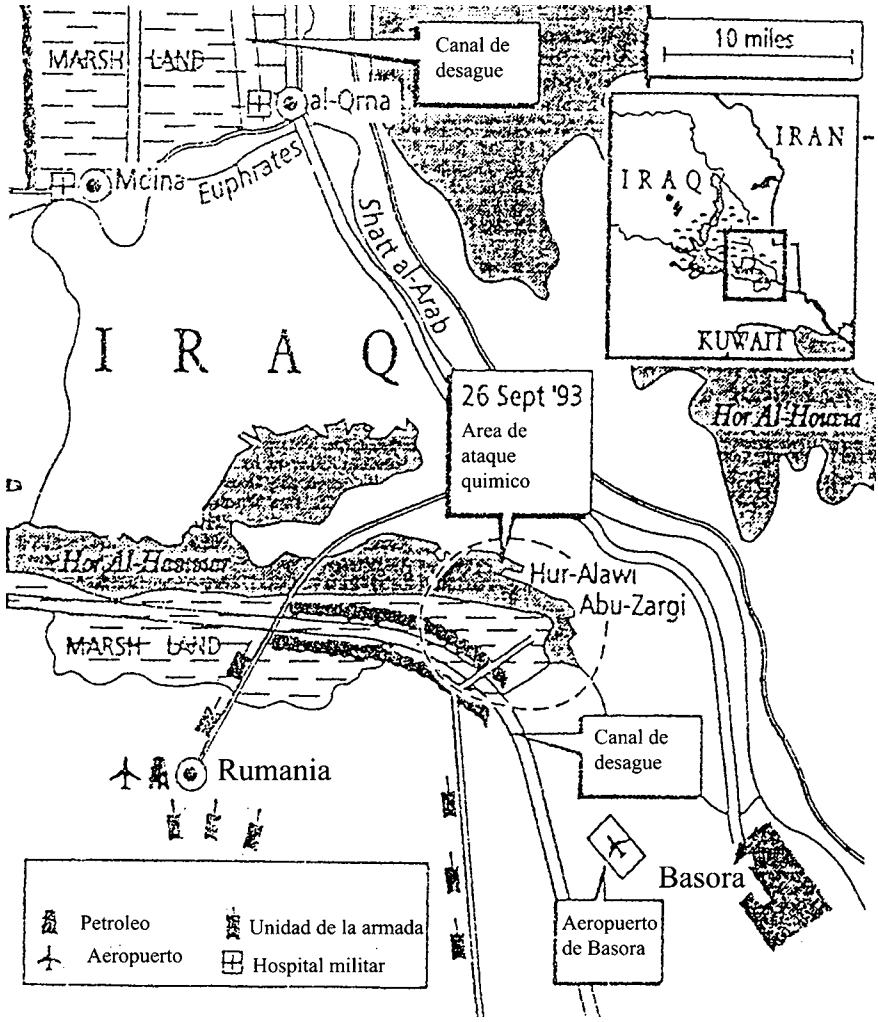


FIGURA 1. *Teatro de operaciones en el frente sur en la Guerra de Irán-Irak de 1993.*

Cuadros clínicos causados por los tricotecenos utilizados en la guerra

La gravedad depende de la cantidad ingresada, de la distribución temporal de la dosis ingresada, y del estado de nutrición y la del hígado, de la coexistencia de infecciones intestinales, del estrés etc. Hay que tener en cuenta que los afectados en el sudeste asiático tenían mal estado nu-

tricional y era zona con mucho falciparum, infecciones intestinales y hepatitis.

Los efectos dependen fundamentalmente de la toxina sistémica como lo demuestra la clínica de los afectados, los resultados de la inyección venosa a animales y el tratamiento con DAS intravenoso del adenocarcinoma de colon humano, aunque lógicamente la puerta de entrada focaliza más en ella las lesiones.

La afectación cutánea causa inflamación eritematosa quemante, sobre la que pueden aparecer vesículas y necrosis sobre una piel endurecida; puede haber petequias y equímosis con picor, sensación de quemadura, dolor o ambos. La aplicación cutánea de solución alcohólica de toxina T-2 a la piel de cobaya carente de pelo, hace aparecer ulceraciones, a las 12 horas, que eran máximas a las 24 horas regresando para desaparecer los 15 días.

Si la entrada fue respiratoria, se produce irritación de las fosas nasales y garganta, con picor, dolor, rinorrea, epístaxis, dolor de garganta, cambio de voz o afonía; la afectación de la traquea causa tos, disnea, por las narinas y boca cae un líquido sanguinolento, pero puede haber epístaxis, hemoptisis, y hematemesis, dolor u opresión torácica o ambas.

En la exposición oral y hay que recordar que van al aparato digestivo parte de los tricotecenos inhalados, se producen lesiones dolorosas de la boca; las encias se hinchan y sangran; la afectación de la parte superior del tracto gastrointestinal, con la excitación del centro emético causan nauseas y vómitos. Luego aparecen lesiones gástricas e intestinales, que producen diarrea al principio acuosa, luego sanguinolenta, dolor abdominal con hematemesis y melena.

La instilación en el saco conjuntival del conejo de roridina y verrucarina A produce al cabo de 1 a 2 días enrojecimiento y edema y después la cornea se opacifica y se forman úlceras y cicatrices que persisten cinco meses (Mortimer y cols. 1971). Si los tricotecenos contactan con el ojo, se produce conjuntivitis y queratitis, con lagrimeo, sensación de quemadura y visión borrosa que persiste más de una semana incapacitando a los afectados, sin que se produzca intoxicación sistémica.

Los tricotecenos lesionan a las células en mitosis por lo que se afectan mucho los sistemas hematopoyético, inmune y reproductor. Las alteraciones del SNC causa anorexia, cansancio, nauseas, letargia, vértigo y descoordinación. Las alteraciones vasculares causan hipotensión y shock. El 71% del conjunto de los afectados en Vietnam (Ember 1984) Camboya (Stahl y cols. 1985) en Afganistan Haig 1982) tuvieron vómitos, el 54% diarrea, hemorragias el 51%, el 48 % disnea, el 44% irritación de la piel MÁS un 30% con eritemas o vesículas. Los pacientes graves presentan hipotermia e hipotensión con taquicardia, temblores convulsiones, coma y muerte.

La creatininemia la creanquinasa sérica, el potasio, el fósforo y los aminoácidos están aumentadas, mientras que están disminuidos los factores de la coagulación salvo el fibrinógeno; elevado el tiempo parcial de tromboplastina y el de protrombina. Inicialmente suele haber neutrofilía con linfocitosis durante unas horas, para ir disminuyendo luego los linfocitos y después todos los elementos formen de la sangre.

Prevención frente a la agresión con tricotecenos

En el teatro de operaciones, los tricotecenos no son detectables organolépticamente. Se puede sospechar una agresión con tricotecenos si se presentan varios afectados, con síntomas semejantes y compatibles con una intoxicación con estas substancias que pudiera coincidir con mortalidad de animales domésticos o salvajes de la zona y si coincide con un ataque como puede ser la caída próxima de proyectiles, mísiles, o bombas aéreas, cuyos proyectiles se abren sin explotar.

Podrían ser útiles los equipos comercializados de inmunoensayos para las toxinas T-2, el deoxinivalenol y para sus metabolitos en cultivos de hongos y en alimentos (Chiba y cols. 1988, Hart y cols. 1988). Se ensayan ELISA, anticuerpos monoclonales. la cromatografía en capa fina de gas, líquida de alta eficiencia y espectrometría de resonancia nuclear, especialmente la de masas que sería el método de elección para caracterizar, identificar cuantificar y confirmar los tricotecenos. Kostiainen y cols. (1991) propusieron la cromatografía de masas de alta resolución por bombardeo de átomos rápidos

La bentonita o las resinas de intercambio de aniones y de cationes o vetmiculita o hidrobiotita, adicionadas experimentalmente a alimentos con tricotecenos reducen su toxicidad; la esmectita es un arcilla compuesta por silicatos de aluminio, de magnesio, incubados con toxina T-2 durante 24 horas y luego administrada oralmente al ratón (1 mg/kg al día), evita la aceleración del vaciado gástrico y del tiempo de tránsito de leche que suele inducir la administración de toxina T-2. La administración de esmectita con la toxina T-2 no impide los efectos gastrointestinales de esta (Fioramonti y cols. 1987).

El uso inmediato de máscara cuyo filtro retenga partículas mayores de 3 micras y de traje protector, retiene entre el 2 al 7% de los aerosoles de tricotecenos. Si hay la posibilidad de haber estado ya expuesto se debe quitar el uniforme (BDU), descontaminar al expuesto, ponerse el traje protector y la máscara y si es posible separarse de la zona contaminada o que se teme vaya a serlo.

Tratamiento y Prevención

No hay especifico; terapia sintomática. Experimentalmente se estudian substancias que disminuyen la letalidad de animales, pero no se han ensayado en primates

Después de la exposición oral o por aerosoles debe administrarse carbón superactivado del que 1 mg capta 0,48 mg de toxina T-2; dado a ratones en la primera hora después de la agresión oral o parenteral aumenta la supervivencia (Fricke y col. 1990); al carbón se le puede adicionar sulfato magnésico.

La irritación respiratoria se puede tratar con la inhalación de vapor de agua, codeína y si hay distrés respiratorio vigilancia en UVI. Los gluco-corticosteroides sistémicos a dosis altas aumentan la supervivencia al disminuir las lesiones y el shock (Shohami y cols 1987). La prednisona, la prednisolona y la dexametasona y mejor el urbasón oral, rebajan la inflamación y reducen la leucocitosis que aparece después de administrar la toxina T-2 y el shock. También disminuyen la letalidad el antihistamínico hidramina y el antagonista de los opiáceos naloxona.

Probablemente el pretratamiento con flavonoides, selenio, vitaminas C y E, emetina (Leatherman y cols. 1993) al disminuir la unión de los tricotecenos con las células reducen la toxicidad aguda de las micotoxinas pero no se han ensayado en el hombre.

El BN 52921, antagonista del factor activador de las plaquetas alarga la supervivencia de ratas expuestas a dosis letales por vía venosa de la toxina T-2. (Feuerstein y cols. 1987). Podrían ensayarse las substancias que aumentan la glucuronización como el metiltiazolidina -4-carboxilato. El antihistamínico difenidramina y el antagonista opiáceo naloxona mejoran la supervivencia del ratón expuesto (Ryu y cols. 1987)

Se estudian vacunas contra los diversos tricotecenos conjugados con un carrier que son menos irritantes que la toxina sin copular (Chu 1986). El conjugado deoxy- verrucarol- proteína inyectado a conejos producía rápidamente anticuerpos, muy específicos de este preparado. Hay vacunas anti-idiotipo contra la toxina T-2, que protegen al ratón (Chanh y cols. 1991). Se han obtenido anticuerpos monoclonales contra la toxina T-2 que protegen a células cultivadas contra la citotoxicidad de esta toxina.(Feuerstein y cols 1985), Chanh y col. 1991) y evita la muerte de las ratas inyectadas con una dosis letal de toxina T-2 si se administra entre los 20 minutos antes y 15 después.

La inhibición de la síntesis de enzimas que intervienen en la conjugación de xenobióticos aumenta la toxicidad. Se buscan substancias que reduzcan la toxicidad aguda de la toxina T-2 en la rata

BIBLIOGRAFÍA DE TRICOTECENOS

(1) ABBAS, H. K; MIROCHA, J.(1988) *Isolation and Purification of a Hemorrhagic Factor. (Wortmannin) from Fusarium oxysporum (N17B). Appl and Environ Microb*.54:. 1268-1274.

(2) ABBAS, H. K.; MIROCHA COAWLOSKY, R. J.; PUCSH, D.(1985) *Effect of cleaning milling and bakin ondeoxynivalenol in wheat. Appl. Environ Microb.* 500:482.

(3) AKHMETELI, M. A.; LOMMIK, I. A. B.; CERNOV, S.(1972) *Hepatocarcinogenesis and the appearance of serum alpha-fetoprotein in mice treated with extracts of barley grain infected with Fusarium sporotrichioides. Bull. OMS*.47;2947*.

(4) ANÓNIMO; (1986). *Yellow rain report. NBC Defense Technology International.* 1:11-12.

(5) ANÓNIMO; (1986) *Yellow rain: British analyses find no toxin. Nature.* 321:459.

(6) BAMBURG, J. R.; MARASAS, W. F. O.; RIGGS, N. V.; SMALLEY, E. B.;(1968) *Strong FM. Toxic spiroepoxy compounds from fusaria and other hyphomycetes. Biotechnol Bioeng.* 10:445-455.

(7) BUNNER, D. L.; MORRIS, E. R.;(1988) *Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: An important mechanism of action. Toxicol Appl Pharmacol.* 92:113-121.

(8) BUNNER, D.L.;(1985) *Upshall DG, Bhatti AR. Toxicology data on T-2 toxin. In: Report of Focus Officers Meeting on Mycotoxin Toxicity, September* 23-24; *Suffield, Alta, Canada: Defense Research Establishment at Suffield.*.

(9) BURMEISTER, H. R. (1971) *T-2 toxin production by Fusarium tricinactum on solid substrate. Appl Microbiol*. 21:739-742.

(10) Busby, W. F. JR.*;* WOGAN, G. N.;(1981) *Trichothecenes. In: Shank RC, ed. Mycotoxins and N-Nitroso Compounds: Environmental Risks. Vol 2. Boca Raton, Fla: CRC Press.*

(11) CHAKRABARTI, D. K.; NOSAL, S.(1986) *Ocurrence of free and conjugated 12,13 epoxi.trychotecenes and zearalenons in bananas fruits. Appl Environ Microb*. 91:217.

(12) CHANH, T. C.; SIWAK, E. B.;(1991) *Hewetson JF. Anti-idiotype-based vaccines against biological toxins. Toxicol Appl Pharmacol*.108:183-193.

(13) CHANH, T. C.; HEWETSON, J. F.;(1991) *Structure/function studies of T-2 mycotoxin with a monoclonal antibody. Immuno-pharmacology*.21:83-90.

(14) CHEN JEN-WEI; LUO YING-LING; HWANG MING-JING; PENG FU-CHUO; LING KUO-HUANG.(1999) *Territrem B, a Tremorgenic Mycotoxin That Inhibits Acetylcholinesterase with a Noncovalent yet Irreversible Binding Mechanism. J Biol Chem*, Vol. 274, Issue 49, 34916-34923, December 3.

(15) CHI, M. S.(1981) *El-Halawani MR,Waibel PE,Mirocha CL.Effects of T-2 toxin on brain cathecolamines, Poult Sc*. 61:187.

(16) CHI, M. S.; MIROCHA, C. I.; KURTZ, H. J. Y COLS.(1977) *Subacute toxicity of T-2 toxin in broiler*.Poult Sci. 56:306.

(17) CHI, M. S.; MIROCHA, C. I.; KURTZ, H. J. Y COLS. (1977) *Effects of T-2 toxin on reproduction and health of hens.Poult Sci* 56:628.

(18) CHIBA, J.; KAWAMURA, O.; KAJII, H.; OHTANI, K.; NAGAYAMA, S.(1988) *Ueno Y. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin with monoclonal antibodies. Food Addit Contam.* 5:629-639.

(19) CHU, F. S.(1991) Detection and determination of mycotoxins. In: Sharma RP, Salunkhe DK, eds. Mycotoxins and Phytoalexins. Boca Raton, Fla: CRC Press.

(20) CHU, F. S.(1986) Immunoassays for mycotoxins. En: Cole RJ, ed. Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. New York, NY: Academic Press.

(21) CHU, F. S.; ZHANG, G. S.; WILLIAMS, M. D.; JARVIS, B. B.(1984) *Production and characterization of antibody against deoxy-verrucarol. Appl Environ Microbiol.* 48:781-784.

(22) COLE, R. J.; COX, R. H.(1981) The trichothecenes. In: Cole RJ, Cox RH. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York, NY:Academic Press.

(23) Committee on Protection Against Mycotoxins, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Commission on Life Sciences, National Research Council. Protection Against Trichothecene Mycotoxins. Washington, DC: National Academy Press; (1983)

(24) CORLEY, R. A.; SWANSON, S. P.; BUCK, W. B.(1985) *Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine bile and urine. J Agric Food Chem.* 33:1085-1089.

(25) CORLEY, R. A.; SWANSON, S. P.;CULLO, G. J. Y COLS.(1986) *Disposition of T.2 toxin, a trichotecene mycotoxin in intravascular dosed swine. J agric Food Chem* 34:868.

(26) CREASÍA, D. A.; THURMAN, J. D.; JONES, L. J. Y COLS.(1987) *Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in mice. Fundam Appl Toxicol*. 8:230-235.

(27) CREASÍA, D. A.; THURMAN, J. D.; WANNEMACHER, R. W. JR; BUNNER, D. L. (1987) *Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in the rat and guinea pig. Fundam Appl Toxicol*. 14:54-59.

(28) CROFT, W. A.; JARVIS, B. B.; YATAWARA, C. S.(1986) *Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. Atmos Environ.* 20:549-552.

(29) COSGRIFF, T. M.; BUNNER, D. P.; WANEMACHER, R. W. Y COLS.(1984) *The hemostatic derangement produced by T-2 toxin in guinea pigs. Toxicol appl Pharmacol.*76:454.

(30) CROFT, W. A.; JARVIS, B. B.; YATAWARA, C. S.(1986) *Airborne outbreak if tricotecene toxicosis. Atmon Environ.* 20:549.

(31) DASHEK, W.V.; MAYFIELD, J. E.; LLEWELLYN, G. C.; O'REAR, C. E.; BATA, A.(1986) *Trichothecenes and yellow rain: Possible biological warfare agents. Bioessays*. 4:27-30.

(32) MARSHALL, E.(1983) *The apology of yellow rain. Science*. 221:242.

(33) EMBER, L. R.; SORENSON, W. G.; LEWIS, D. M.;(1984) *Charges of toxic arms use by Iraq escalate. Chemical and Engineering News.* 62:16-18.

(34) EMBER, L. R.;(1984) Yellow rain. Chemical and Engineering News. 62:8-34.

(35) EPPLEY, R. M.;(1977) *Chemistry of stachybotryotoxicosis. In: Rodericks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, eds. Mycotoxins in Human and Animal Health. Park Forest South, Ill: Pathotox Publishers* 285-293.

(36) EL.BANNA, A. A.;LAU, P. Y.; SCOTT, P. M.;(1983) *Fate of mycotoxins during processing of foodstuff.J food Prot*. 46:484.

(37) EPPLEY, R. M.; BAILEY, W. J.;(1973) 12,13 epoxy delta trichotecene as the probable mycotoxins responsable for stachybotriosis Science. 181:758.

(38) FORGACS, J.;(1972) *Stachybotryotoxicosis. In: Kadis S, Ciegler A, Ajl SJ, eds. Microbial Toxins. Vol 8. New York, NY: Academic Press* 95-128.

(39) FAN, T. S. L.; ZHANG, G. S.; CHU, F. S.;(1984) *An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin in biological fluids. Journal of Food Protection*. 47:964-967.

(40) FRICKE, R. F.; JORGE, J.;(1990) *Assessment of efficacy of activated charcoal for treatment of acute T-2 toxin poisoning. J Toxicol Clin Toxicol.* 28:421-431.

(41) FEUERSTEIN, G.; LEADER, P.; SIREN, A. L.; BRAQUET, P.;(1987) *Protective effect of a PAF-acether antagonist BN-52021 in trichothecene toxicosis. Toxicol Lett.* 38:271-274.

(42) FRICKE, R. F.; JORGE, J.;(1991) *Methylthiazolidine-4-carboxylate for treatment of acute T-2 toxin exposure. J Appl Toxicol*.11:135-140.

(43) FEUERSTEIN, G.; POWELL, J. A.; KNOWER, A. T.; HUNTER, K. W.;(1985) *Monoclonal antibodies to T-2 toxin: In vitro neutralization of protein synthesis inhibition and protection of rats against lethal toxemia. J Clin Invest*. 76:2134-2138.

(44) FIORAMONTI, J.; FARCEAS, M. J.; BUENO, I.;(1987) *Action of T-2 toxinon gastrointestinal transit in mice. Toxicol Letters* 36:227.

(45) GODTFREDSEN, W. O.; GROVE, J. F.; TAMM, CH.;(1967) *Trichothecenes. Hev Chim Acta.* 50:1666-1668.

(46) GREENHALGH, R.; MILLER, J. D.; NEISH, G. A.; SCHIEFER, H. B.(1985) Toxigenic potential of some Fusarium isolates from Southeast Asía. Appl Environ Microbiol. 50:550-552.

(47) GOODWIN, W.; HASS, C. D.; FABIAN, C.; HELLER- BETTINGER, I.; HOOGSTRATEN, B.; (1978) Phase I evaluation of anguidine (diace-toxyscirpenol,NSC-141537). Cancer. 4:23-26.

(48) GILBERT, J. M.; SHEPHERD, M. J.; HOWELL, M. V.;(1983) Studies on the fate of thichotecenes mycotoxina during food processing. European Conf on Food Chemistry.

(49) GUNTHER, R.; KISHORE, P. N.; ABBAS, H. K.; MIROCHA, C. J.;(1989) Inmmunosuppressive Effects of dietary Wortmannin on rats and mice.Immunopharmacology and immunotoxicology 11: 559-570.

(50) HARRUFF, R. C.(1983) Chemical Biological Warfare in Asía JAMA 250:496.

(51) HAIG, A. M. JR.(1982) Chemical Warfare in Southeast Asía and Afghanistan. Report to the Congress.

(52) HINTIKKA, E-L.(1977) Stachybotryotoxicosis as a veterinary problem. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, eds. Mycotoxins in Human Health. Park Forest South, Ill: Pathotox Publishers 277-284

(53) HOERR, F. J.; CARLTON, W. W.;(1982) Tuite J, Vesonder RF, Rohwedder WK, Szigett G. Experimental trichothecene mycotoxicosis produced in broiler chickens by Fusarium sporotrichiella var sporotrichioides. Avian Pathology. 11:385-405.

(54) HART, L. P.; PESTKA, J. J.; GENDLOFF, E. H.(1988) Method and test kit for detecting a trichothecene using novel monoclonal antibodies. US patent 4772551, September 20 1988. Off Gaz US Pat Trademark Off Pat. 1094:1518

(55) HOERR, F. I.; CARLTON, W. W.; YAGE, B.;(1981) Mycotoxicosis caused by a single dosis of T-2 toxin or diacetoxycispernol in broiler chiken. Vet Path. 18:653.

(56) JOFFE, A. Z. (1971) Alimentary toxic aleukia. In: Kadis S, Ciegler A, Ajl SJ, eds. Microbiol Toxins. Vol 7. In: Algal and Fungal Toxins. New York, NY: Academic Press. 139-189.

(57) JARVIS, B. B. (1991) Macrocyclic trichothecenes. In: Sharma RP, Salunkhe DK, eds. Mycotoxins and Phytoalexins. Boca Raton, Fla: CRC Press. 361-421.

(58) JOHNSEN, H.; ODDEN, E.; LIE O, JOHNSEN BA, FONNUM F. (1986) Metabolism of T-2 toxin by rat liver carboxylesterase. *Biochem Pharmacol*35:1469-1473.

(59) JEDERBERG, W. W.; FRUIN, J. T.; (1981) Primary Dermal Irritation Potential of Components of the M256A-1 Decontamination Kit (Study 8). San Francisco, Calif: Letterman Army Institute of Research. LAIR Technical Report 82-27TN.

(60) KEMPPAINEN, B. W.; RILEY, R. T.;(1884) *Penetration of [3 H]T-2 toxin through excised human and guinea-pig skin during exposure to [3 H]T-2 toxin adsorbed to corn dust.* Food Chem Toxicol. 22:893-896.

(61) KOSTIAINEN, R.; MATSUURA, K.; NOJIMA, K.; (1991) *Identification of trichothecenes by frit-fast atom bombardment liquid Chromatography-high-resolution MÁSs spectrometry. J Chromatogr*. 538:323-330.

(62) KUMAGAI, S.; SHIMIZU, T. (1988) *Effects of Fusarenon X and T-2 toxin on intestinal absortion of monosaccharide in rats.Arch Toxicol*. 61:489-495.

(63) LEATHERMAN, D. L.; MIDDLEBROOK, J. L.;(1993) *Effect of emetine on T-2 toxin-induced inhibition of protein synthesis in mammalian cells. J Pharmacol Exp Ther*. 266:741-748.

(64) MOSS, M. O.;(1989) *Mycotoxins of Aspergillus and other filamentous fungi. J Appl Bacteriol. 67(symposium suppl):*69S-81S.

(65) MIROCHA, C. J.;(1982) *Hazards of scientific investigation: Analysis of samples implicated in biological warfare. Journal of Toxicology-Toxin Reviews.* 1:199-203.

(66) MIROCHA, C. J.; PAWLOSKY, R. A.; CHATTERJEE, K.; WATSON, S.; HAYES, W.; (1983) *Analysis for Fusarium toxins in various samples implicated in biological warfare in Southeast Asía. J Assoc Off Anal Chem.* 66:1485-1499

(67) MARSHALL, E.(1986) *Yellow rain evidence slowly whittled away. Science.* 233:18-19.

(68) MARSHALL, E.;(1983) *Bugs in the yellow rain theory. Science.* 220:1356-1358.

(69) MARRS, T. C.; EDGINTON, J. A.; PRICE, P. N.; UPSHALL, D. G.;(1986) *Acute toxicity of T2 mycotoxin to the guinea-pig by inhalation and subcutaneous routes. Br J Exp Path.* 67:259-268

(70) MILLER, J. D.; TAYLOR, A.; GREENHALGH, R.;(1983) *Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by Fusarium graminearum. Can J Microbiol. 29:1171-1178.*

(71) MCLAUGHLIN, C. S.; VAUGHAN, M. H.; CAMPBELL, I. M.; WEI, C. M.; STAFFORD, M. E.; HANSEN, B. S. (1977) Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. In: Rodericks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, eds. Mycotoxins in Human and Animal Health. Park Forest South, Ill: Pathotox Publishers.

(72) MIDDLEBROOK, J. L.; LEATHERMAN, D. L.;(1989) *Specific association of T-2 toxin with mammalian cells. Biochem Pharmacol.*38:3093-3102.

(73) MATSUMOTO, H.; ITO, T.; UENO, Y.;(1978) *Toxicological approaches to the metabolites of fusaria, XII: Fate and distribution of T-2 toxin in mice. Japan Journal of Experimental Medicine.* 48:393-399.

(74) MORTIMER, P. H.; CAMPBELL, J.; DI MENNA, M. E.; WHITE, E. P.;(1971) *Experimental myrotheciotoxicosis and poisoning in ruminants by verrucarin A and roridin A. Res Vet Sci.* 12:508-515.

(75) MURPHY, W. K.; BURGRESS, M. A.; VALDIVIESO, M.; LIVINGSTON, R. B.; BODEY, G. P.; FREIREICH, E. J.;(1978) *Phase I clinical evaluation of anguidine. Cancer Treat Rep.* 62:1497-1502.

(76) MANN, D. D.; BUENNING, G. M.; OSWEILER, G. D.; HOOK, B.;(1983) *Effects of subclinical levels T-2 mycotoxin in the bovine cellular immune system. Can J comp Med.* 48:306.

(77) MASUDA, E.; TAKEMOTO, T.; TATSUNG, T.; OBARA, T.; (1982) Immunosupressive effect of a trichotecene mycotoxin fusarenon X in mice. Immunology. 45:743

(78) MATSUOKA, Y.; KUBOTA, K.; (1981) Studies on mechanism of diarrhoea induced by fusarenone X. Toxicol appl Pharmacol.57:293

(79) MATSUOKA, Y.; KUBOTA, K.;(1987) Characteristics of infllammation induced by Fusarenon-X. Toxicol Appl Pharmacol. 01:333.

(80) MATSUOKA, Y.; KUBOTA, K. (1979) Ueno Y. General Pharmacological studies of fusarenon studies. Toxicol appl Pharmacol. 50:87-94.

(81) NOWICKE, J. W.; MESELSON, M.;(1984) *Yellow rain—A palynological analysis. Nature.* 309:205-207.

(82) PACE, J. G.; WATTS, M. R.;(1988) *Canterbury WJ. T-2 mycotoxin inhibits mitochondrial protein synthesis. Toxicon*.26:77-85.

(83) PACE, I. G.; WATTS, M. R.; BURROWS, E. P. Y COLS.(1985) Fate y distribution of 3H labeled T-2 mycotoxin in guinea pgs. Toxicol appl Pharmacol. 80:377.

(84) PANG, V. F.; LAMBERT, R. J.; FELSBURG, P. I. Y COLS.(1987) Experimnental T-2 toxicosis in swine. Toxicol Pathol.15:308.

(85) PIER, A. C.; CYSEWSKI, S. J.; RICHARD, J. L. Y COLS.(1976) Experimental mycotoxicoses in calves with aflatoxin, ochratoxin, rubratoxin and T-2 toxin. Proceeding of the 80th Annual Meeting of the US Animal Health Association. Miami Beach.

(86) PRELUSKY, D. E.; VEIRA, D. M.; TRENHOLM, H. L.;(1985) Plasma pharmacokinetics of the mycotoxin deoxynivalenol following oral administration to sheep. J Environ Sci Health 820:603.

(87) RAFAI, F.; TUBOLY, S.; (1982) Effect of T-2 toxin on adrenocortical function and immune response. Zbl Vet Med.6:29

(88) ROSEN, R. T.; ROSEN, J. D.;(1982) *Presence of four Fusarium mycotoxins and synthetic material in «yellow rain»: Evidence for the use of chemical weapons in Laos. Biomed MÁSs Spectrom*. 9:443-450

(89) RICAUD, D.;(1983) Les Recherche de Défense Contre les Armés Biologique et Chimiques. Paris, France: École Polytechique. ISBN 2-7170-0738-5.

(90) RYU, J.; SHIRAKI, N.; UENO, Y.;(1987) *Effects of drugs and metabolic inhibitors on the acute toxicity of T-2 toxin in mice. Toxicon*. 25:743-750.

(91) SIDELL, F. R.; HURST, C. G.;(1992) *Clinical considerations in mustard poisoning. In: Somani SM, ed. Chemical Warfare Agents.New York, NY: Academic Press.* 51-66.

(92) SHOHAMI, E.; WISOTSKY, B.; KEMPSKI, O.; FEUERSTEIN, G.;(1987) *Therapeutic effect of dexamethasone in T-2 toxicosis. Pharmacol Res.* 4:527-530.

(93) SEAGRAVE, S.;(1981) Yellow Rain: A Journey Through the Terror of Chemical Warfare. New York, NY: M Evans.

(94) SEELEY, T. D.; NOWICKE, J. W.; MESELSON, M.; GUILLEMIN, J.; AKRATANAKUL, P.(1985) *Yellow rain. Sci Am.* 253(3):128-137.

(95) STAHL, C. J.; GREEN, C. C.; FARNUM, J. B.;(1985) *The incident at Tuol Chrey: Pathological and toxicological examination of a casualty after chemical attack. J Forensic Sci.* 30:317-337.

(96) SPERTZEL, R. O.; WANNEMACHER, R. W. JR.; PATRICK, W. C.; LINDEN, C. D.; FRANZ, D. R.;(1993) *Technical Ramifications of Inclusion of Toxins in the Chemical Weapons Convention (CWC). Alexandria, Va: Defense Nuclear Agency. DNA Technical Report* 92-116.

(97) SUNEJA, S. K.; WAGLE, D. S.; RAM, G. C.;(1989) *Effect of oral administration of T-2 toxin on glutathione shuttle enzymes, microsomal reductase and lipid peroxidation in rat liver. Toxicon.* 27:995-1001.

(98) SWANSON, S. P.; HELASZEK, C.; BUCK, W. B.; ROOD, H. D. J.; HASCHEK, W. M.;(1988) *The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. Food Chem Toxicol*. 26:823-830.

(99) STAHL, C. J.; GRCEN, C. C.; FARLUM, J. B. (1985).»The lncident at Tuol Chrey: Palh. And Toxi Evaluation of a Casulty Afler Chemical Alttk. J of Forensic Sciencs.2: 117.

(100) SHOTWELL, O. L.;(1985) Nennett Gam Stubbfiekd RD y cols. Deoxynivalenol in hard red winter wheat. J. Assoc Off Anal Chem 68:95.

(101) SHARMA, R. P.; KIM, Y. W.(1991) *Trichothecenes. In: Sharma RP, Salunkhe DK, eds. Mycotoxins and Phytoalexins. Boca Raton, Fla: CRC Press* 339-359.

(102) TEICH, A. H.; HAMILTON, J. R.;(1985) Effects of cultural practice soil on the incidence pf Fusarium Appl environ Microbiol. 40:1429.

(103) THOMPSON, W. L.; WANNEMACHER, R. W. JR.(1984) *Detection and quantitation of T-2 mycotoxin with a simplified protein synthesis inhibition assay. Appl Environ Microbiol.* 48:1176-1180.

(104) TRYPHONAS, H.; IVERSON, F.; SO, Y. Y COLS.(1986) Effects of the deoxynivalenol on the humoral and celluilar immunity Toxicol Letters. 30:137.

(105) UENO, Y.; HOSOYA, M.; ISHIKAWA, Y.(1969) Inhibitory effects of mycotoxins on protein synthesis ib rabbit reticulocytes, J Biochem (Tokio) 66:419.

(106) UENO, Y.; ISHIL, K.; SATO, N. Y COLS. (1973) Screening of trichotecene producing fungi and the comporative toxicity of isolated mycotoxins.Japan J Pharmacol. 23(supp):133.

(107) UENO, Y.;(1989) Trichothecene mycotoxins: Mycology, chemistry, and toxicology. Adv Nut Res. 1989;3: 301-353.

(108) WANNEMACHER, R. W. JR.; BUNNER, D. L.; NEUFELD, H. A.;(1991) *Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals. En: Smith JE, Henderson RS, eds. Mycotoxins and Animal Foods. Boca Raton, Fla: CRC Press.* 499-552.

(109) WATSON, S. A.; MIROCHA, C. J.; HAYES, A. W.;(1984) *Analysis for trichothecenes in samples from Southeast Asía associated with «Yellow Rain.» Fundam Appl Toxicol*. 4:700-717.

(110) WANNEMACHER, R. W.; BUNNER, D. L.; PACE, J. G.; NEUFELD, H. A.; BRENNECKE, L. H.; DINTERMAN, R. E. (1985) Dermal toxicity of T-2 toxin in guinea pigs, rats, and cynomolgus monkeys. En: Lacey J, ed. Trichothecenes and Other Mycotoxins. Chichester, England: John Wiley Sons Ltd

(111) WESTLAKE, K.; MACKIE, R. I.; DUTTON, M. F.;(1987) *T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth. Appl Environ Microbiol.* 53:587-592

(112) WANNEMACHER, R. W. JR.; PACE, J. G.;(1987) Medical defense against biological warfare: Exploratory immunotherapy studies on toxins of potential BW threat. In: US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases Annual Report 1987. Fort Detrick, Frederick, Md: USAMRIID

(113) WANNEMACHER, R. W. JR.; (1994) Evaluation of Two Topical Skin Protectants (TSP1 TSP2) in the Rabbit Model. Fort Detrick, Frederick, Md: US Army Medical Research Institute of Infectious Disease. Memorandum to US Army Medical Material Development Activity, 19 July.

(114) WANNEMACHER, R. W. JR.; BUNNER, D. L.; (1983) Evaluation of the Ability of Various Agents to Decontaminate Skin of Rats Exposed to T-2 Toxin. Fort Detrick, Frederick, Md: US Army Medical Research Institute of Infectious Disease. Memorandum to US Army Armament, Munitions, and Chemical Command, Chemical Research and Development Command.

(115) WANNEMACHER, R. W. JR.; BUNNER, D. L. (1987) Screening AMBERGARD XE-556 Resin Blend as a Candidate Decontaminating. Material for Removing T-2 Mycotoxin From Exposed Skin of Guinea Pigs and Rabbits. Fort Detrick, Frederick, Md US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases. Memorandum to US Army Medical Material Development Activity.

(116) WEAVER, G. A.; KURTZ, H. J.; MIROCHA, C. J. Y COLS. (1978) Acute toxicity of the mycoxitoxin diacetoxycispenol. Vet.Rec. 103:531

(117) YAGEN, B.; JOFFE, A. Z.; HORN, P.; MOR, N.; LUTSKY, I. I.;(1977) *Toxins from a strain involved in ATA. In: Rodericks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, eds. Mycotoxins in Human and Animal Health. Park Forest South, Ill: Pathotox Publishers*. 329-336

(118) YOSHIZAWA, T.; MOROOKA, N.; (1977) Trichothecenes from mold infested cereals in Japan. In: Rodericks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, eds. Mycotoxins in Human and Animal Health. Park Forest South, Ill: Pathotox Publishers.

(119) YOSHIZAWA, T.; SAKAMOTO, T.; OKAMKOTO, K.;(1984) *In vitro formation of 3' -hydroxy T-2 and 3 ' -hydroxy HT-2 toxins from T-2 toxin by liver homogenates from mice and monkeys. Appl Environ Microbiol.* 47:130-134.

(120) YAGEN, B.; BIALER, M.;(1993) *Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes. Drug Metab Rev*. 25:281-323.

(121) YOSHIZAWA, T.; MIROCHA, C. J.; BEHRENS, J. C.; SWANSON, S. P.;(1981) Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. Food Cosmet.Toxicol.19:31.

(122) ZAMIR, N.; ZAMIR, D., EIDEN, L. E. Y COLS.(1984) Metionin and leucine enkephalin in rat neurohypophysis different response to osmitic stimulus Abd T-2 toxin. Science 228:606.

TOXINAS DE ANIMALES

Venenos de serpientes

Aníbal ganó una batalla naval en 190 a. C. lanzando serpientes venenosas a los barcos enemigos pero la victoria fue debida a la desorganización provocada por el pánico.

Muchas serpientes producen potentes toxinas, fáciles de ocultar y de transportar sin demasiado riesgo y de difícil identificación, pero son ddifíciles de obtener y solo en escasa cantidad por lo que tendrían poca utilidad como agresivo de guerra. De ser empleadas lo harían por terroristas o por asesinos.

Las serpientes u ofidios, son vertebrados de la clase reptilia (subclase lepidosauria), superorden squamata, del orden Ophidia, suborden Aletinophidia.

Sus familias más importantes son:

A. Colubroidea con los géneros Coluber, Natrix, Coronella, Elaphe, Malpolon, Macroprotodon, Dispholidus o Boomslang.

B. La **Elaphidae** con los géneros Bungarus, Oxyuranus o taipan, Notechis o serpiente tigre, Acanthophis o víbora de la muerte y Austrelaps, Micrucus que son largas serpientes de coral, y las también largas Naja o cobras y el Dendroaspis o mambas, de rápida mordedura, con las especies D. angusticeps (mamba verde del este de África), D. viridis (mamba verde del oeste de África), D. jamesoni (mamba Jameson) y D. polylepis (mamba negra).

La Dendroapsis o polylepis sintetiza la calciseptina y el FS-2, la Oxyranus. scuttelaris la taicatoxina y el Triomeresurus wagleri la waglerina I

bloquean a los canales L, receptores de las dihidropiridinas, formados por las subunidades (1S (Ca_v1,1), (1C (Ca_v1.2), (1D (Ca_vl.3) y (1F (Ca_v1.4); estos canales son sensibles a los antagonistas del calcio (verapamilo, diltiazem, dihidropiridinas).

La serpiente elápido sintetiza la taipoxina de 46.000 d, cuya DL_{50} (media de diversos autores y vías de entrada) para el ratón es 5,0 µg kg y la textilotoxin de pm de 80.000 d, cuya DL_{50} (media de diversos autores y vías de entrada) que tiene una DL_{50} para el ratón de 0,60 µg kg.

C. Familia **Viperidae**, a ella pertenecen las víboras de los géneros Adenorhinos, Pseudocerastes, Causus, Bitis, Cerastes, Vipera, Daboia, Echis, Atheris, Eristicophis) y los crótalos de los géneros Agkistrodon o mocasines y las víboras de cabeza cobre, Crotalus y Sistrurus son serpientes cascabel, Bothrops o víboras de palmeras, Deinagkistrodon, Lachesis,Trimesurus, Calloselasma). mientras que la (-conotoxina M_{JVA} y las agatoxinas (-Aga_{IVA} y (-Aga_{TK} obtenidas de la víbora Agelenopsis apenas bloquean los canales P Q ((1A, Ca,2.l) (Olivera y cols., 1994).

D. La **Atractaspididae** (víboras topo o excavadoras).

E. La **Hydrophiidae** son serpientes marinas cuya piel, llamada karung, tiene escamas separadas con una especie de pelos, usada en marroquinería. A ella pertenecen los géneros Hydrophis, Pelamis y Laticauda.

Muchas serpientes disponen de glándulas orales que producen una secreción formada en un 90-95% en peso seco, por proteínas cardiotóxicas y neurotóxicas para el SN periférico. Las familias Elapidae y Hidrophidae, tienen unas 120 toxinas con mecanismos y lugares de acción diferentes (Tu 1996, Yang 1996, Choumet y cols. 1996).

Las principales toxinas ofídicas son:

1.º Alfatoxinas. Constituyen unas cien toxinas postsinápticas, entre ellas la alfabungarotoxina (búngaros, elápidos), la cobratoxina (cobra, elápidos). Algunas se han usado para estudiar la miastenia gravis. Bloquean la unión de la acetilcolina con sus receptores de la placa muscular. La dosis letal para el ratón Balb C de la cobratoxina es de 2 µg kg (Lipps 2001).Tres dosis de 1 µg kg separadas dos semanas produce en el ratón un alto título de anticuerpos determinables por ELISA por lo que se la

considera un superantígeno. Convertida en toxoide con o sin adyuvantes estimula mucho la inmunidad. Los búngaros y los elápidos sintetizan la toxina F, y las serpientes marinas (hidrófinos), la toxina lapemis.

2.º Betatoxinas. Son toxinas presinápticas, que inicialmente aumentan la liberación de acetilcolina de las vesículas presináticas, para inhibirla enseguida, bloqueando la actividad de la placa neuromuscular. Entre ellas tenemos la crotoxina (crótalos, vipéridos), la taipoxina (taipan, elápidos),la betabungarotoxina (búngaros, elápidos), la textilotoxina (cobra, elápidos), notexina (serpiente tigre, elápidos), la agkistrodotoxina (crótalo, vipérido), la taipoxina (taipan, elápidos),y las ammoditoxinas A, B y C (víbora, vipéridos).

3.º Las **dendrotoxinas**, a, b. d y g son polipéptidos, que inhiben a los canales de potasio que intervienen en la repolarización de la transmisión nerviosa liberando acetilcolina de las vesículas presinápticas, por lo que activan la transmisión nerviosa en la placa neuromuscular, haciendo que se contraiga el músculo. Las dendrotoxinas son producidas por las mambas y los elápidos (la serpiente cascabel de Mojave). Menos potentes que las dendrotoxinas, son la b-bungarotoxina. la notexina, el veneno de la víbora de Russell y el del Oxyuranus scutalatus (taipan, elápido).

4.º Fasciculinas. Las fasciculinas son polipéptidos de 61 aminoácidos. Se conocen las fasciculinas 1, la 2 antes toxina F7, la 3 antes toxina C y la D. El núcleo de las fasciculinas, está estabilizado por cuatro puentes disulfuro, teniendo tres dedos de zinc (le Du y cols. 1992) y una lámina ß-triple antiparalela. No se unen, al centro activo, aniónico, periférico de la acetilcolinesterasa del pez torpedo eléctrico ni a la pseudocolinesterasa humana situado en el borde de la garganta de 200 nm, pero bloquean la superficie de entrada a la garganta impidiendo que la acetilcolinina llegue a su centro activo, es decir que actúan como inhibidores selectivos no competitivos. (Karlssony cols. 1984, Lin y cols. 1987, Puu y cols. 1990, Durán y cols. 1994, Radic y cols. 1994, Bourne y cols. 1995, Harel y cols. 1995, Rosenberry y cols. 1996) reduciendo mucho las constantes de asociación y de disociación de la unión del N-metilacridinium al sitio activo (Rosenberry y cols.1966) La acetilcolina no hidrolizada, contrae sostenidamente, durante dias los músculos, que termina en tetania muscular y en parálisis, que puede matar por asfixia.

La actividad anticolinesterásica depende de dos fragmentos comprendidos entre los residuos 17 y 39 de la fasciculina (Peña y cols.); un fragmento de 28 aminoácidos que abarca una zona de triple hoja beta plegada participa en la unión de la fasciculina a la enzima.

Las fasciculinas se encuentran sobre todo, en el veneno de las mambas africanas (Dendroaspis, elápidos). El veneno de la D. angusticeps, contiene la fasciculina 1 (FAS-1) que tiene en la posición 47 tirosina y la 2 (FAS-2), que tiene en 47 asparagina. El veneno de las D. viridis y D. polylepis tiene la fasciculina 3 (FAS-3), que se diferencia de la FAS-1 en tres aminoácidos, y en cuatro de la FAS-2 (Joubert y cols. 1978,Marchot y cols. 1993).

La síntesis por la técnica clásica que utiliza terbutiloxicarbonilaminoácidos, de tres péptidos los Fas- A y Fas- B que abarcan el extremo y la totalidad del segundo bucle respectivamente y la Fas- C que contiene además la secuencia del tercero que completa una triple lámina ß. La Fas-A no inhibe a la acetilcolinesterasa, mientras Fas-B y Fas-C la tienen en el rango µmolar. En la gamma de UV de menor longitud de onda los tres péptidos presentaron giros y láminas ß, característicos de la fasciculina. Esto demuestra que el segundo bucle [Bourne y cols. 1995) es básico para la acción de la fasciculina sobre la AChE. Los residuos hidrofóbicos (Met 33, Val 34 y Leu 35), junto con Lys 25, no presentes en Fas-A son esenciales para la actividad inhibitoria de la toxina.

La inhibición es persistente: la inyección de 150 ng de FAS-2 en la amigdala y en otras zonas del cerebro de ratas, inhibe el 74% durante cinco días (Dajas y cols. 1987, Bolioli y cols. 1989.Quillfeldt y cols. 1990).

La inyección de 0,05-3 mg kg de fasciculinas al ratón (Rodriguez-Ithurralde y cols. 1983) ocasíona sialorrea, lagrimeo, rinorrea y fallo respiratorio, y típicamente fasciculaciones que persisten 5 a 7 horas (Lee y cols. 1986). Como las anatoxinas-a, a diferencia de los OF, no pasan la barrera hematoencefálica, y por ello no hay signos del SNC.

El pretratamiento de los ratones con 50 mg kg i.p. de atropina a los que posteriormente se les administraba 1 mg kg i.v. de FAS-2 alarga la supervivencia, lo que no se consigue con 10 mg kg i.p.

5.º Kappatoxinas. Son toxinas producidas por serpientes del género Bungarus (elápidos) que bloquean algunos receptores colinérgicos de los núcleos del bulbo y médula. En el caso de la mordedura antes de las

4 horas aparecen paresias y parestesias en la puerta de entrada, seguidas de náuseas, mareos y fasciculaciones musculares.

Después de aparecer la sintomatología de la afectación de los pares craneales: disfagia, diplopía, disartria. En casos graves aparece ataxia, incordinación motora y parada respiratoria.

6.º Las **cardiotoxinas** tienen su secuencia lineal semejante a la de las neurotoxinas, pero gracias a su estructura secundaria se unen selectivamente a receptores de membrana de las fibras del miocardio, (Tu 1996, Choumet y cols. 1996, Kumar y cols. 1996) despolarizandolas y con ello disminuyendo la excitabilidad y el rendimiento cardíaco propiciando el shock o la depresión cardiovascular, que puede causar una parada cardíaca. Son discretamente cardiotóxicas la gammatoxina del veneno de cobras (elápidos) y de las víboras topo o excavadoras (atractaspídidos) y las miotoxina hemorrágicas y miotóxicas como el factor hemorrágico-miotóxico de la víbora áspid: estas toxinas interactuan con los canales de sodio voltaje-dependientes y llegan a degenerar a las miofibillas. También pueden lesionar a las células del sistema de inervación intrínseco causando arritmias, taquicardia o bradicardia, fibrilación ventricular y miocarditis con disminución del gasto y del rendimiento cardíaco, que se agrava si se acompaña de hipotensión.

7.º Algunas toxinas tienen actividad zinc-proteasas a,b.c y e por lo que lesionan al endotelio vascular causando hemorragias (equimosis) y si se asocian alteraciones de los factores de la coagulación se producen hemorragias internas.,

8.º Las toxinas **hemolíticas,** las **hidrolíticas**, y dosis elevadas de **cardiotoxinas**, lesionan a la membrana de los hematíes que se hacen espiculados, y en consecuencia aparece anemia hemolítica, hematuria con taquicardia, taquipnea, shock circulatorio, etc. La rabdomiolisis y la hemolisis bloquean y destruyen a los túbulos causando insuficiencia renal que se agrava por la deshidratación y por la hipoperfusión del riñón en un paciente en shock. Son pues nefrotóxicas.

9.º Toxinas **necrosantes**. Los venenos de la cobra de Formosa y la serpiente de cascabel lesionan las membranas célulares y a los epitelios tienen colagenasas con intensa acción hidrolizante específica para el colágeno típica del veneno de los crótalos. En consecuencia se produce ci-

tolisis, que puede causar úlceras que pueden llegar a ocasionar profundas y extensas necrosis; rabdomiólisis,mioglobinuria, etc. La lisis puede afectar también a las células del pulmón fetal. La hemolisis y la citolisis producen hiperpotasemia que agravan el cuadro cardíaco. Se altera la estructura de los eritrocitos que aumentan de volumen haciéndose esféricos con menor resistencia, destruyéndose con la consiguiente hemoglobinuria y en consecuencia con bloqueo de los túbulos renales con insuficiencia renal que causa la muerte a los 3 a 14 días. El paso de las toxinas por los vasos linfáticas puede originar linfangitis y adenopatías dolorosas que suelen extenderse hasta la raíz de la extremidad.

Varios búngaros y elápidos producen abundantemente fosfomonoesterasas no específicas, capaces de hidrolizar enlaces fosfo-monoéster y además la 5-nucleotidasa hidroliza los 5 nucleótidos fosfato. Tambien contienen fosfodiesterasas, del tipo de las exonucleasas que separan mononucleótidos del ADN, del ARN y de otros polinucleótidos comenzando por el extremo 3-terminal, o del tipo endonucleasa que separan por hidrólisis oligonucleótidos del ADN y del ARN produciendo como consecuencia hemolisis y citolisis, aunque no es letal. Los venenos de las víboras y de los crótalos contienen hialuronidasa, y son ricos en endopeptidasas, elastasas, y en estearasas, como la arginina-estearasa; el de los lápidos es rico en di y tripeptidasas; tambien varios ofidios, pueden sintetizar proteasas específicas como quininogenasas (liberadoras de bradiquinina). También se encuentran en el veneno de serpientes nucleotidasas, ribonucleasas, desoxirribonucleasas, adenosintrifosfatasas y enzimas no hidrolíticas como las L-aminoácido oxidasas, más numerosos inhibidores enzimáticos.

10.º El veneno de algunas serpientes especialmente del crótalo Bothrops jararaca, contiene algunos péptidos, que inhiben la enzima de conversión de la angiotensina (IECA), utilizados para obtener hipotensores como el captopril.

11.º El veneno de los ofidios puede contener enzimas proteolíticos que activan a células cebadas y a polimorfonucleares que segregan substancias mediadoras de la inflamación como la histamina, bradiquinina, prostaglandinas, leucotrienos, etc., que producen una gran vasodilatación local y aumento de la permeabilidad capilar, que causan in gran edema doloroso local o hasta general.

TABLA 1

Clasificación de las principales enzimas del veneno de serpientes (Martín y Bernal 2001)

Enzimas					
Familia vipéridos					
Crótalos	Víboras				
Familia elápidos		Familia hidrófinos		Familia colúbridos	
Hidrolasas a	Fosfolipasa A 2	+++			
Fosfodiesterasa	+	+	+	+	+
Fosfatasa alcalina	Dei. acutus	++			
Fosfatasa ácida	+	+	+	+	+
Acetilcolinesterasa	Bot. botrox	++			
Colagenasas	+	+			
Elastasas	+				
Quininogenasas	+	+			
Argininaestearasa	+	+			
Hialuronidasas	+	+	+	+	+
Desoxirribonucleasa	+	+	+	+	+
Ribonucleasa	+	+	+	+	+
Adenosintrifosfatasa	+	+	+	+	+
NAD-nucleotidasa	+	+	+	+	+
Lisofosfolipasa	+				
Amilasa	+	+	+	+	+
Activador factor X	+	+			
a-fibrinogenasa	+	+			
b-fibrinogenasa	+	+			
a, b-fibrinogenasa	B. gabónica				
Activador de la protrombina	+				
Heparinasa	+				
Enzimas fibrinolíticas	+				
Óxidorre- L-aminoácido-oxidasa	+	+	+	+	+
Ductasas b Catalasa	+	+	+	+	+
Lactatodeshidrogenasa	+				
Transferasas c Alaninoaminotransferasa	+	+	+	+	+

a Catalizan reacciones de hidrólisis, transfiriendo grupos funcionales al agua.
b Catalizan reacciones de transferencia de electrones.
c Catalizan reacciones de transferencia de grupos fun-cionales..linesterasas, proteinasas, quininogenasas, etc., se ve reducida por la acción de estos inhibidores enzimáti-cos
presentes al mismo tiempo en el veneno (p. ej., IECA).

12.º Las **fosfolipasas A2 (PLA2)** consituyen una amplia familia de enzimas que hidrolizan el enlace aciléster en posición 2 de los fosfoglicéridos, produciendo ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, en una reacción dependiente de calcio que se desarrolla en la interfase lípido-agua de las membranas celulares lo que les confiere actividad neurotóxica. Las PLA2, son proteínas relativamente pequeñas, de unos 14 Kd y sin puentes disulfuro. Por su efecto provocan muchas alteraciones por ej., rompen las cadenas de transporte de electrones y la integridad de la estructura mitocondrial, aumentan la permeabilidad de la membrana del axon y rompen las vesículas sinápticas,rompen los hematíes, se produce hemólisis y producen rabdomiolisis que puede aumentat por la adición de fosfatidilcolina.

Algunas toxinas presinápticas,como la betabungarotoxina, la crotoxina y la notexina, tienen una débil actividad fosfolipasa A 2. El veneno del Agkistrodon p. piscivorus o cottonmouth moccasin contiene además de fosfolipasa A, enzimas proteolíticos como hialuronidasa, L-aminoácido oxidasa, varias fosfatasas, y una hemolisina activa in vitro, que causan lesiones necróticas en la puerta de entrada. Clark y cols. (1971) fraccionan el veneno de esta serpiente por cromatografia de columna en fosfocelulosa y separan 16 fracciones, algunas de ellas letales para el ratón sin que ninguna alcance la letalidad del veneno conjunto. Muchas fracciones son alergénicas para el ratón inmunizado y adrenalectomizado. Todas las fracciones tenían actividad sobre los mastocitos y una formada por proteinas catiónicas tenía actividad alergénica local y sistémica en animales sensibilizados

Son neurotoxinas presinápticas que degeneran a las miofibrillas producidas por las serpientes «banded krait», la Naja naja naja, la de cascabel de Mojave, y la Australian taipan. Las técnicas de modelado molecular permiten obtener la estructura tridimensional,de la fosfolipasa A2. El modelo ha servido para explicar muchos datos bioquímicos y para aclarar las relaciones estructura-actividad de esta compleja familia de enzimas, que permite descubrir el mecanismo de acción del inhibidor especifico PLA2 manoalido y otros análogos sintéticos. (Rámirez y cols. 1991).

13.º A menudo los venenos contienen proteasas procoagulantes y otras anticoagulantes y otras como los venenos de las víbora de Malasía

y la de carpet que según sea su concentración actuan como coagulante o como anticoagulante. El efecto se debe a la alteración de alguno o de varios factores de la cadena de la coagulación. Si el efecto anticoagulante es intenso, la sangre queda incoagulable y hay graves hemorragias internas o externas o puede presentarse trombosis con coagulación intravascular diseminada. El hematocrito y la hemoglobina están disminuidos; hay leucocitosis de PMN y de eosinófilos y hematíes espiculados,

Algunas toxinas coagulantes, aisladas, se pueden emplear como terapia anticoagulante o como reactivo para estudiar la coagulación. Citamos las siguientes:

a) Activador del factor X de la coagulación. Muy abundante en el veneno de la víbora de Russell. Se usa para medir el factor X, y controlar la eficacia del tratamiento con ciertos anti-coagulantes orales.

b) Proteínas inactivadoras de los factores X activado y IX del veneno de los crótalos (géneros Agkistrodon y Trimesurus).

c) Algunas toxinas de ofidios hidrolizan al fibrinógeno y a la fibrina como la atroxase-A (Baker y cols. 1996) y la Lebetasa de Vipera lebetina.

Entre las toxinas coagulantes tenemos:

a) **Ancrod**. Es una fracción purificada del veneno de víbora malaya. Activa, como la trombina el paso de fibrinógeno a fibrina, pero a diferencia de la trombina sólo libera el fibrinopéptido A (y no el B) y no activa el factor XIII o estabilizante, por ello las moléculas de fibrina no se entrecruzan y al no tener consistencia el coágulo es más susceptible a la fibrinólisis y no produce obstrucción vascular. El gasto continuado de fibrinógeno origina CID. Comercializado bajo el nombre de Arvin ®. Su vida media es corta y por su tamaño y peso molecular bajos no es alergizante.

b) **Batroxobina** similar al ancrod y a la trombina es una hemocoagulasa del veneno de una serpiente Bothrops, con acción similar a de la trombina y al ancrod; se puede usar para cuantificar el fibrinogeno y valorar sus propiedades aunque la sangre contenga anticoagulantes. Su acción no es inhibida por la heparina pero sí por los productos de la degradación del fibrinógeno (PDF). Comercializada con el nombre de (Reptilase ®)

El veneno de algunas serpientes tiene factores agregantes de las plaquetas causando como consecuencia trombopenia. Otras son agreganres y antiagregantes según la dosis. Otras toxinas son antiagregantes plaquetarios como el Factor Mambia (mambas, elápidos) que es una glucoproteína antagonista del complejo de membrana GP II b III a, que al bloquear al receptor para el fibrinógeno, impide la agregación plaquetaria.

14.º Finalmente tenemos a las **Sarafotoxinas a, b y c**, potentes vasoconstrictores y la hemorragina I del Agkistrodon acutus y de varias especies de los Crotalus.

15.º Toxina activadora de la Proteina C, protectora frente a la trombosis. La produce un crótalo del género Agkistrodon. Comercializada bajo el nombre de Protac ® que se usa como reactivo para cuantificar esta proteína.

BIBLIOGRAFÍA DE TOXINAS DE SERPIENTES (FASCICULINAS)

(1) BOLIOLI, B.; CASTELLÓ, M. E.; JERUSALINSKY, D.; RUBINSTEIN, M.; MEDINA, J.; DAJAS, F.;(1989) Neurochemical and behavioral correlates of unilateral striatal acetylcholinesterase inhibition by fasciculin in rats. Brain Res (Netherlands) 504:1-6.

(2) COOK, W. O.; DAHLEM, A. M.; HARLIN, K. S.; BEASLEY, V. R.; HOOSER, S. B.; HASCHEK, W. M. Y COLS. (1991) Reversal of cholinesterase inhibition and clinical signs and the postmortem findings in mice after intraperitoneal administration of anatoxin-a(s), paraoxon or pyridostigmine. Vet Hum Toxicol 33.1-4.

(3) DAJAS, F.; BOLIOLI, B.; CASTELLÓ, M. E.; SILVEIRA, R.;(1987) *Rat striatal acetylcholinesterase inhibition by fasciculin (a polypeptide from green mamba snake venom). Neurosci Lett* 77:87-91.

(4) JOUBERT, F. J.; TALJAARD, N.;(1978) *The complete primary structure of toxin C from Dendroaspis polylepis polylepis (black mamba) venom. S Afr J Chem* 31-107-10.

(5) KARLSSON, E.; MBUGUA, P. M.; RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D.;(1984) *Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba Dendroaspis angusticeps. J Physiol (Paris)* 79:232-40.

(6) DU, M. H.; MARCHOT, P.; BOUGIS, P. E.; FONTECILLA-CAMPS, J. C.;(1992) *-A resolution structure of fasciculin 1, an anti-acetylcholinesterase toxin from green mamba snake venom. J Biol Chem* 267:22122-30; 1992

(7) LEE, C. Y.; LEE, S. Y.; CHEN, Y. M.;(1986) *A study on the cause of death produced by Angusticeps-IYpe toxin F7 isolated from eastem green mamba venom. Toxicon* 24:3340.

(8) LIN, W. W.; LEE, C. Y.; CARLSSON, F. H. H.; JOUBERT, F. J.;(1987) *Anticholinesterase activity of angusticeps-type toxins and protease inhibitor homologues from mamba venoms. Asía Pac J Pharmacol* 2:79-85.

(9) LIPPS, B.V.;(2001) *Producción of polyclonal antibodies in mice against cobratoxin, botulinum toxin and ricina without altering their toxicity or use of adjuvant. Nat Toxins*. 10: 27-32.

(10) MARTÍN SIERRA, M. C.; BERNAL PÉREZ, M.; (2000) *Mordeduras de serpiente en Aragón. Revisión de 54 casos. Med Intensiva* 24:19-26.

(11) OLIVERA, B. M.; MILJANICH, G.; RAMACHANDRAN, J. Y COLS.(1994) AnnuREv Biochem 63:823.

(12) QUILLFELDT, J.; RASKOVSKY, S.; DALMAZ, C.; DIAS, M.; HUANG, C.; NETTO, C. A. Y COLS.(1990) *Bilateral injection of fasciculin into the amygdala of rats: effects on two avoidance tasks, acetylcholinesterase activity, and cholinergic muscarinic receptors. Pharmacol Biochem Behav* 37:439-44.

(13) RAMÍREZ, A.; POSABARRO, M. T.; GALLEGO, J.; GAGO, F.;(1991) *Modelado molecular de la fosfolipasa A2 del veneno de Naja naja naja y de su interacción con manoalida. An. Real Acad. Farm*. 57: 257-286.

(14) RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D.; SILVEIRA, R.; BARBEITO, L.; DAJAS, F.;(1983) *Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from Dendroaspis angusticeps venom. Neurochem Int* 5:267-74.

(15) ROSENBERRY, T. L.; RABL, C. R.; NEUMANN, E.;(1996) *Binding of the neurotoxin fasciculin 2 to the acetylcholinesterase peripheral site drastically reduces the association and dissociation rate constants for N-methylacridinium binding to the active site. Biochemistry* 35:685-90.

(16) SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L. Y COLS.(1991) *Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science* 253:872-9.

LAS BATRACOTOXINAS (BTX)

Son alcaloides esteroideos sintetizables que naturalmente son segregados por las glándulas cutáneas granulosas de ranas tropicales de los generos Dendrobates y Phyllobates [Myers y cols. 1978] entre ellas la P. Teribilis. Son ranitas de vivos colores llamadas « ranas de veneno para

dardos o para flechas» por algunos indios de Sudamérica pues emplean su toxina para emponzoñar sus flechas. Las más importantes son las batracotoxinas, de los mas potentes tóxicos no proteicos; estables de pm 399, parcialmente sensible a pH ácido y la homobatracotoxina.Las batracotoxinas se unen a los canales de sodio de los axones y de las fibras musculares inhibiendo su cierre de modo que la neurona queda despolarizada incapaz de transmitir [Warnick y cols. 1975].

Son potentes cardiotoxinas, que afectan la permeabilidad a los iones despolarizando irreversiblemente a los nervios y músculos causando arritmias, fibrilación, y fallo cardiaco [Albuquerque y cols. 1977]. En los animales,causan pérdida del equilibrio, contracciones y enseguida intensa debilidad, sialorrea, disnea y a seguido violentas convulsiones, cianosis y muerte. Dosis inferiores a 0,1 µg [Märki y cols. 1963] mata al ratón ante de un minuto. La DL_{50} para el ratón inyectada subcutáneamente es de 0,2 µg kg, siendo la dosis letal mínima de 0,01 a 0,02 µg kg. La homobatracotoxina es un poco menos tóxica que la batracotoxina, siendo la dosis letal mínima de unos 0,04 y 0,06 µg kg, respectivamente; es unas 10.000 veces más tóxica que el sarin. Suponiendo que el hombre sea tan susceptible como el ratón la dosis letal de estas substancias sería de unas 180 µg. Los animales grandes suelen ser mas susceptibles a las toxinas que los pequeños, de modo que la dosis letal para el hombre podría ser menor. 0,1 mg mata a un hombre de 70 kg. Myers y cols. anticipan que la dosis parenteral letal de la batracotoxina para el hombre seria de solo 2,0 a 7,5 µg. La toxicidad oral es mucho menor por el cocinado y por su metabolización lo que permite a los indios comer animales capturados por sus dardos. No se conoce antidoto: pudieran ser eficaces los tratamientos empleados para la intoxicación con aconitina, veratridina o digitalis con similar mecanismo de acción. Uno de los pocos medicamentos disponibles pudiera ser el DigiBind o el similar, DigiTab, usado para tratar las intoxicaciones por digitalis y por oleander [Patocka y cols. 1999).

BILIOGRAFIA DE BATRACOTOXINAS

(1) ALBUQUERQUE, E. X.; DALY, J. W.; WITKOP, B.;(1977) *Batrachotoxin: chemistry and pharmacology, Science* 172:995-1002.

(2) MÄRKI, F.; WITKOP, B.; (1963) *The venom of the Colombian arrow poison frog Phyllobates bicolor. Experientia* 19:329-338.

(3) MYERS, C. W.; DALY, J. W.; MALKIN, B. A.;(1978) Dangerously toxic new frog (Phyllobate) used by Emberá Indians of Western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. Bull Am Museum Nat History 161.

(4) PATOCKA, J.; SCHWANHAEUSE, W. K.; MARINI, M. V. P.;(1999) *Dart poison frogs and their toxins. ASA Newsletter* 74:16-18.

(5) WARNICK, J. E.; ALBUQUERQUE, E. X.; ONUR, R.; JANSSON, S. E.; DALY, J.; TOKUYAMA, T.; WITKOP, B.;(1975) *The Pharmacology of Batrachotoxin. VIII. Structure-Activity Relationships and effect of pH. J Pharm Exp Ther* 193:232-245.

TOXINAS DE ARTRÓPODOS

El escorpión produce la a-tityustoxina de 8.000 d, cuya DL_{50} (media de diversos autores y vías de entrada) es de 9,0 µg kg para el ratón; altera los canales catiónicos. La tarántula Hysterocrates gigas puede bloquear a los canales R (1E, $Ca_v2.3$) por medio de su toxina.

TOXINAS MARINAS

El ONCHIDAL, es el principal componente lipófilo de la secreción viscosa producida por unas glándulas, las Onchidella binneyl (Ireland y cols. 1978), la O. patelioides,la O. borealis y la O. nigricans, moluscos del género Onchidella, de la familia Onchidiidae, en respuesta a estímulos mecánicos y químicos que les permite repeler a los peces depredadores (Young y cols. 1986), para los que es tóxico ya que estos moluscos por carecer de concha requieren esa protección. Se sintetiza fácilmente.

El onchidal es un éster acético lipofílico y aunque no es un organofosfonato inhibe irreversiblemente a la acetilcolinesterasa. La inhibición se debe a su grupo funcional aldehido con un doble enlace insaturado que reacciona con el centro activo de las acetilcolinesterasas liberando el acético del onchidal, permitiendo el ataque nucleofílico por distintos aminoácidos de la colinesterasa; el onchidal sería un «sustrato suicida» (Walsh 1984); la inhibición de la colinesterasa plasmática es facilmente reversible, mientras que la de vera es irreversible (Abramson y cols. 1989). Al

ser un éster acético similar a la acetilcolina, elonchidal, no impide la unión de la 125I-alfa-bungarotoxina a los receptores nicotínicos de la acetilcolina.La aparente afinidad del onchidal para la unión reversible inicial a la acetilcolinesterasa (Kd) es de unos 300 microM, y la tasa constante aparente para la subsiguiente inhibición irreversible de la enzima (kintact) es de unos 0,1 min^{-1}. El onchidal es un substrato para la acetilcolinesterasa, y unos 3.250 mol de onchidal son hidrolizados por mol de la enzima que queda inhibida irreversiblemente. La kcat calculada del onchidal es de 325 min^{-1}. La inhibición irreversible se debe al propio onchidal o más probablemente a productos de su hidrolisis. La inhibición irreversible de la colinesterasa se evita incubando con agentes que hacen la reversión bloqueando estéricamente (edrophonium y decametonium) o modificando alostéricamente (propidium) el sitio de unión a la acetilcolina. La enzima no se reactiva incubando el complejo con oximas. La inhibición irreversible no parece que se deba a la acilación de la serina. Como el onchidal contiene un aldehido (, (-insaturado muy reactivo, la inhibición irreversible de la acetlcolinesterasa pudiera deberse a la formación de una unión covalente entre la toxina y la enzima.

Las oximas no reactivan a la colinesterasa inhibida, lo que podría ser debido a que no se acila la serina de la triada catalitica o a la formación durante la hidrólisis del onchidal de un intermedio, inhibidor irreversible de la colinesterasa o al «envejecimiento». Abramson y cols. propusieron que durante la hidrólisis se formaría un enol que por tautomerización daría un derivado 1,4-dialdehído, llamado ancistrodial,que reaccionaría con una lisina de la colinesterasa para formar un anillo pirrólico. El ancistrodial y otras substancias con el grupo 1,4-dialdehído (,(-insaturado están en numerosas secreciones protectoras de distintos organismos (Jonassohn 1996) como la de las termitas Ancistrotermes cavithorax (Baker y cols. 1978).

BIBLIOGRAFÍA DEL ONCHIDAL

(1) BAKER, R.; BRINER, P. H.; EVANS, D. A.;(1978) *Chemical defence in the termite Ancistrotermes cavithorax: ancistrodial and ancistrofuran. J Chem Soc Chem Commun* 410-1.

(2) IRELAND, C.; FAULKNER, D. J.;(1978) *The defensive secretion of the opisthobranch mollusc Onchidella binneyi. Bioorg Chem* 7:125-31.

(3) JONASSOHN, M.;(1996) Sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes: structural properties that affect reactivity and bioactivity [Tesis doctoral]. Lund: Lund University.

(4) Young, C. M.; Greenwood, P. G.; Powell, C. J.;(1986) *The ecological role of defensive secretions in the intertidal pulmonate Onchidella borealis. Biol Bull* l71: 391-404.

PALYTOXINA

Toxina producida por el coral blando «Palythoa toxica» o Palythoa tuberculosa de Hawai de la que Scheuer la extrajo con etanol [Moore y Scheuer 1971], distinta del alga roja. Es tan tóxica que es díficil determinar su DL_{50} que se estima es de 50 a 100 ng kg i.p. en el ratón aunque la media de diversos autores y vías de entrada es de 150 ng kg.Una dosis de 60 ng kg mata a los perros en cinco minutos, lo que correspondería unos 4 microgramos para el hombre.

Una antigua leyenda hawaiana atribuye el origen de este coral tóxico al asesinato de un campesino que vivía en el distrito Hana en Maui, al que los pescadores le atribuían el asesinato de un compañero, por lo que lo capturaron lo desnudaron y al ver en su espalda la boca de un tiburón, lo mataron, quemaron y tiraron sus cenizas al mar: desde ese momento las hierbas marinas se volvieron tóxicas y las mareas que llevaban esas hierbas venenosas fueron consideradas «kapu» es decir sagradas para los hawainianos. Shimizu en 1983 y Moore en 1985 publicaron la estructura de la palitoxina y Armstrong y cols., y Mann, la sintetizaron en 1989.

La molécula de la palitoxina $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$, tiene una muy compleja estructura, con areas lipofílicas e hidrofílicas; tiene 64 centros estereogénicos es decir que tiene 264 estereoisómeros a lo que se añade que por sus dobles enlaces puede presentar isomerismo cis trans es decir que puede tener más de 1.021 estereoisomeros; su cadena lateral con 115 carbonos es la mas larga conocida. Muy estable incluso impura.

La palitoxina, actúa sobre los canales iónicos [Ozaki y cols. 1983. Lauffer y cols. 1985), despolarizando la membrana célular. Es un potente vasoconstrictor, neurotóxico, hemolítico, liberador de histamina, inhibidor de la Na K ATPasa y un catión ionoforo [Habermann1989]. Es promotor tumoral no de tipo TPA [Ohmura y cols. 1987, Kuroki y cols. 1996].

BIBLIOGRAFÍA DE LA PALITOXINA

(1) ARMSTRONG, R. W.; BEAU, J. M.; CHEON, S. H.; CHRIST, W. J.; FUJIOKA, H. Y COLS.;(1989) *Total Synthesis of Palytoxin Carboxylic Acid and Palytoxin Amide. J Amer Chem Soc 111*:7530-7533.

(2) HABERMANN, E.; (1989) *Palytoxin acts through Na+, K+-ATPase. Toxicon 27:*1171-1187.

(3) LAUFFER, L.; STENGELIN, S.; BERESS, L.; HUCHO, F.; (1985) *Palytoxin-induced permeability changes in excitable membranes. Biochim Biophys Acta 818*: 55-60.

(4) KUROKI, D.; BIGNAMI, G. S.; WATTENBERG, E. V.; (1996) *Activation of stress-activated protein kinasec-jun n-terminal kinase by the non-TPA-type tumor promoter palytoxin. Cancer Res 56*:637-644.

(5) MANN, J.; (1989) *Chemical synthesis. Scaling molecular Everests. Nature 342:*227-228.

(6) MOORE, R. E.; (1985) *Structure of palytoxin. Fortschr Chem Org Naturst 48*:81-202.

(7) MOORE, R. E.; SCHEUER, P. J.; (1971) *Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. Science 172*:495-498.

(8) OHMURA, E.; TSUSHIMA, T.; EMOTO, N.; OBUCHI, E.; SHIZUME, K.; (1987) *Effects of tumor promoters (mezerein, teleocidin and palytoxin) on growth hormone secretion from rat anterior pituitary cells cultured in monolayer. Life Sci 41*:691-696.

(9) OZAKI, H.; TOMONO, J.; NAGASE, H.; URAKAWA, N.; (1983) *The mechanism of contractile action of palytoxin on vascular smooth muscle of guinea-pig aorta. Japan. J. Pharmacols. 33*:1155-1162.

(10) SHIMIZU, Y.; (1983) *Complete structure of palytoxin elucidated. Nature 302*:212.

BRIOSTATINA

Es una toxina producida por un tipo de coral, que tiene actividad antitumoral y que potencia los efectos del arsénico en el tratamiento de la leucemia

CONOTOXINA

Tiene un pm de 1.500d. Su DL_{50} como media de diversos autores y vías de entrada para el ratón es de 5,0 µg kg. La producen algunas espe-

cies del caracol marino Conus que vive en los arrecifes colarinos de Australia. Estos conus acechan a sus presas y les clavan un arpón conectado a una bolsa que contiene una neurotoxina que actúa en los canales catiónicos, contrayendo permanentemente el músculo y otra que bloquea la placa motora. Se puede obtener una potentente neurotoxina de una serpiente marina y otra de las glándulas salivares de un calamar con anillos azules en las que hay unas bacterias que la sintetizan. Las (-conotoxinas M_{VHA} y G_{VIA} obtenidas de los caracoles marinos Conus magus y C. geographus, respectivamente, bloquean a los canales N (αa1B, Ca, 2.2)

Los inhibidores de las endopeptidasas, como el tiorfán se podrían diseminar con las toxinas peptídicas en aerosoles para potenciar su absorción y toxicidad. Koch y cols. (1999) observaron en cobayas una gran potenciación de la toxicidad respiratoria del péptido biorregulador, la substancia P con el tiorfán. Se han propuesto emplear con fines agresivos los bioreguladores, encefalinas, endorfinas,endotelinas, bradicininas, angiotensinas etc.

Entre las toxinas cuyo pm es inferior a 1.000 daltones; algunas son péptidos con solo 10 aminoácidos, por lo que no son antigénicas y sólo algunas son haptenos. Son 100.000 veces menos tóxicas, que las toxinas de alto peso molécular. Actúan en menos de quince minutos, por lo que tienen interés táctico. Hoy día se consigue sintetizar dada su sencilla estructura. Entre las más importantes tenemos:La convalotoxina de 500 pm, producida por elementos del plancton,

TETRODOTOXINA (TTX)

Es una neurotoxina marina de un pm de 319; es muy potente y de rápida acción letal. La tetraodotoxina es producida por peces del orden Tetraodontiformes (de tetra igual a cuatro y odontos igual a dientes), especialmente por el pez del Pacífico «Tora fuga» o pez globo (en ingles puffer), aunque la pueden almacenar otros organismos marinos y terrestres. En el Japón, el fugu es una delicadeza gastronómica; es ligeramente hidrosoluble; es termoestable pero sensible a ácidos energicos y a las bases.

Kishi y cols.(1972), fueron los primeros en sintetizar una mezcla racémica de TTX mediante 15 pasos, habiéndose desarrollado al menos 32

vías sintéticas [Noya y cols. 2000]. En el Japón se declararon entre 1974 y 1983 646 casos de ellos 179 mortales.

La TTX es enormemente tóxica, existiendo poca diferencia entre la dosis que causa algun efecto y la letal. La toxina puede entrar en el organismo por ingesta, parenteral por inhalación y por la piel erosionada. La DL_{50} para las ratas es de 8 µg kg por via parenteral y de 30 µg kg por ingesta; la DL_{50} media de diversos autores y vías de entrada para el ratón es de 8,0 µg kg. La DL_{50} inhalada para el hombre es de unos 2 µg kg y por ingesta de 30 µg kg diferencia debida a la destrucción de la toxina por el jugo gástrico.

La TTX bloquea específicamente los canales de sodio, movidos por el voltaje, de la superficie de las membranas neuronales. La molécula tiene una infrecuente estructura tricíclica a base de un grupo guanidínico cargado positivamente, por lo que estas toxinas se llaman guanidino-toxinas. El sitio de unión de la tetrodotoxin-Na al canal es muy estrecho (Kd = 10-10 M). La TTX mimetiza al catión sodio hidratado, entra en la boca del complejo peptídico del canal-Na+, uniéndose a un péptido con glutamato, estrechando su calibre cuando el péptido cambia de conformación en la segunda mitad de su unión. Como consecuencia de estos cambios conformacionales la TTX se une electrostáticamente a la abertura del canal cuya puerta es el Na+-.

La tetradotoxina bloquea la transmisión nerviosa, causando la muerte,al igual que la saxitoxina, a los pocos minutos de haber sido inhalada por parálisis respiratoria.

Los síntomas aparecen a los pocos minutos cuando la toxina se inyecta o se inhala y entre 10 a 40 minutos cuando se ingiere. Los primeros síntomas son ligero hormigueo de labios y de lengua que aparece entre 20 minutos o tres horas de haber comido un pez globo. Luego aumentan las parestesias en la cara y extremidades lo que puede ir seguido por una sensación de ligereza o de estar flotando. Cefalea, dolor epigástrico, y pueden aparecer náuseas, diarrea, y vómitos. En ocasiones puede haber dificultad para la marcha. En la siguiente fase aparece paralisis que va aumentando; muchos afectados no pueden moverse ni siquiera sentarse con soltura. Debilidad midriasis, tremor con pérdida de la coordinación motora y de voz. Estrés respiratorios que va aumentando, convulsiones; puede haber alteración mental y arritmia. La victima aun-

que paralizada por completo, puede estar consciente y en algunos casos completamente lúcido antes de faallecer. La muerte se produce a las 4 a 6 horas pero puede tener lugar desde los 20 minutos a las 8 horas.

La combinación de tetradotoxina con datura, el alucinógeno del estramonio causa una muerte aparente, aniquilando la voluntad quedando los afectados como «zombies» muertos-vivos o si se prefiere vivos-muertos. Podria ser estramonio, la semilla de la planta llamada «borrachero» que hizo perder temporalmente la razón a cuarenta soldados de Quesada, que iban de Bogotá a Chocontá que mezclaron con los alimentos, las mujeres indias que les atendieron en su pueblo. El artículo 246 de un antiguo Código Penal haitiano castigaba con severísimas penas a «quienes atentaran contra la vida de una persona por substancias, que sin matar, produjeran un estado letárgico» Una combinación de esta naturaleza seria una terrible arma en manos de dictadores, que podrían disponer de esclavos sumisos sin pensamiento ni voluntad propias.

BIBLIOGRAFÍA DE CONO Y DE TETRADOTOXINA

(1) NOYA, B.; PAREDES, M. D.; OZORES, L.; ALONSO, R.;(2000) *5-exo radical cyclization onto 3-alkoxyketimino-1, 6-anhydromannopyranoses. Efficient preparation of synthetic intermediates for (-)-tetrodotoxin. J Org Chem* 65:5960-5968.

Toxinas vegetales

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

y MANUEL DOMÍNGUEZ DE LA CALLE
Clinical Research Associated

TOXINAS DE PLANTAS

Las toxinas vegetales se obtienen fácil, económicamente y con pocas exigencias técnicas de las plantas correspondientes. Los soldados de Solon contaminaron con raíces de eléboro (Helleborus niger) los arroyos, cuyas aguas bebian las tropas enemigas, para provocarles diarrea; Aníbal empleó la Atrapa belladanna, para desorientar a sus enemigos. Se consideran agresivos potenciales, especialmente para el terrorismo o para cometer asesinatos, la estricnina, la abrina y la ricina así como los alucinógenos anticapacitantes.

ERGOTINA

Una tableta cuneiforme escrita hacia 600 a.J. describia unas pústulas en los granos en las espigas que probablemente serían el Claviceps purpurea trompo productor de la ergotina. La intoxicación se debe a la ergotamina alcaloide producido por el Claviceps purpurea, que reacciona con los receptores (-adrenérgicos (Goodman y cols. 1975) contrayendo intensamente a las fibras musculares lisas de las arterias que si es duradera causa éstasis y lesión de la íntima, que determina trombosis. En la Edad Media se producian numerosos brotes del «fuego de San Antonio»

con alucinaciones, delirio, convulsiones e isquemia de varios miembros que terminaban en gangrena seca y autoamputación por comer pan confeccionado con centeno contaminado con el Claviceps purpurea. Una magnífica descripción pictórica la tenemos en el cuadro del «Juicio final» de Hieronymos Bosch, nuestro «El Bosco».

Hoy día se producen escasos casos causados por el empleo de la ergotina como tartrato para contraer los vasos del útero después del parto (abortivo) y para la jaqueca por vía rectal o venosa que obvian el paso por el hígado. El cuadro clínico más frecuente es la isquemia aguda. El sistema iliaco se afecta en la mayoría de los casos (Atwall y cols. 1976) y le siguen en frecuencia la subclavia y sus ramas, las carótidas, las coronarias (Snell y cols. 1978), las de las extremidades, las arterias renales (Fedotin y cols. 1970) y mesentéricas (Greene y cols. 1977, Lowe y cols. 1978); en los casos graves pueden afectarse varios territorios.

Hay una gran variabilidad de la sensibilidad personal, ya que las dosis totales productoras de ergotismo son muy diversas habiéndose señalado ergotismo tras la toma oral de solo 5 mg de tartrato de ergotamina (1 de ergotamina parenteral). La sensibilidad aumenta en el posparto, en las infecciones especialmente en la sepsis, con la coexistencia de procesos vasculares de insuficiencia vascular periférica, tireotóxicosis, síndrome de Raynaud, tromboflebitis, angor, hipertensión, insuficiencias renal o hepática así como la acción de fármacos que reducen la detoxicación hepática de la ergotamina, como el propranolol, los anovulatorios, la triacetiloleandomicina, la doxiciclina y la tetraciclina (Amblard y cols. 1978) y sobre todo los macrólidos —la eritromicina— (Chignier y cols. 1978, Benhamou y cols. 1980, Larcan y cols. 1980), aunque es posible que la infección por la que se administraron los antibióticos pudieran influir.

Mucho menos veces que la ergotamina pueden producir ergotismo la metisergida (Lyle y cols. 1975) y mucho más rara y levemente la dihidroergotamina (Francoy cols. 1978). La metilergobasina no ha causado nunca ergotismo dadas las bajas dosis utilizadas en terapia y lo mismo ocurre con la bromoergocriptina.

Fernádez-Sedano y cols. publicaron en 1982 el caso de una mujer de 49 años, no fumadora quién se administró durante dos años 3 a 5 supositorios semanales de 1 g. de tartrato de ergotamina asociado a 100 mg. de cafeína (hemicraneal), para tratar la jaqueca que padecía desde su juven-

tud, Al cabo de este tiempo y durante un año con oscilaciones, le aparecía una coloración cianótica en el brazo derecho, que se hacía eriematosa con dolores intensos que duraban más de 24 horas. También tenía hormigueos y dolores frecuentes en ambos brazos con cambios de coloración. Había tenido panadizos repetidos en los dedos y en una ocasión perdió temporalmente todas las uñas de ambas manos. El pulso humeral y radial era imperceptible y por ello no se podía determinar la tensión que era normal en otros territorios: la pletismografía confirmó que mostraba un intensa estenosis de ambos miembros superiores; la piel de las manos era fina y brillante, con eritrosis en la yema de los dedos. La suspensión de la ergotamina se siguió de mejoría espectacular recuperándose el pulso radial a los 7 días, aunque puede tardar 10 días (Shifrin y cols. 1980)

Como vasodilatador se ha usado el nitroprusiato sódico monitorizando la dosis (Husted y cols. 1978) para evitar la hipotensión. La heparina o el dextrano de bajo peso molecular reducirían el riesgo de trombosis El uso del balón de Fogarty abre el vaso pero lesiona la íntima aumentando el riesgo de trombosis.

BIBLIOGRAFIA DE ERGOTAMINA

(1) AMBLARD, P.; AEYMOND, J. L.; FRANCO, A.; BEANI, J. C.; CARPENTIER, P.; LEMONIER, D.; BESSARD, G.-RGOTISME;(1978) Forme mineure par association dihydroergotamine chlorhydrate de doxycicline; étude capillaroscopie Nouv Presse. Med., 7, 4148.

(2) ATWALL, D.; POIS, A.; MOALEDGO, J.; MAHAFFEY, M.; PAWLISCH, A.;(1976) Severe unilateral ischemia secondary to ergot intoxication. Wis Med. K., 75, 533.

(3) BENHAMOU, A. C.; EURIN, B.; MARSAC, A.; DARLOZ, A. M., DUPUIS, M.; GLASSER, P.; NATAL, J.;(1980) Accidents ischémiques graves par ergotisme A propos de 3 cas. Intéret d´un nouvel antidote. le nitroprussiate de sodium. J Mal Vasc, 5, 35.

(4) CHIGNIER, E.; AIOU, A.; DESCOTES, J.;(1978) Ergotisme iatrogéne aigu par association medicamenteuse diagnostiqué par exploration non invasive (velocimetrie a effet Doppler).-Nouv Presse. Med. 7, 2478.

(5) COLLASSIN, F.; GIRAUD, J. A.;(1979)Denas de tourais y cols.I,schemie aigue des membres inférieurs par ergotisme.-Arch Med. Ouest, 11: 85.

(6) FEDOTIN, M. S.; HARTMAN, C.;(1970) Ergotamine poisoning producing renal arterial spasm.-New Engl. J. Med., 283, 518.

(7) FERNANDEZ-SEDANO, L.; MÁRTINEZ DE LETONA, J.; MASA, C.; ELVIRO GARCIA, E. FERRIZ, P.; PÉREZ MAESTU, R.; (1982) Intoxicación por ergotamina. Presentación de un caso. Rev. Clin. Esp. 165:61.

(8) FRANCO, A.; BOURLARD, P.; MASSOT, C. H.; LECOEUR, J.; GIODICELL, H.; BESSARD, G.; (1978) -Ergotisme aigue par association dihydroergotamine-triacetyloleandomicine.-Nouv Presse Med. 7, 1561.

(9) GOODMAN, I. S.; GILMAN, A.; (1975) The pharmacological basis of therapeutics-5 th ed. New York Mac Millan Publishing Co, 540,872.

(10) GREENE, F. L.; ARIYAN, S.; STANSEL, H. C.; (1977) Mesenteric and peripheral vascular ischemia secondary to ergotism. Surger., 81, 176.

(11) HUSTED, J. W.; AINGE, E. J.; HIASH, L. F.;(1978) Intraarterial nitroprusside, treatment for ergotism. Amer. J Roentgenol, 131, 1090.

(12) LARCAN, A.; LAMBEAT, H.; PERAIN, M.; DURAND, L.; LONG, F. X., BRICE, M.; LEVEAU, J.; (1980) -Ergotisme d'origine thérapeutique. Quatre nouvelles observatIons. J. Mal. Vas., 5, 29.

(13) LOWE, P.; HOISETH, A.; NORDSHUS, T.; (1978) -Spasm of the superior mesenteric artery, complicating methysergide maleate therapy. -Brit. J. Radiol, 51, 1014.

(14) LYLE, G.; HENAY, M. D.; JOHN, S.; BLACKWOOD, M. D.; JAMES, E., CONLEY, M. D.; VICTOR, M.; BEMNARD, M. D.;(1975) -Ergotism. Arch. Surg., 110, 929.

(15) SHIFRIN, E.; OLSCHWANG, D.; PEREL, A.; DIAMANT, Y.; COTEV, S.; (1980)-Reversal of ergotamine-induced arteriospasm by mechanical intraarterial dilatation. Lancet, 2, 1278.

(16) SNELL, N. J. C.; AUSSELL-SMITH, C.; COYSH, H. L.; (1978) -Myocardial ischemia in migraine sufferers taking ergotamine.-Post. Med. J., 54, 37.

ESTRICNINA

La estricnina, es un alcaloide descrito en 1901 que se extrae de las semillas de la Strychnos nux vomica que se desarrolla en la India, Sri Lanka, Indonesia y Australia Se presenta como polvo cristalino blanco, inodoro y amargo que puede ser ingerido, inhalado, inyectado intravenosamente. Las semillas de nuez vómica en 1540 y en el XVIII la estricinina fueron introducidas en terapia, sin base científica ni efecto útil, para tratar parálisis hipotónicas y de los esfínteres, depresión respiratoria, estimulante de la motilidad intestinal, y como orexígeno, tónico, reconstituyente,incrementador del rendimiento etc. tal vez debido a su amargor. Se ha utilizado como

rondenticida y para matar zorros y otros animales. Se usa para «cortar» drogas de diseño, sobre todo para el LSD, la heroína y la cocaína con las que entraria en el organismo al ser inhaladas,inyectadas o fumadas.Muy tóxico de modo que una mínima cantidad causa una grave intoxicación y hasta la muerte. Ha sido una fuente de intoxicaciones accidentales, suicidas y homicidas. La esctricnina inhibe a la glicocola, aminoácido neurotransmisor, abundante en médula a lo que se debe el estímulo y las convulsiones de su intoxicación lo que tal vez la haga útil para tratar la rara, hiperglicinemia a dosis de 300-1100 mg/kg. Tambien se puede emplear el nitrato de estricnina por via venosa para tratar la intoxicación por barbitúricos.

Como agresivo podria ser usado por terroristas, para contaminar el agua o los alimentos o también dispersando los polvos en el aire para que penetre por la nariz, ojos y boca.

La toxicidad depende de la cantidad ingresada, de la forma de exposición y del estado de salud de la persona. Los síntomas aparecen hacia los 15 a 60 minutos.

Dosis bajas causan inquietud, agitación, temor, asustandose facilmente; dosis relativamente altas bloquean la transmisión neuromuscular causando graves espasmos dolorosos incontrolables, que arquean el cuello y la espalda, con rigidez de extremidades y trismus, espasmos que llegan a fatigar al músculo, ocasionando parálisis respiratoria. Puede haber fiebre, lesiones renales con hematuria, y hepáticas, agitación sin que se afecte la conciencia ni el pensamiento y a menudo la muerte.

La recuperación suele ser ad integrum aunque si hubo hipoxia o insuficiencia renal pueden quedar las secuelas de estas. Si la agresión fue por vía aerea se debe llevar a los expuestos a una area aireada. No se debe provocar el vómito ni darle líquidos orales, pero si por infusiones, y darle antipiréticos y en su caso anticonvulsivos. Si hubo contaminación cútanea la descontaminación con abudante agua y jabón. Desechar la ropa.

ABRINA

Es un tóxico de 65.000 d que se encuentra en las semillas del Abrus precatorius, «guisante o árbol del rosario o jequiritÍ», común a muchas

zonas tropicales. Las semillas rojas con un lado negro se han utilizado para hacer collares que han causado envenenamientos al ser ingeridas. Es una lectina. Su DL_{50} estimada como la media de diversos autores y vias de entrada en ratón es de 40 μg kg o de 0,04 pm. La abrina es parecida pero mucho más tóxica que la ricina utilizada a veces como un remedio a base de hierbas. Se presenta como polvo blanco amarillento, o como talco, grano, disuelta en agua o aerosolizada. Es estable en condiciones extremas de temperatura. Por su efecto citotóxico se ha probado la inyección intravenosa para tratar el cáncer, pero en los tratados se han presentado dos fallecimientos precedidos por afectacion del SNC y accesos.

Es un agresivo potencial para el terrorismo pero no se conoce que haya sido utilizada con este fin.

El polvo o los aerosoles entran por vía respiratoria o por las mucosas ocular, nasal u oral; la contaminación de superficies con polvo o soluciones determina la entrada por la piel. Su diseminación en el agua o alimentos podria también ser utilizada. Es posible inyectar soluciones de abrina o suspensiones de granitos.

La abrina bloquea la síntesis proteica y con ello la muerte célular. Los síntomas principales del envenenamiento por abrina dependen de la forma de exposición y de la dosis recibida, aunque en los casos más graves muchos órganos pueden verse afectados.

La piel expuesta a polvo o a vapor de abrina, puede enrojecerse y doler y más intensamente en los ojos.

Los síntomas iniciales del envenenamiento por inhalación de abrina pueden presentarse a las pocas horas siguientes a la exposición; los síntomas más probables son dificultad respiratoria, fiebre, tos, náusea y presión torácica que puede seguirse de sudor abundante y de acúmulo de líquido en los pulmones causando disnea, cianosis, hipotensión y como consecuencia la muerte.

La ingesta de abrina, puede causar síntomas antes de las 6 horas, aunque suelen tardar 1 a 3 días. Estos son vómito y diarrea que puede ser sanguinolenta. El resultado puede ser una deshidratación grave, seguida de hipotensión y luego de insuficiencias renal con hematuria y hepatica, alucinaciones, convulsiones y muerte a las 36 a 72 horas aunque si la absorción fue pequeña tarda algunos dias en presentarse.

Los intoxicados deben ser alejados de la zona contaminada si se diseminó por vía aerea, y se descontaminará su piel, si la agresión fue cutanea o de las mucosas especialmente de la conjuntival, lavado de estómago con carbón activado, si queda aún abrina en esta víscera y combatir la deshidratación, las convulsiones y la hipotensión.

RICINA

La ricina es sintetizada por el Ricinus communis, (en inglés castor bean), arbusto que fue cultivado en el antiguo Egipto para obtener su aceite laxante, muy empleado como medicamento, hasta mediados del siglo XX, usado como lubricante en la I y IIGM para motores de aviación. La toxicidad de las semillas del ricinus, era conocida desde antiguo y ha ocasíonado bastantes intoxicaciones accidentales.

La ricina fue descubierta por Stillmark quien reconoció su actividad tóxica hemaglutinante y precipitante de proteinas. La toxicidad depende mucho de la puerta de entrada y del animal en el que se determina; si se expresa por kg de peso, los animales más resistentes son el pollo y la rana y el mas sensible, es el caballo (Balint 1974); la toxicidad varía lógicamente según la vía de entrada. La dosis letal de la ricina en el ratón Balb C es de 4 µg kg (Lippps 2001). En el ratón blanco, la DL_{50} por inhalación es de 3 a 5 µg kg que mata al cabo de unas 60 horas, mientras que por ingesta es de 5 µg kg y mata a las 90 horas. La inyección de 0,5 mg puede matar a un hombre adulto pero la inhalación de sus vapores o polvo o si se ingiere se necesitan cantidades mayores para que se produzca. La LCt_{50} para el ratón es 3-7 mg • min m_3 y 114 en mg • min m_3 para el rhesus; es unas 1.000 veces menos tóxica, que la toxina botulínica pero es muy estable, resistiendo temperaturas extremas, fácil de obtener y de tenerla disponible lo que le confiere potencialidad como agresivo.

La ricina, es una proteina heterodímerica de 66.000 daltones, formada por dos cadenas glucoproteicas globulares conteniendo manosa. La cadena A o RTA, de 32.000 d tiene una secuencia cuya constante enzimática (K cat) es 1.500 min. (Robertus y cols. 1987, Wales y cols. 1991, Afrin y cols. 1994, Frankel y cols. 1994) y un plegamiento acoplado a dos dominios esféricos de la cadena B o RTB a la que está unida por un puente

disulfuro (Robertus 1988) desde el aminoácido 259 de la A al 4 de la B. La cadena B, también de 32.000 d, tiene un bolsillo específico al cual se unen, neutralizándola, las pterinas. La cadena B es una lectina. Youle la purificó en 1976. Rutenber y cols., identificaron en 1991, su estructura cristalina. Se han clonado los genes codificadores de ambas cadenas en la E. coli en la que se han obtenido mutantes y recombinaciones.

Paul Ehrlich en 1891, indujo en conejos a cuyo pienso añadia pequeñas cantidades de la semilla, anticuerpos precipitantes y neutralizantes de la toxicidad de la ricina, anticuerpos que pasaban a los fetos y a la leche. La inyección de tres dosis de 2 µg kg separadas dos semanas a ratones, produce alto título de anticuerpos determinados por ELISA por lo que se considera un superantígeno. Igualmente convertido en toxoide con o sin adyuvantes estímula mucho la inmunidad.

En 1951 se descubrió que tenía actividad antitumoral, que modernamente se aprovecha formando una quimera de la cadena A con Ig específica del tumor empleable en terapia, aunque la respuesta inmune a su antigenicidad puede inactivar al medicamento. Lo mismo ocurre cuando se emplea para obtener inmunotoxinas. (Thorpe y cols. 1982, Vitettay cols. 1983). La ricina como las PIR, pueden usarse para introducir otras proteinas al interior de las células.

La pegilación es decir la adición de polietilenglicol o del monometiloxil polietilen-glicol (mPEG), que cubre parte de los epitopos de la molécula, es uno de los muchos métodos para enmascarar la inmunogenicidad de muchas substancias. La pegilación de la ricina apenas cambia su actividad RNA N-glicosidasa, que hidroliza al ARNr, inhibiendo la síntesis proteica de la ricina, pero oculta a algunos receptores célulares y epitopos reconocibles por anticuerpos policlonales y con ello reduce su citotoxicidad para las células (BEL7404) del hepatoma y la inmunoreactividad frente a anticuerpos policlonales anti-ricina, lo cual se puede aprovechar para obtener inmunotoxinas, más eficaces y seguras.Se ha ensayado como inmunosupresor en transplante de médula.

Patogenia de la intoxicación por ricina

La ricina, como otras muchas toxinas, se une rapidamente a los células; en la entrada aerea se une a las ciliadas, a las alveolares y a los ma-

crófagos. Como muchas toxinas de plantas y de bacterias se une a receptores de membrana, distintos de los que tiene la viscumina (Moisenovich y cols. 2002). La estructura lectínica de la cadena B le permite unirse a los galactosa terminal del galactósido Iso R de los hidrocarbonados y de los glucolípidos de la membrana de las células. Así como la toxina diftérica pasa directamente desde los endosomas al citosol, la colérica, la exotoxina de la P. aeruginosa y la ricina pasan primero al Golgi. La ricina se disocia, lo que es facilitado por la lactosa de las membranas, (Sandvig y cols. 1976), pasa al Golgi (Lord y cols. 1994), en donde se une a la calreticulina galactosidada que es una chaperona (Day y cols. 2001). Atraviesa el Golgi y pasa por endocitosis a través de los pozos sin recubrir (Ghosh y cols. 1985, Moya y cols. 1985) llegando retrógadamente al retículo endoplásmico. La interacción no se produce con la cadena A libre y se puede evitar con la lactosa, lo cual confirma que la reacción esta mediada por la lectina conteniendo galactosa de la cadena B; el marcado metabólico con galactosa tritiada o el tratamiento de la calreticulina modificada con galactosa oxidasa con borohidruro sódico marcado con tritio, demuestra que la calreticulina de las células Vero tiene un oligosacárido terminal galactosilado. El tratamiento con brefeldina A indica que la interacción intracélular comienza en un compartimiento post Golgi, posiblemente en la red trans Golgi mientras que la separación reductiva de la ricina occurre inicialmente en la primera parte de la vía secretoria, más probablemente en el retículo endoplásmico. Las células Vero tratadas con ricina en cuya cadena A se incluyó una tirosina sulfonada confirman que la calreticulina, transporta retrógadamente la ricina de los endosomas del Golgi al retículo endoplásmico, desde donde se transloca al citosol por medio del translocón «Sec61p» mimetizando a un substrato de la via de degradación de la proteina asociada al retículo endoplásmico (ERAD) es decir se produce una degradación pasando luego al citosol. En los endosomas, cuyo pH es bajo, las moléculas se chequean en cuanto a anomalías en el procesado de la forma Z de la (-1-antitripsina, que es un substrato para el ERAD. Las células mutadas tienen menor tasa de degradación de la forma Z de la α-1-antitripsina y menor translocación y degradación del polipetido recombinante CTA1. Es decir la disminucion de la funcion ERAD se acompaña de aumento de la resistencia de la célula a las toxinas. La aparicion simultánea de resistencia a la toxina de la pseudomona y a la ricina se debe lógicamente a la ruptura de un mecanismo que interviene en la translocación.

La substitución de las dos lisinas de la RTA por dos argininas (Deeks y cols. 2002) no estabiliza significativamente a la ricina, lo que indica que la ubiquitina,no se une a la lisina, pero si se introducen lisinas en el RTA,se mantiene la actividad, la estructura, y la estabilidad de la ricina, aunque aumenta significativamente su degradación, debido a que la ubiquitinación favorece la degradacion proteasómica de la ricina.

El paso de la ricina al citosol, como ocurre con la toxinas diftérica, y con la exotoxina A de las pseudomonas limita el efecto tóxico (Hudson y cols. 1987). La cadena B permite la llegada de la A al citosol (Youle y cols. 1982) uniéndose a la subunidad de 28S del ribosoma,para el que tiene una constante de Michaelis de 0,1 μmol L. La cadena A, la anisomicina y otras toxinas proteicas que inactivan a los ribosomas eucarióticos, hidrolizan la unión N-glicosídica de una adenina A4324 próxima al extremo 3' del ARN de la subunidad de 28S del ARN ribosómico, muy conservada. La pérdida de esta específica adenina del ARNr inactiva a los ribosomas de 80s, de las células eucariotas, sin que actúe sobre los de las procariotas. La unión de la adenina blanco con el lugar activo de la RTA apenas contribuye a la interacción de los ribosomas con el RTA.Como consecuencia de aquella reacción se impide la actuación del factor 2 de elongación y por ende la síntesis de proteinas (Endo y cols. 1987, Olsnes 1987) y la muerte de la célula al cabo de 8 horas in vivo con aparición de clínica a las 24 horas. Brigotti y cols. (2002) vieron lesiones del ADN de las células endoteliales humanas susceptibles a la toxina 1 de la Shigellas y a la ricina,con inhibición simultanea de la síntesis proteica con la ricina o consiguientemente en el caso de la toxina shigae. Los test de la unión a la anexina V, el de la actividad de la caspasa 3, la formación de típicos fragmentos de ADN de 50 Kb o menores cambios en la morfología asociados con la apoptosis fueron negativos. La cicloheximida bloquea la translación de modo comparable al que inducen las RIPs, pero no lesiona al ADN. Las RIPs pueden lesionar al ADN nuclear por un mecanismo independiente de la inactivacion del ribosoma o de la apoptosis, ya que actúa in vitro sobre el ADN y sobre cromatina exenta de ARN.

Teter y cols. (2002) obtuvieron por mutación células CHO resistentes a la ricina,(y a las exotoxinas colérica, y a la de la P. aeruginosa), quedando sensibles a la diftérica.

La ricina no degradada, como la tóxina colérica, la de La Sh dysenteriae-1,la abrina, los tricotecenos y otras muchas toxinas inhiben a los ribosomas (RIPs). La ricina causa en las células Vero, citolisis y fragmentación del ADN paralelamente a la inhibición de la síntesis de proteina matando a las células e induciendo la apoptosis por un mecanismo diferente a como lo hace la toxina diftérica (Kusano y cols. 2001). El inhibidor de los proteasomas, la clastolactacistina beta-lactona, aumenta la citotoxicidad de la RTA rica en lisina casí al nivel de la ricina silvestre. (la introducción de cuatro lisinas en la cadena A de la abrina que es otra proteina inactivadora de los ribosoma, también disminuye grandemente la citotoxicidad de la holotoxina respeto a la silvestre). Parece, pues que la disminución de lisinas es una estrategia para evitar la degradación que tienen las toxinas que se retrotranslocan desde el RE.

La ricina al reaccionar con los fosfolípidos cargados negativamente, de los liposomas, cambia la estructura de su RTA, de modo que no es capaz de unirse a la adenina,haciéndos muy sensible a la tripsina. La RTA también libera a la calceina atrapada en las vesículas de fosfolipidos, desestabilizando a la bicapa lipidica.

Honjo y cols. (2002) en el hígado de rata vieron, que estaba muy influida por la concentración del ion Mg^{++} y por su fuerza ionica, sin que se modificara por la despurinización, ni por una concentración de adenina de 5 mM superior a la de la constante de disociación (1 mM) del complejo adenina-RTA.

La RTA, disuelta en Triton X 114, se concentra en el detergente,mientras que la holotoxina, la RTB nativa y varias cadenas aisladas inactivadoras de los ribosomas (RIPs) quedan en la fase acuosa (Day y cols. 2002).

Varios inhibidores de la ricina inhiben también a la toxina shiga (toxina que forman también algunas E coli) lo que hace posible obtener antidotos frente a esta toxina que puede causar toxinfecciones alimentarias. La entrada respiratoria o digestiva, causa siempre leucocitosis transitoria. Los cancerosos tratados con ricina llegan a tener 50.000 leucocitos por nm^3.

Clínica

La clínica depende de la dosis y de la puerta de entrada; La oral es menos peligrosa, probablemente por la destrucción digestiva de la ricina.

Los síntomas suelen aparecer antes de las seis horas y consisten en trastornos gastrointestinales, nauseas, vómitos,dolor abdominal y a continuación diarrea, hematemesis, melena, anuria, calambres, midriasís, fiebre, sed, dolor de garganta, cefalea, colapso vascular y shock,que causan la muerte a partir del tercer día. En la necropsia se observan ulceraciones multifocales hemorrágicas en estómago e intestino delgado, necrosis linfoide de los ganglios mesentéricos del intestino, del bazo e hígado con afectación del hígado,el bazo y los riñones. Las células de Kupffer y los macrófagos se afectan ya que un receptor de estas tiene manosa (Zenilman y cols. 1988). La letalidad en 751 intoxicados por ingerir semillas de ricinus fue 1,9 (Rauber y col 1985), guardando cierta relación con el número de semillas comidas; la mayoria de las defunciones ocurrieron en los casos antiguos. Los afectados por la ricina desarrollan antes de dos semanas Ig específica.

No se conoce ningún caso de intoxicación por la inhalación de aerosoles en el hombre, salvo en expuestos laboralmente al polvo del ricinus o a microgotas de su aceite (Brugsch 1960), y la provocada experimentalmente en animales. Puede pensarse que una agresión por vía aérea causaría a los 60 a 90 minutos modificaciones bioquímicas irreversibles y antes de ocho horas lesiones microscópicas de las vias respiratorias y del pulmón apareciendo a las 6 a 12 horas de forma brusca congestión nasal y de garganta, nauseas y vómitos, picor ocular, urticaria, tos, opresión torácica inflamación del aparato respiratorio que disminuye el flujo alveolar, disnea, accesos de asma y grave distres respiratorio, edema pulmonar y cianosis y muerte que se debe a un mecanismo diferente del que causa la muerte al ingresar por otras vías.

La exposición experimental a altas concentraciones, produce infiltrados bilaterales pulmonares que causan la muerte a las 36 a 48 horas por hipoxemia. La inhalación por las ratas de dosis letales de ricina causa a partir de las 8 a 12 horas neumonía difusa necrotizante de las vias respiratorias, con inflamación intersticial y alveolar y edema, con aumeno de células en el lavado pulmonar por aumento de permeabilidad de la barrera alveolo-capilar y citotoxicidad,que va aumentando llegando a aparecer a las 30 horas hipoxemia y acidosis. Wilhelmsen y cols.(1993) vieron en primates que la toxicidad inhalatoria era dosis-dependiente; los

síntomas comenzaban a las 8 a 24 horas de la exposición y a continuación anorexia, inmovilidad y muerte a las 36 a 48 horas, debida a neumonía, con diversos grados de necrosis difusa e inflamación aguda de las vías respiratorías, con inundación difusa de los alveolos y edema peribroncovascular con linfadenitis mediastínica.

La cadena A lesiona a las células del endotelio de la vena del cordon umbilical con las que contacta in vitro (Soler-Rodriguez y cols. 1993) sin cadena β, lo que explica que la inyección de la cadena A cause un síndrome vascular con hipoalbuminemia y edema y que la ricina intravenosa a las ratas lesione las células de Kupffer a las 4 horas, y luego a las endoteliales con formación de trombos en los vasos hepáticos y luego necrosis hepatocélulas (Derenzini y cols. 1976, Bingen y cols. 1987), alteraciones que Howat (1988) sugirió que fueran la causa de las lesiones renales y hepatocelulares.

La entrada digestiva es menos tóxica ya que se destruye parcialmente por los jugos digestivos y a que se absorbe mal. Los síntomas aparecen pronto y son náuseas, vómitos, dolor y calambres abdominales, diarrea, fiebre y escalofrios, hematochezia y a veces shock y colapso vascular. Entre los 751 casos de ingesta registrados solo 14 murieron. En la autopsia se encuentra necrosis hepática, esplénica y renal.

La inyección intramuscular de una dosis baja produce un cuadro de tipo gripal con mialgias, nauseas, vómitos, dolor local e hinchazón en el lugar de la inyección, hipertrofia ganglionar satélite. Si la dosis es alta se produce una intoxicación grave con necrosis de ganglios linfoides, afectación de órganos incluidos el estómago e intestino que se necrosan con hemorragias y a veces hepatitis difusa estando las células de Kupffer y los macrófagos afectados más necrosis esplénica y renal.Los intoxicados pueden tener leucocitosis con neutrofilia. La muerte puede presentarse a las 36 a 48 horas. La inyección venosa de 18 a 20 μg m^2 de ricina para tratar el cáncer,suele tolerarse bien. Fodstad y cols. (1984) en un gran serie vieron que algunos tenían a las 4-6 horas,síntomas gripales con fatiga que en ocasíones fue intensa y dolor muscular y a veces naúseas y vómitos, síntomas que persistieron 1 o 2 días.

La ricina absorbida se liga rapidamente a las células. El 46% de la ricina marcada con I^{125} inyectada en vena, de ratas a los 30 minutos está

en el hígado,el 13% en los músculos y el 9% en el bazo. (Ramsden y cols. 1989) Si la entrada fue la respiratoria la ricina se concentra en el pulmón. La ricina no ligada se metaboliza rápidamente; un 70% se excreta en forma de metabolitos por la orina. A las 24 horas solo queda en el organismo el 11% de modo que al poco tiempo de haber ingresado no se encuentra en los fluidos orgánicos.

La inmunotoxina-ricina mAb 35, esta compuesta por ricina conjugada a un anticuerpo monoclonal contra el receptor nicotínico de la aceticolina del músculo estriado; este compuesto ha sido propuesto para tratar las distonias focales. La inyección de ricina mAb 35 en el músculo extraocular del conejo (EOM) causa a la semana la desaparición del músculo.

Christiansen y cols. (2002) encontraron que la inyección en el recto superior del conejo de 0,2 microg kg de ricina mAb disminuyó el número de fibras y de la superficie del corte transversal los días 56 y 105 normalizándose al año persistiendo la heterogenicidad del grosor de las miofibrillas. Los cambios más significativos en la cadena pesada de la miosina (MHC) se dieron en la capa orbital en la que a los 56 y 105 días había aumento del número de miofibras rápìdas y neonatales y disminución de las lentas. Al cabo de 105 y 365 días, estaba disminuida la expresion de la MHC en las fibras lentas, neonatales, y posteriores. Es decir la ricina mAb 35 disminuye la masa muscular durante 105 días persistiendo cambios sutiles un año. Esta inmunotoxina podra usarse para tratar el estrabismo

Uso farmacológico de la ricina

Se pueden obtener constructos biespecíficos uniendo dos substancias: así se ha unido la cadena A deglosilada de la ricina a otras proteinas formando un complejo en el que la ricina se une a su blanco célular y la otra proteina ejerce localmente su efecto como por ej. un anticuerpo monoclonal a la ricina que ejerceria especificamente el efectio tóxico. Schnell y cols. (2002) unieron la cadena A de la ricina al anticuerpo monoclonal Ki 4 obteniendo la inmunotoxina Ki 4.dgA con actividad anti CD30 in vitro y en el ratón SCID con Hodgkin humano diseminado. El ensayo con 17 pacientes con linfoma CD30+ progresivo

se puede considerar esperanzador. Las reacciones adversas fueron más importantes que con otras inmunotoxinas siendo las más importantes el síndrome de hiperpermeabilidad vascular con hipoproteinemia y edema, aumento de peso, hipotensión, taquicardia, mialgia, y debilidad. La dosis máxima tolerada fue la de 5 mg m^2. El 40% de los tratados produjeron anticuerpos antirricina a un título de 1,0 microg ml o mayor, y uno produjo anticuerpos antirratón.

El antígeno GD2 se expresa selectivamente en la superficie de las células del neuroblastoma en donde se puede detectar por el anticuerpo monoclonal BW704. Manzke y cols. (2001) encontraron que la supervivencia media de los animales tratados con BW704dgA es decir anticuerpos BW704 conjugados con la cadena A de la ricina deglicosilada, aumentaba significativamente la supervivencia una media de 49 días, respecto a controles con inmunotoxinas no activas, con BW704 no conjugado o con puffer cuya supervivencia media era de 33 a 39 días con un valor de $p < 0.0001$.

Manzke y cols. ensayan dos ténicas inmunoterapéuticas usando anticuerpos BW704 unidos a GD2, modificado como inmunotoxina y un anticuerpo biespecífico, para eliminar a las células del neuroblastoma, una inmunoterapia con BW704dgA seguida de un tratamiento sistémico con anticuerpos biespecíficos anti CD3x-anti GD2

Alergia a la ricina

La ricina además de ser muy inmunógena es muy sensibilizante, causando reacciones alérgicas cruzadas con otras dos especies arbóreas de Euphorbiaceae también muy sensibilizantes el árbol de la goma, la Hevea brasiliensis y el Mercurialis annua. Palosuo y cols. (2002) estudiaron en Finlandia a 25 pacientes alérgicos al latex de la goma (NRL), que no habian estado expuestos a la ricina o al M. annua, y a 26 franceses alérgicos a la ricina y a 9 al M. annua, pero no al latex. El suero del 28% de los alérgicos al latex daba positivo el inmunoblotting, con la semilla de ricinus y el 48% con las proteinas del polen del ricinus. Es decir, el 35% de los alérgicos al latex se unieron a los alergenos del polen del M. annua. El 19% de los alérgicos al ricinus tenian IgE especifica a este latex

y el 8% a las proteinas del M. annua. El 44% de los sueros de los alérgicos al M. annua reaccionaron al látex, el 56% al ricinus, y el 78% a las proteinas del polen de la semilla del ricinus. Los extractos de semilla de ricinus inhiben la unión de la IgE contra las proteinas de 20, 30 y 55 kDa de extractos del latex NRL por «inmunoblotting» e inhibe la unión de la IgE, a las proteinas de 14, 21, 22, 29, 32 y 34 kDa de la semilla del castor. El 33% de los extractos de latex en el ELISA inhiben la unión de la IgE frente al M. annua, al polen de M. annua es decir hay reactividad cruzada in vitro, de tipo alérgico entre esas tres Euphorbiaceae

Uso militar de la ricina

La ricina, «compuesto W», en el código militar, podría ser utilizada para la guerra, dada su toxicidad, estabilidad, facilidad y baratura de producción, con el solo inconveniente de que se necesitarían grandes cantidades para ser eficiente. La ricina, fue estudiado por el ejército americano después de la IGM y los americanos y los ingleses desarrollaron y probaron sin usarla en la IIGM, la «bomba W».

La ricina podría ser empleada sobre grupos pequeños de combatientes o civiles y para ataques personales por inyección. Es muy probable que fuera ricina el tóxico empleado para asesinar en 1978,al escritor y periodista disidente búlgaro exiliado en Londres, Georgi Markov mediante un paraguas-pistola que disparó en el muslo, una bala que contenia no más de 500 μg de ricina; casí inmediatamente sintió un fuerte dolor local, súbita debilidad y entre 15 a 24 horas fiebre, naúseas y vómitos; a las 36 horas, taquicardia ingresando por encontrarse muy mal en un Hospital; se le apreció una zona de unos 6 cm de diámetro en la herida inflamada y adenopatia inguinal dolorosa en el miembro herido; a los dos días de la agresión hipotensión, tquicardia de 160 pulsaciones, colapso, shock con 26.300 leucocictos por mm^3. Al tercer día se presentó anuria hematemesis, bloqueo atrio-ventricular completo; los leucocitos subieron a 33.200 muriendo seguidamente. En la autopsia se encontró un discreto edema pulmonar atribuido al fallo circulatorio (Crompton y cols. 1980). En febrero de 1995 fueron acusadas dos personas, que se manifestaban contra los impuestos, de poseer ricina para ser empleada con fines criminales.

Poco después los aduaneros canadienses encontraron en el coche de un electricista retirado que había trabajado en el oleoducto trans-Alaska armas, municiones, oro y semillas de ricina al entrar en el país procedente de Alaska, debiendose tener en cuenta que se había difundido las propiedades de la ricina. Detenido, acusado de terrorismo se suicidó en la cárcel a los dos años. Algunas fuentes señalaron el posible uso de ricina en la guerra Irán-Irak en la década de 1980. En las cuevas de Al Qaeda en Afganistán se encontraron depósitos de ricina. En 2002 una empresa con domicilio postal en Londres, encargó a los laboratorios Amersham Biosciences de Londres 500 kg saponina. El Director de la empresa Lennart Arlinger, extrañado por el pedido, conociendo que la saponina puede aumentar poderosamente la toxicidad de muchos venenos avisó a la policia y se suspendió el envio. En enero de 2003 se detuvo a cinco argelinos tras descubrirse trazas de ricina en su apartamento de Londres. Este episodio que podría tener relación con el encargo de saponina, fue recogido por «The Financial Times» del 22 de noviembre de 2003. El 12 de marzo de 2003, la policia de París habia encontrado en la consigna de la estacion de Paris de donde salen los trenes para Lyon un paqueta que contenia unos frascos que habian contenido ricina presumiblemente procedente de terroristas detenidos en el RU que poseían ricina. El 2 de febrero de 2004 se encontró en el Congreso de EEUU, un sobre conteniendo ricina en polvo.

Detección de la ricina

Shyu y cols. (2002) idearon una técnica inmunocromatográfica rápida basada en la formación de un sandwich con anticuerpos monoclonales de dos especificidades, una contra la cadena B de la ricina fijada en en una membrana de nitrocelulosa porosa y la otra contra la cadena A conjugada a partículas de oro coloidal que sirve como detector.

Tratamiento de la intoxicación por la ricina

Un gran escollo para el tratamiento es la rapidez con la que actúa la ricina de modo que si la dosis absorbida fue grande no se puede evitar la

muerte. Las heridas contaminadas, deben ser lavadas con SS o con soluciones similares estériles y cubriertas con paños estériles. La piel, se debe descontaminar, lo antes posible,aunque la ricina se absorba poco por esta vía, con agua y jabón. No da muy buen resultado la descontaminación con el equipo americano M258 empleable para tratar a los afectados por vesicantes. Como en la descontaminación de cualquier agresivo, el personal debe estar protegido y manejar a los afectados y a los fómites con exquisito cuidado. Si la intoxicación se ha producido por inhalación (o por via digestiva) se debe descontaminar el estómago y el intestino con lavado gástrico, administración de carbón activado y colestiramina oral para captar la toxina y que se elimine por las heces. Si la intoxicación se produjo por la via respiratoria se debe atender al distrés respiratorio y al edema pulmonar, ventilación con presión positiva, antiinflamatorios y analgésicos.

Los esteroides sistémicos estabilizan las membranas célulares; las vitaminas A, C y E han dado buenos resultados en ensayos en animales. Se pueden administrar detoxificantes como las tiazolidinas y antimuscarínicos como la atropina; pueden ser útil mantener depósitos intracélulases de glutation lo que se consigue con una adecuada nutrición evitando el alcohol, el tabaco y las drogas y administrando D-L metionina. Se ha aconsejado dar fenobarbital u otros inductores de enzimas microsómicos. Caso de hipotensión, inyección de infusiones intravenosaa de cristaloides y substancias presoras. Se ensayan substancias que impidan la supresión de la síntesis proteica (Thompson y cols. 1995) como los bloqueantes de los canales de calcio, los intercambiadores de sodio-calcio, los antioxidantes, los efectores de la endocitosis del metabolismo célular, los competidores del tránsito de la ricina en la célula, etc. Son eficaces in vitro, pero sin ningún resultado en el ratón, la D-galactosa y derivados que compiten para la unión,como los derivados de los nucleótidos la azidotimidina (AZT), usado contra el VIH, y el purínico BM33203 y la brefeldina-A, que inhibe el transporte en el Golgi

Prevención

Además del empleo de trajes y de máscaras, se han propuesto diversos inductores enzimáticos, pero causan importantes efectos secundarios; se deben administrar antioxidantes entre ellos las vitamins A, C, y E y

mantener un buen estado nutricional, excluyendo el tabaco, el alcohol y las drogas. Dada su inmunogenicidad es posible obtener vacunas, aún no disponibles; los ratones, ratas y primates inyectados con dos o tres dosis de 3 a 5 μg de ricina, incluso sin adyuvantes, quedan protegidos frente a varias dosis letales (Zewetson y cols. 1996). Se puede emplear la cadena A y aún mejor detoxificada por deglicosilación o toxoide de ricina obtenida por el método de Ramon, en inyectable o en microencápsulas de galactido-glicoluro que proteje con una sola dosis (Yan y cols. 1994); el toxoide es seguro y eficaz en roedores y en primates expuestos por vía aerea. La administración por aerosol de 24 μg de IgG específica a ratones durante 20 minutos evita la muerte que causarían al cabo de una hora, de la exposición, los aerosoles de ricina y menos del 5% tendrian lesiones pulmonares.Ni los aerosoles de IgG administrados tardiamente, ni la intravenosa tienen efectividad. Kende y cols. (2002) vacunaron por vía oral al ratón con un carrier que libera toxoide de ricina en una pauta breve de 4 semanas poniendo seis o siete dosis de 25 microgramos los días 1, 2, 3, 14, 15, 16 y 30, o los 1, 2, 14, 15, 30, 31 y 32, o larga durante 7 semanas siete dosis de 50 microg de vacuna ricina-toxoide microencapsulada por incorporación dentro de esferas de poli DL galactido-glicoluro (DL PLG) o en forma acuosa administrada los días 1, 2, 3, 28, 29, 30 y 49.

La pauta larga produjo anticuerpos IgG, IgG2a e IgA demostrables por ELISA quedando protegidos contra aerosoles de ricina pero la acuosa no produjo esos anticuerpos y los ratones no quedaron protegidos. Con el esquema breve el estimulo fue menor que tampoco tenía la forma acuosa; la reduccion del número de dosis impidió la protección. Es decir que la inmunizacion depende de la dosis y de la pauta de administración.

BIBLIOGRAFÍA DE RICINA

(1) AFRIN, L. B.; GULICK, H.; VESELY, J.; WILLINGHAM, M.; FRANKEL, A. E.;(1994) *Expression of oligohistidine-tagged ricina B chain in Spodoptera frugiperda. Bioconjug Chem.* 5:539-546.

(2) BALINT, G. A.;(1974) *Ricina: The toxic protein of castor oil seeds. Toxicology.* 2:77-102.

(3) BARBIERI, L.; BALTELLI, M.; STIRPE, F.;(1993) *Ribosomes-inactivating proteins from plants. Biochemica Biophysica Acta.* 1154:237-282.

(4) BINGEN, A.; CREPPY, E. E.; GUT, J. P.; DIRHEIMER, G.; KIRN, A.;(1987) *The Kupffer cell is the first target in ricina-induced hepatitis. J Submicrosc Cytol.* 19:247-256.

(5) BRIGOTTI, M.; ALFIERI, R.; SESTILI, P.; BONELLI, M.; PETRONINI, P. G.; GUIDARELLIM, A.; BARBIERI, L.; STIRPE, F.; SPERTI, S.;(2002) *Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricina in human endothelial cells.FASEB* J. 16: 365-72.

(6) BRUGSCH, H. G.;(1960) *Toxic hazards: The castor bean. MÁSs Med Soc.*262:1039-1040.

(7) CHRISTIANSEN, S. P.; PETERSON, D.; TO, T.; YOULE, R.; MCLOON, L.;(2002) *Long term effects of ricina mAb 35 on extraocular muscles of rabbits: potential treatment for strabismus. Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43: 679-85.

(8) CROMPTON, R.; GALL, D.;(1980) *Georgi Markov: Death in a pellet. Med Leg J*. 48:51-62.

(9) DAY, P. J.; OWENS, S. R.; WESCHE, J.; OLSNES, S.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M.;(2001) *An interacción between ricina and calreticulin that may have implicacións for toxin trafficking. J Biol Chem.* 276: 7202-8.

(10) DAY, P. J.; PINHEIRO, T. J.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M.;(2002) *Binding of ricina A chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. Biochemistry*. 41: 2836- 43.

(11) DEEKS, E. D.; COOK, J. P.; DAY, P. J.; SMITH, D. C.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M.; (2002) *The low lysine content of ricina A chain reduces the risk of proteolytic degradación after translocación from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Biochemistry*. 12, 41: 3405-13.

(12) DERENZINI, M.; BONETTI, E.; MARIONOZZI, V.; STIRPE, F.;(1976) *Toxic effects of ricina: Studies on the pathogenesis of liver le-sions.Virchows Arch B Cell Pathol*. 20:15-28.

(13) EHRLICH, P.;(1891) *Experimentelle Untersuchungen über Immunität, II: Euber Abrin. Deutsch Med Wochenschr.*17:1218-1219.

(14) ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K.;(1987) *The mechanism of action of ricina and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes: The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. J Biol Chem*. 262:5908-5912.

(15) FODSTAD, O.; KVALHEIM, G.; GODAL, A. Y COLS.(1984) *Phase I study of the plant protein ricina. Cancer Res*. 44:862-865.

(16) FRANKEL, A.; ROBERTS, H.; AFRIN, L.; VESELY, J.; WILLINGHAM, M.;(1994) *Expression of ricina B chain in Spodoptera frugiperda.Biochem J.* 303:787-794.

(17) GHOSH, P.; WELLNER, R.; CRAGOE, E.; WU, H.;(1985) *Enhacement of ricina cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells by depletion of intracellular K +: Evidence for Na + H + exchange system in Chinese hamster ovary cells. J Cell Biol.*101:350-357.

(18) HAZES, B.; READ, R. J.;(1997) *Biochemistry* 36:11051-1054.

(19) HE, W.J.; TANG, S.; LIU, W. Y.; STIRPE, F.;(2002) *Nonspecific deadenylación on sarcin ricina domain RNA catalyzed by gelonin under acidic conditions. Arch Biochem Biophys.* 399: 181-7.

(20) HEWETSON, J.; RIVERA, V.; LEMLEY, P.; PITT, M.; CREASÍA, D.; THOMPSON, W.;(1996) *A formalinized toxoid for protection of mice from inhaled ricina. Vaccine Research.* 4:179-187.

(21) HONJO, E.; WATANABE, K.; TSUKAMOTO, T.;(2002) *Real time kinetic analyses of the interacción of ricina toxin A chain with ribosomes prove a conformaciónal change involved in complex formación. J Biochem (Tokyo)*. 131: 267-75.

(22) HOWAT, A. J.;(1988) *The toxic plant proteins ricina and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. J Pathol.* 154:29-33.

(23) HU, R. G.; ZHAI, Q. W.; HE, W. J.; MEI, L.; LIU, W. Y.;(2002) *Bioactivities of ricina retained and its inmunoreactivity to anti ricina polyclonal antibodies alleviated through pegylación. Int J Biochem Cell Biol*. 34: 396-402.

(24) HUDSON, T.; NEVILLE, D.;(1987) *Temporal separation of protein toxin translocation from processing events. J Biol Chem.* 262:16484-16494.

(25) KAGEYAMA, A.; KUSANO, I.; TAMURA, T.; ODA, T.; MURAMATSU, T.;(2002) *Comparison of the apoptosis inducing abilities of various protein synthesis inhibitors in U937 cells. Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 835-9.

(26) KENDE, M.; YAN, C.; HEWETSON, J.; FRICK, M. A.; RILL, W. L.;(2002) *Tammariello R Oral inmunización of mice with ricina toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres against aerosol challenge. Vaccine.* 20: 1681- 9.

(27) KUSANO, I.; KAGEYAMA, A.; TAMURA, T.; ODA, T.; MURAMATSU, T.;(2001) *Enhancement of diphtheria toxin induced apoptosis in Vero cells by combinación treatment with brefeldin A and okadaic acid. Cell Struct Funct.* 26: 279- 88.

(28) LIPPS, B. V.;(2001) *Producción of polyclonal antibodies in mice against cobratoxin, botulinum toxin and ricina without altering their toxicity or use of adjuvant. Nat Toxins*. 10: 27-32.

(29) LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D.;(1994) *Ricina: Structure, mode of action, and some current applications. FASEB J.* 8:201-208.

(30) LUTSKY, I.; MOR, N.; YAGEN, B.; JOFFE, A Z.;(1978) *The role of T-2 toxin in experimental alimentary aleukia. Toxicol appl Pharmcols.* 42:111.

(31) MANZKE, O.; RUSSELLO, O.; LEENEN, C.; DIEHL, V.; BOHLEN, H.; BERTHOLD, F.;(2001) *Inmunotherapeutic strategies in neuroblastoma. Antitumoral activity of deglycosylated Ricina A conjugated anti GD2 antibodies and anti CD3xanti GD2 bispecific antibodies. Med Pediatr Oncols.* 36: 185-9.

(32) MASUDA, E.; KEMOTO, T. T.; TSUNO, T. T. A.;(1982) *Obara T. Inducción of suppressor macrophages in mice by Fusarenon. Inmunol.* 47:701.

(33) MILLER, D. J.; RAVIKUMAR, K.; SHEN, H.; SUH, J. K.; KERWIN, S. M.; ROBERTUS, J. D.;(2002) *Structure based design and characterización of novel platforms for ricina and shiga toxin inhibición. J Med Chem*. 45: 90-8.

(34) MOISENOVICH, M. M.; DEMINA, I. A.; AGAPOV, I. I.; CHELNOKOVA, O. V.; KOZLOVSKAYA, N. V.; BEREITER HAHN, J.; TONEVITSKY, A. G.; SHUMAKOV. V. I.;(2002) Ricina and viscumin bind to different sites of the cell membrane. Dokl Biol Sci.

(35) MOYA, M.; DAUTRY-VARSAT, A.; GOUD, B.; LOUVARD, D.; BOQUET, P.;(1985) *Inhibition of coated pit formation in Hep 2 cells blocks the cytotoxicity of diptheria toxin but not that of ricina toxin. J Cell Biol.* 101:548-559.

(36) OLSNES, S.;(1987) *Closing in on ricina action. Nature*. 328:474-475.

(37) OLSNES, S.; PIHL, A.;(1986) Construction and properties of chimeric toxins target specific cytotoxic agents. In: Dorner, F.; Drews, J.; eds. Pharmacology of Bacterial Toxins. New York, NY: Pergamon Press.

(38) OLSNES, S.; PIHL, A.;(1982) *Toxic lectins and related proteins. In: Cohen P, van Heyningen S, eds. Molecular Action of Toxins and Viruses. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Biomedical Press* 51-105.

(39) PALOSUO, T.; PANZANI, R. C.; SINGH, A. B.;(2002) *Ariano R, Alenius H, Turjanmaa K.Allergen cross reactivity between proteins of the latex from Hevea brasíliensis, seeds and pollen of Ricinaus communis, and pollen of Mercurialis annua, members of the Euphorbiaceae family.Allergy Asthma Proc.*23:141-7.

(40) POLI, M. A.; RIVERA, V. R.;(1994) *Hewetson JF, Merrill GA. Detection of ricina by colorimetric and chemiluminescence ELISA. Toxicon.* 32:1371-1377.

(41) RAMSDEN, C.; DRAYSON, M.; BELL, E.;(1989) *The toxicity, distribution, and excretion of ricina holotoxin in rats. Toxicology.* 55:161-171.

(42) RAUBER, A.; HEARD, J.;(1985) *Castor bean toxicity re-examined: A new perspective. Vet Hum Toxicols.* 27: 498-502.

(43) ROBERTUS, J.;(1988) *Toxin structure. In: Frankel A, ed. Immunotoxins. Boston, MÁSs: Kluwer Academic Publishers*; 11-24.

(44) ROBERTUS, J.; PIATAK, M.; FERRIS, R.; HOUSTON, L.;(1987) *Crystallization of ricina A chain obtained from a cloned gene ex-pressed in Escherichia coli. J Biol Chem.* 262:19-20.

(45) RUTENBER, E.; KATZIN, B.;COLLINS, E. Y COLS.(1991) The crystallographic refinement of ricina at 2.5 Å resolution. Proteins.10:240-250.

(46) SANDVIG, K.; OLSNES, S.; PIHL, A.;(1976) *Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricina to surface receptors of human cells. J Biol Chem.* 251(13): 3977-3984.

(47) SCHNELL, R.; STAAK, O.; BORCHMANN, P.; SCHWARTZ, C.; MATTHEY, B.; HANSEN, H.; SCHINDLER, J.; GHETIE, V.; VITETTA, E. S.; DIEHL, V.; ENGERT, A.;(2002) *A Phase I study with an anti CD30 ricina A chain inmunotoxin (Ki 4.dgA) in patients with refractory CD30+ Hodgkin's and non Hodgkin's lymphoma.Clin Cancer Res.* 8:1779-86.

(48) SHARON, N.; LIS, H.;(1972) *Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science.* 177:949-959.

(49) SHYU, R. H.; SHYU, H. F.; LIU, H. W.; TANG, S. S.;(2002) *Colloidal gold based inmunochromatographic assay for detección of ricina. Toxicon.* 40: 255-8.

(50) SOLER-RODRIGUEZ, A.; GHETIE, M.; OPPENHEIMER-MARKS, N.; UHR, J.; VITETTA, E.; (1993) *Ricina A-chain and ricina A-chain immunotoxins rapidly damage human endothelial cells: Implications for vascular leak syndrome. Experimen-tal Cell Research.*206: 227-234.

(51) TETER, K.; HOLMES, R. K.; (2002) *Inhibición of endoplasmic reticulum associated degradación in CHO cells resistant to cholera toxin, Pseudomonas aeruginosa exotoxin A, and ricina. Infect Inmun.* 70: 6172-9.

(52) THOMPSON, W.; SCOVILL, J.; PACE, J.; (1995) *Drugs that show protective effects from ricina toxicity in in-vitro protein synthesis assays. Natural Toxins.* 3:369-377.

(53) THORPE, P. E.; MÁSON, D. W.; BROWN, A. N. Y COLS.(1982) *Selective killing of malignant cells in leukemic rat bone marrow using an antibody-ricina conjugate. Nature* 297:594-596.

(54) UCKEN, F.; FRANKEL, A.;(1993) *The current status of immunotoxins: An overview of experimental and clinical studies as presented at the 3rd International Symposium on Immunotoxins. Leukemia.* 7:341-348.

(55) VITETTA, E.; KROLICK, K.; MUNEO, M.; CUSHLEY, W.; UHR, J.;(1983) *Immunotoxins: A new approach to cancer therapy. Science.* 219:644-649.

(56) VITETTA, E.; THORPE, P.; UHR, J.;(1993) *Immunotox ins: Magic bullets or misguided missiles? Trends Pharmacol Sci.* 14:148-154.

(57) WALES, R.; RICHARDSON, P. T.; ROBERTS, L. M.; WOODLAND, H. R.; LORD, J. M.;(1991) *Mutational analysis of the galactose binding ability of recombinant ricina B chain. J Biol Chem.* 266:19172-19179.

(58) WILHELMSEN, C.; PITT, L.;(1993) Lesions of acute inhaled lethal ricina intoxication in rhesus monkeys. Vet Pathol. 30:482.

(59) YAN, C.; RESAU, J. H.; HEWETSON, J.;(1994) *West M, Rill W, Kende M. Characterization and morphological analysis of protein-loaded polylactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. J of Controlled Release*. 32:231-241.

(60) YOULE, R.; HUANG, A.;(1976) *Protein bodies from the endosperm of castor beans, subfractionation, protein components,lectins, and changes during germination. Plant Physiol*. 58:703.

(61) YOULE, R.; NEVILLE, D.;(1982) *Kinetics of protein synthesis inactivation by ricina-anti-thy.1.1 monoclonal antibody hy-brids: Role of the ricina B subunit demonstrated by reconstitution. J Biol Chem.* 267:1598-1601.

(62) ZENILMAN, M. E.; FIANI, M.; STAHL, P.; BRUNT, E.; FLYE, M. W.;(1988) *Use of ricina A-chain to selectively deplete Kupffer cells. J Surg Res.* 45:82-89.

BIBLIOGRAFÍA DE TOXINAS DE PLANTAS

(1) YAU-TING, T.; PUI-HAY, B. Y., YOUNG, K.; CHU-PAK, L.;(1992) *Cardiotoxicity after accidental herb-induced aconite poisoning. Lancet 340*: 1254-56.

TOXINAS DE ALGAS Y CIANOBACTERIAS EN AGUAS DULCES

Las ‘algas verde-azules’o «cianobacterias» o cianofíceas, no son verdaderas algas. Se trata de grandes células procariotas provistos de pigmentos carotenoides, ficocianina, ficoeritrina y sobre todo de clorofila a que son pigmentos azul-verdosos o verdes capaces de fotosíntesis pues son aerobios fotoautotróficos y con ello, productores de oxígeno. Las algas de los géneros Nostoc, Anabaena y Calothrix, fijan nitrógeno, lo que les confiere interés agrícola. Debieron ser de los primeros colonizadores de la Tierra, ya que se han encontrado fósiles de unos 3,5 billones de años en rocas sedimentarias en Austrália, contribuyendo a la liberación de oxígeno a la atmósfera primitiva.

Al ser bacterias carecen de núcleo, de mitocondrias con membrana, vacuolas, inclusiones de un almidón propio de las cianofíce-

as (Bold, 1973). Son los únicos organismos que forman heterocistes. Prefieren un pH de 6 a 9 es decir neutro o ligeramente alcalino, temperatura entre 15 a 30Cº. Sus exigencias culturales son ínfimas solo agua, anhídrico carbónico, sales y luz; algunas especies se desarrollan solo sobre las rocas, pero la mayoría lo hace en el agua dulce como las Dynophyceae y las Prymnesiophyceae de rios pantanos, lagunas y lagos.

El aumento de la contaminación del agua dulce con fertilizantes con desechos industriales, aguas fecales etc. aportan N, P y otros nutrientes que favorecen el desarrollo de cianobacterias. Azevedo y cols. (1994), señalaron aumento de las cianobacterias en el agua cercana a ciudades con elevada concentración de nutrientes, especialmente de nitrógeno y de fósforo es decir las aguas eutroficadas que se facilita por los efluentes de aguas a elevadas temperaturas como los de las torres de refrigeración de centrales nucleares que estimulan la proliferación desmedida. Cada vez son mas frecuentes las floraciones tóxicas, lo «blooms» de microalgas de cianobactérias, en la superficie del agua, formando una capa densa de varios centímetros de espesor formada por el fitoplancton del agua dulce (microalgas y cianobacterias) con disminución la biodiversidad, dificultando la depuración natural y aumentando los gastos de la artificial.

Muchas especies de cianobacterias planctónicas poseen unas vesículas cilíndricas con un calibre inferior a los 300 nm, agrupadas y llenas de un gas, cuya cantidad global permite a las cianobacterias desarrollarse óptimamente en la profundidad mas favorable. Por ej si el agua es turbulenta disminuye la flotabilidad, y se desarrollan profundamente hasta que el agua está más calmada acumulándose en la superficie en forma de espuma o de gelatina azul verdosas o cobrizas o florecimientos que el viento lleva a las orillas o unido al oleaje disgrega los florecimientos.Si el crecimiento de las cianobacterias es muy grande la espuma es muy densa conteniendo más de mil veces cianobacterias que el agua libre. Las especies productoras de mucílago dan espumas gelatinosas. La descomposición bacteriana descomponen las espumas dando mal olor y consumiendo mucho oxígeno. Las mantas que cubren la superficie sólo crecen en aguas claras, donde la luz solar penetra hasta el fondo. En días soleados, su fotosíntesis incrementa la

producción de oxígeno, cuyas burbujas desintegran las mantas y las transportan a la superficie.

El 47% de las floraciones analizadas en diferentes países son tóxicas en bioensayos (Carmichael y cols. 1981. Repavich y cols.1990, Sivonen y col, 1990. Lawton y Cood 1991, Watanabe y col,1991, Costa y cols. 1995).

La ingestión de mantas de cianobacterias bénticas en la orilla ha causado la muerte de perros (Edwards y otros, 1992); y ha causado la muerte de ganado en las praderas alpestres de Suiza (Mez y cols., 1997, 1998). Si bien es relevante para mascotas y ganado, el impacto de estas cianobacterias sobre la salud humana en las playas es considerablemente menor que el de las espumas en el agua. Sin embargo, es importante ser conscientes de la toxicidad potencial de estas mantas ya que se acumulan a lo largo de la orilla de aguas claras, las cuales generalmente no se identifican como aguas con potencial para la producción de cianobacterias o algas peligrosas.

La producción de toxina por parte de algas y cianobacterias supone poco riesgo si no existen mecanismos, para concentrar la toxina. Este mecanismo se produce por la formación por las algas de agua dulce de floraciones o de espumas superficiales densas en las que se acumulan las cianobacterias y sus toxinas, quedando el agua subyacente con pocas tóxinas por lo tanto sin afectar a la fauna acuática ni a la de los animales que la beben. Las Anabaena, Aphanizomenon, Nodularia, Oscillatoria, Gloeotrichia de agua dulce pueden irritar la piel y aún más algunas algas marinas (Pilotto y cols. 1997). Kuiper-Goodman y cols. (1998) describieron la aparición en trópicos, de graves dermatitis parecidas a quemaduras debidas al baño en el mar rico en cianobacterias desprendidas por las tormentas. Hay relación entre la densidad de cianobacterias y la duración del contacto pero al no existir siempre correlación con las concentraciones de microcistinas,hace pensar que el efecto irritativo se deba a factores asociados.

Las algas, no cianobacterias no se acumulan como espuma superficial y por lo tanto, las concentraciones de sus metabolitos incluidas las toxinas son bajas, pero si hay una elevada concentración basta un breve contacto con ella para irritar la piel y las mucosas.La piel de los buzos sufre reacciones irritativas debidas al acúmulo entre la piel y el traje, de

algas que se rompen por la presión y fricción entre la tela y la piel liberando el contenido celular. Lo mismo puede ocurrir con los bañadores.En el mar la concentración se produce en los moluscos en cuyas branquias se retienen los dinoflaglados (Gallachery cols. 1997) y las toxinas se concentran en el hepatopáncreas; los moluscos no se afecten por la toxina, pero el hombre, animales incluso los peces que los comen, desarrollan enseguida síntomas.

Las cianotoxinas protegen a las algas de la acción depredadora de los herbívoros, de forma semejante a como actúan algunos catabolitos de plantas vasculares (Carmichael,1992, 1994). La toxicidad de las floraciones de las cianobacterias presenta variaciones en el tiempo que pueden ser de ciclos cortos o de años asi como variaciones según zonas de las colecciones hídricas que se atribuyen a distintas proporciones de las cepas genéticamente tóxicas respecto a las no productoras de toxinas o debido a variaciones de la luminosis, de la temperatura y de los nutrientes. Los extractos de cianobacterias son tóxicos para los huevos de peces (Oberemm y otros 1997) aunque este efecto no se debe a ninguna cianotoxina conocida.

Las espumas de cianobacterias tóxicas provocan pérdidas cuantiosas a la industria y a la pesca y causan intoxicaciones a animales y al hombre por ingesta y por contacto

Algunas especies se pueden desarrollar en las aguas salobres y en las costeras, poco movidas de todo el mundo. De ellas son tóxicas los Prymnesium. El aumento constante de mareas rojas causada por dinoflagelados es una muestra de la eutrofización de las aguas costeras. La Nodularia spumigena es una cianobacteria del agua salobre que puede formar espuma superficial; es el organismo que más se ha extendido. En general los florecimientos de cianobacterias se deben a especies planctónicas en aguas eutróficas, pero algunas especies, son bénticas que se desarrollan en sedimentos. A veces, las mantas bénticas también pueden causar problemas en aguas oligotróficas

Se conocen como mínimo 46 especies con actividad tóxica (Sivonen y Jones, 1998), la mayoría de las cuales contiene cepas no tóxicas. En Brasil el 75% de las cepas aisladas producen cianotoxinas la mayoria hepatotóxicas (Costa y Azevedo, 1994); siendo las más comunes diversas especies de los géneros Anabaena, Microcystis, Schizothrix, Aphanizo-

menon,Synechococcus, Gloeotrichia, Lyngbya, Nostoc y Synechocystis,más las especies Plankttothrix (sin. Oscillatoria) rubescens y agardhii, y la Cylindrospermopsis raciborskii

La inhalación de cianotoxinas puede causar irritación de las vías respìratorias.

Se ha señalado un brote en los pacientes que recibían hidro masajes y en el personal que lo aplicaba. Además de la toxina la Staurastrum gracile, dispone en su pared espinas que pueden irritar las mucosas (Naglitsch, 1998).

CIANOTOXINAS

Son neurotoxinas, como los alcaloides o los organofosforados que actúan muy rápidamente matando por parálisis respiratoria a los pocos minutos de la exposición, o son péptidos hepatotóxicos que actuan mas lentamente.

El tipo y la densidad de las algas y su contenido tóxico determinan el riesgo y por ello la mayoria de las intoxicaciones se han señalado en los paises del Norte de Europa, en América, en Australia, China y Suráfrica (Falconer, 1994). es decir en países industrializados. Las cianotoxinas han originado numerosas muertes de animales domésticos y salvajes, roedores —murciélagos— y hasta peces y aves acuáticas por beber agua con una gran carga de cianobacterias (Codd y cols. 1989) o al bañarse en ellas, debido a lamerse la piel, en la que queda espuma. La ingesta de una dosis subletal se sigue de restituto ad integrum sin que dejen, como pasa con las microcistinas y las cilindrospermopsina, daño permanente.

El hombre se puede intoxicar en raros casos, al beber o inhalar agua con cianobacterias y se han dado casos de muerte (Jochimse y cols. 1998) debidas casi siempre a accidentes o al uso de antifúngicos como el sulfato de cobre que lisa a las cianobacterias liberando a las cianotoxinas que estaban retenidas en las espumas y en las algas intactas

Pilotto y cols. (1997) encontraron elevada incidencia de diarrea, dolor abdominal, vómito, síntomas de gripe, cefalea, erupciones, ampollas y úlceras orales, fiebre, irritación ocular,de oído garganta y cutánea, a los 2 a 7 días de haber estado expuestas a aguas con algas, aumentando la

frecuencia de los síntomas a medida que lo hacía la duración del contacto con el agua y con la densidad de cianobacterianas, pero no lo estuvieron con el contenido de cianotoxinas por una encuesta prospectiva sobre 852 personas. Charmichael (1995) añadió la presentación de disnea, mareos, cansancio, neumonía atípica, disturbios neurológicos, hepáticos, con elevación de las transaminasas, especialmente de la gamma glutamil transferasa. Teixeira y cols. (1993) hallaron alta correlación entre la presencia de espumas de cianobacterias, en los depósitos de agua de Itaparica (Bahia) con la muerte de 88 personas, entre las 200 intoxicadas, entre marzo y abril de 1988.

Las cianobacterias y otras algas, pueden contener alergenos. que pueden no ser cianotoxinas como la ficocianina (Cohen y Reif 1953). Las reacciones se presentan en personas que contactan con aguas con alta densidad de cianobacterias. Los test cutáneos permiten descubrir el agente alergizante. Heise (1949, 1951) describió irritaciones oculares y nasales en bañistas expuestos a Oscillatoriaceae. McElhenny y cols.(1962) encontraron que la inyección intradérmica de extractos de cuatro especies de cianobacterias y chlorophyceae a 120 niños con alergias respiratorias, daba en el 82% intensa reacción positiva al menos a una de las cepas de prueba sin que fuera positiva en ninguno de los 20 niños no alérgicos. El 25% de 4.000 pacientes con alergias respiratorias de la India daban positivas los tests a chlorophyceaes o a cianobacterias, o a ambas (Mittal y cols.1979). Chorus en 1993 observó graves rescciones cutáneas debidas a espumas de Uroglena spp. Por todo ello deben vigilarse y filtrar las aguas, para bebida y para el baño, y mas estrictamente para las usadas en diálisis

Las toxinas más importantes producidas por las cianobacterias son:

1. Las **MICROCISTINAS**, Hughes y cols. (1958) encontraron que cianobacterias de las floraciones especialmente las debidas a Microcystis aeruginosa,contenian una toxina que afectaba intensamente al hígado de animales de laboratorio. La propiedad de sintetizar microcistinas se debe a genes cuya expresión depende de factores ambientales (Dittmann y cols. 1997, Rouhainen y cols., 1997).

Las microcistinas forman un grupo de unos 60 heptapéptidos cíclicos, (Bishop y cols. 1959) de 994 d, cuya estructura general es D-Ala-X-

D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha, siendo X y Z, dos L aminoácidos, de los que parte una cadena lateral de aminoácidos (ADDA), específica y de la nodularina que varian según la microcistina el D-MeAsp y el D-eritro ácido metilaspártico, el Mdha y el N-metildeidroalanina (Carmichael y cols., 1988). Carmichael y cols. (1988) basados en los dos L-aminoácidos clasifican a las microcistinas, como LR (leucina-arginina), RR (arginina-arginina) o YA (tirosina-alanina). Además el ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, que está también en las nodularinas (Harada y cols.,1990; Nishiwaki-Matusushima y cols.,1992).Las microcistinas presentan diferentes hidrofilia e hidrofobia,tienen grupos metilo de los que depende su toxicidad hepática. (Rinehart y otros, 1994; Sivonen y Jones,1998). Su efecto tóxico es mas lento que el de las neurotoxinas matando entre unas horas a varios días por hemorragia intra-hepática y shock hipovolémico.

Las microcistinas recibieron el nombre del alga en la que se encontraron por primera vez, pero la mayoría de ellas se encuentran en algas de muchos géneros y especies las cuales a su vez contienen varias microcistinas y neurotoxinas. Las microcistinas son producidas por la mayoría de las especies de Microcystis, comunes y ubicuas y por varias cepas de algunas especies de Anabaena spp, algas que frecuentemente forman espumas superficiales ricas en microcistinas. Tambien producen microcistinas las Nodularia,las Nostoc las Planktothrix (u Oscillatoria) agardhii y la P. rubescens según (Fastner y cols. 1999), no formadora aquella y solo a veces esta de espuma durante la temporada de baño y por especies de Cylindrospermopsis (Carmichael, 1992). La LR tiene una DL_{50} para el ratón inoculado en peritoneo de 25-125 µg kg producida por las algas Anabaena y Anabaenopsis. La YR cuya DL_{50} para el ratón inoculado en peritoneo es de 70 µg kg producida por las Hapalosiphon y la RR cuya DL_{50} para el ratón inoculado en peritoneo es de 300-600 µg kg. La toxicidad es algo menor por vía oral. Dosis algo menores que la letal no manifiestan síntomas, siendo la linea que relaciona la dosis con la respuesta muy aguda. Es posible la entrada aerea que necrosa los epìtelios nasales. Fitzgeorge y cols. (1994). La DL_{50} media de diversos autores y vías de entrada es de 50 µg kg para el ratón.

El cuadro clínico consiste en prostración, vómitos, diarrea dolores cólicos y anorexia.(Carmichael Schwartz,1984; Beasley y cols., 1989).

Las microcistinas, lesionan a las células eucariotas con las que contactan; se unen por un enlace covalente irreversible a las proteín-fosfatasas de tipo 1 y 2A de las células eucariotas (Mackintosh y cols. 1990, Matsuhima y cols. 1990; Yoshizawa y cols. 1990), importantes «conmutadores moleculares», inactivándolos; los efectos dependen por consiguiente de su distribución en el organismo. La piel, y las mucosas de entrada sufren sus efectos; las ingeridas actúan sobre el epitelio intestinal. Las microcistinas ingresan en los hepatocitos, que son las células más afectadas por ellas, a través de los receptores de los ácidos biliares (Runnegar y cols.1981, Erikson y cols., 1990; Falconer, 1991) desorganizando los filamentos intermediarios y los de actina, que son polímeros protéicos (Runnegar y cols. 1986) del citoesqueleto, de modo que se retraen los hepatocitos,dejando espacios entre ellos y con los endotelios de los capilares sinusoidales que son llenados por sangre (Hooser y cols., 1991; Carmichael 1994, Lambert y cols. 1994).

Como cualquier agente que acelere el ciclo celular al lesionar las células preexistentes tienen efectos cancerígenos. Ademas la inactivación de las fosfatasas elimina el efecto de estos frenos normales del ciclo célular. Son potentes promotores de tumores hepáticos (Falconer,1991; Fujiki,1992; Nishiwaki-Matsuhima y cols.,1992). Las microcistinas por vía oral promueven la cancerogénesis del dimetilbenzoantraceno, aplicado a la piel de ratones. (Falconer y Buckley, 1989; Falconer y Humpage, 1996). La exposición crónica a agua con microcistinas aún a dosis bajas pudiera suponer riesgo de cáncer hepático. La microcistina-LR, que es hidrofóbica, asociada a la dietilnitrosamina por inyección intraperitoneal durante varias semanas, promueve la producción de focos y nódulos preneoplásicos hepáticos (Nishiwaki-Matushima y cols. En China, la incidencia del cáncer hepático está claramente relacionada con el abastecimiento hídrico siendo bastante superior en las comunidades que se surten de agua superficial con cianobacterias que en las que beben aguas subterráneas (Yu, 1995). Causan hemorragia del hígado y causar daño acumulativo.

Hindman y cols. en 1975 atribuyeron un cuadro endotóxico aparecido en 23 insuficientes renales en los que el agua de diálisis procedente de un depósito a las abundantes cianobacterias. Jochimesen y cols. (1989) atribuyeron a las cianotoxinas la muerte de un paciente sometido a diáli-

sis renal A comienzos de 1996, el 43,1% de 130 pacientes renales crónicos, sometidos a diálisis en una clínica de Caruaru sufrieron un cuadro hepatotóxico grave de los que 54 murieron a los cinco meses se haber aparecido el cuadro. Se encontraron microcistinas en el carbón activado usado para purificar el agua asi como en la sangre y en hígados que tenían la misma concentración de microcistinas que los de los animales de laboratorio intoxicados con una dosis letal de microcistina (Carmichael, 1996, Azevedo, 1996). Por ello la intoxicación con microcistinas, se llamó «Síndrome de Caruaru».

El agua natural puede contener microcistinas procedente de las algas acuáticas. La cantidad de agua bebida parece relacionada con la gravedad de la enfermedad. El baño permite la entrada por las mucosas de los ojos, oído, boca y garganta y la inhalación de aerosoles que se producen inevitablemente durante el baño y aún mas si se nada o por el esquí acuático que forman microgotas que en parte se degluten aún de forma inaparente. El riesgo es mayor si las gotitas son de espuma, del agua contaminada. El bañador y más el traje de bucear, retienen cianobacterias y las rompen,facilitando la absorción cutánea.

En 1959 en Saskatchewan 13 bañistas presentaron cefaleas, náuseas, algias musculares y diarreas con cólico. Dillenberg y Dehnel, (1960) encontraron en las heces de un paciente que había ingerido unos 300 ml de agua Microcystis spp. y algunas tricomas de Anabaena circinalis. En 1989 en Gran Bretaña, diez de un total de veinte soldados que habían nadado y practicado el canotaje en aguas con un gran florecimiento de Microcystis spp enfermaron y dos con una neumonía que requirió UVI, que se atribuyó a la inhalación de la toxina del Microcystis y que tuvieron que ser hospitalizados e ingresar en la unidad de cuidados intensivos (Turner y otros, 1990). En una azucarera, cercana a Malmö (Suecia) se produjo en 1994 una conexión del agua potable con agua sin tratar de un río densamente poblada de Planktothrix agardhii productor de microcistinas, durante varias horas. De los 304 habitantes del pueblo, 121 (más algunos perros y gatos) sufrieron vómitos, diarrea, calambres musculares y náuseas (Cronberg y cols. 1997).

La ingesta de microcistinas, aumenta las tasas de enzimas hepáticas como encontrararon en 1981 en los habitantes de Armidale, (Australia), Falconer y cols.(1983) abastecida con agua superficial con Microcystis

spp. Dosis subletales producen hepatomegalia lesión que puede utilizarse para valorar la toxicidad, pero sin repercusión sintomática que solo aparece cuando la necrosis hepática es grande. La regeneración hepática restaura la normalidad si no se sigue absorbiendo la toxina. Una dosis letal de microcistina necrosa los hepatocitos a los 15 a 50 minutos de la entrada de la toxina, causando la muerte en pocas horas o días.La rifampicina evita la muerte de los animales intoxicados con microcistina si se la administra a los 15-30 minutos de la toxina. La toxicidad de la microcistina es acumulativa (Fitzgeorge y cols. 1994) de modo que es mucho mas peligrosa la entrada fraccionada de una determinada dosis que el total de una vez. Tambien producen alteraciones del estómago e intestino. (Carmichael, 1994).Las anatoxinas potencian la toxicidad de las microcistinas. Es posible la contamación provocada deliberadamente del agua por las microcistinas.

2. La **CILINDROSPERMOPSINA**, es el alcaloide hepatotóxico de las especies de cianobactérias,el Cylindropermopsis raciborskii (Ohatoani y cols.1992) y en la Umemzakia natans (Harada y cols.1994)., algas de agua dulce tropical y subtropical, pero se ha encontrado en Viena (Roschitz, 1996) y en regiones templadas (Padisák, 1997). La cilindrospermopsina inhibe la síntesis proteica. Los síntomas aparecen sólo unos días después de la exposición, lo que dificulta reconocer la causa, La cilindrospermopsina lesioma el riñón y el hígado y los extractos crudos, pero no la toxina pura pueden lesonar los pulmones, las glándulas suprarrenales y el intestino causando intoxicaciones que requieren UCI (Falconer, 1997).

3. Las **NODULARINAS**, son pentapéptidos cíclicos, es decir con estructura y por tanto con efecto hepatotóxicos similares a los de las microcistinas producidas por la Nodularia spumigena (Sivonen y cols., 1989) de aguas salobres y marinas, que forman florecimientos. Existen al menos ocho nodularinas según el grado de metilación y de la composición e isomerización de sus aminoácidos. Las nodularinas inhiben a las protein fosfatasas 1 y 2. Su DL_{50} por ip al ratón es de 30-50 µg kg y para Rinehart y cols. (1994) 50 a 200 µg kg.Ha causado intoxicaciones naturales en animales.

4. Las **ANATOXINAS**. La palabra anatoxina, es la contracción de ana, contrario y de toxina, es decir es sinónima de toxoide, nombre usa-

do para designar toxinas bacterianas detoxificadas por Ramon por medio del calor y el formol. En el contexto de las neurotoxinas se llaman anatoxinas a alcaloides tóxicos de bajo peso molecular, sintetizados por algas verde-azuladas (cianobacterias), de los géneros Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis y Planktothrix (Oscillatoria) y Cylindrospermum en los que alcanza una concentración de 250 µg kg. Termolábiles; polares, por lo que a diferencia de los OF, no atraviesan la barrera hematoencefálica, y por tanto no inhiben a la colinesterasas del sistema nervioso central (Cook y cols. 1988 y 1989). Todas las anatoxinas son tóxicas aplicables por sus características como agresivas utilizando como puerta de entrada la inhalación, la ingesta, a través de la piel o parenteral.

Entre ellas tenemos a la anatoxina-a o Very Fast Death Factor (VFDF); fue la primera cianotoxina identificada químicamente. Es una amina secundaria (Devlin y cols., 1977) bicíclica muy hidrosoluble. La toxina tiene un peso molecular de 165 daltons. Es sintetizada por la cianobacteria del agua dulce la Anabaena flos-aquae (Lyngb.), encontrada en Canadá por Gorham y cols. (1964). La anatoxin-a es (+)-diastereoisomero menos tóxico que el estereoisómero. Koskinen la sintetizó en forma racémica en 1985. La DL_{50} i.p. en el ratón es de 200 mg kg de peso, muriendo los animales al cabo de 1 a 20 minutos. Por vía oral la toxicidad es mucho menor. La anatoxina-a es sensible a la luz, el calor y a las bases. La anatoxina-a es un potente agonista de los receptores nicotínicos. (Spivak y cols. 1980, Molloy y cols. 1995). La anatoxina-a puede ingresar por inhalación, inyección, y si está a altas concentraciones por la piel.

Este alcaloide neurotóxico se une de forma irreversible con los receptores nicotínicos y de la acetilcolina postsinápticos, de la placa neuromuscular a los que bloquea, sin que esa unión se degrade por la colinesterasa.Los animales que beben agua con anatoxina-a, sufren desequilíbrio, fasciculación muscular, disnea, cianosis y convulsiones, muriendo si la dosis fue suficiente al cabo de unos minutos o de unas horas, por parada respiratoria.

La anatoxina (a) inhibe irreversiblemente a la acetilcolinesterasa y se fija y estimula enérgicamente a los receptores de la acetilcotina, y como la acetilcolina no se degrada por la colinesterasa, se sobreestimula al músculo, que se fatiga y paraliza, causando la muerte al afectarse los músculos respiratorios. Es decir que la anatoxin-a como la homoanatoxin-a

son bloqueantes postsinápticos de la placa neuromuscular, causando parálisis de los músculos respiratorios e incluso convulsiones. La DL_{50} para el ratón es de unos 250 µg kg i.p. de 150 a 250 µg kg según Fawell y cols. (1999). Valentine y cols. (1991) vieron que la DL para el ratón ip.era mayor de 73 mg kg. Por iv.la DL_{50} es de 386 µg kg para el cloruro de la (+)-anatoxina-a y de 913 µg kg para el cloruro de la forma racémica. La dosis tóxica para un varón adulto es menor de 5 mg.

Los síntomas lógicamente se parecen a los de los organofosforados (Molloy y cols. 1995). La toxina actúa muy rápìdamente apareciendo sacudidas, espasmos musculares y parada respiratoria antes de cinco minutos de la ingestión, muriendo al cabo de unas horas o de minutos si la dosis fue elevada. No tiene tratamiento específico.

La Anatoxina-a(s) es el fosfato de N-hidroxiguanidina de metilo (Matsunaga y cols.,1989). La DL_{50} (i.p.) en el ratón es de 20 mg kg es decir es más tóxica que la anatoxina-a. Inhibe la transmisión nerviosa por bloqueo de los canales de sodio, afectando a la permeabilidad al potasio. La DL_{50} (i.p.) para el ratón es de 10 mg kg.

La anatoxina-a(s) se sintetiza por la Anabaena lemmermannii. tomando los carbonos C-2, C-4, C-5 y C-6 de la l-arginina y los N y O-metilos de la l-metionina, de la glicina y de la l-serina y por la cepa NRC 525-1719 de la Anabaena flos-aquae, distinta de las que producen la anatoxina-a (Gorham y cols.1964, Devlin y cols. 1977). Es el único fosfonato biológico similar a los plaguidas y a los agresivos organofosforados. (Charmichael,1994, (Matsunaga y cols. 1989, Wonnacol y cols. 1992, Skulberg y cols. 1992,Lilleheil y cols. 1997). Es un éster fosfórico de una N-hidroxiguanidina cíclica. La anatoxina-a(s) es más estable en soluciones ácidas que en las neutras o alcalinas.A diferencia de la anatoxina-a y la homoanatoxina-a, no es agonista de los receptores nicotínicos, (Mahmood y cols. 1986, 1987, Cook y cols. 1991). Actúa fosforilizando a la serina de la triada catalítica en el centro activo de la colinesterasa, inactivando de forma irreversible a la acetilcolinesterasa vera. El complejo debe envejecerese rápidamente (Hyde y Carmichael 1991), lo que hace inútil el tratamiento con oximas. Su actividad sobre la enzima del Electrophorus electricus es 22 veces mayor que el fluorfosfato de diisopropilo (DFP) (Mahmood y cols. 1987). Es con la botulínica y las saxitoxinas una de las sustancias más neurotóxicas, más que la anatoxina-a. Su DL_{50} determinada por inyección in-

traperitoneal al ratón es de 20-40 µg kg aunque para Mahmood y cols. 1986 era de 40-60 semejante a la del VX. Inyectada peritonealmente en la rata le produce un grave cuadro hipercolinérgico, lacrimeo, diarrea y rinorrea (Cook y cols. 1990) incontinencia urinaria y fecal, convulsiones, fasciculación y parada respiratoria [Mahmood y cols. 1988) pero además sialorrea intensa, a lo que se debe la «s» de su nombre.

Se piensa que la atropina y las oximas deben ser utiles para tratar a los afectados.

La intoxicación natural se ha observado en animales que bebían agua de charcas o lagos, con anatoxina- a(s) (Mahmood y cols. 1986 y 1988, Cook y cols. 1989, 1991). Henriksen y cols.(1997), Onodera y cols. (1997) atribuyeron a esta toxina una gran mortalidad de aves en Dinamarca en 1993-94. Es posible que la distinta susceptibilidad de las especies animales a la toxina oral sea debida a la diferencia del pH gástrico. Su presencia en lagos y ríos es menos frecuente que la de las microcistinas. Hasta ahora solo se ha encontrado en muy pocas colonias de Anabaena en USA; en las espumas la concentración es baja por lo que son raras, pese a su toxicidad las intoxicaciones humanas.

La homoanatoxina-a, es un derivado semisintético de la anatoxina-a, obtenido por Wonnacott y cols. en 1992, y luego encontrado por Lilleheil y cols. en 1989 en la cianobacteria Oscillatoria formosa en Noruega y en la Oscilatoria rubescens (Skulberg y cols. 1992 y en la O. formosa). Su estructura es similar a la de la anatoxin-a. Su mecanismo de acción es como el de la anatoxina-a; uniéndose e inhibiendo a la acetilcolinesterasa quedando abierto el canal iónico y desorganizando la función muscular al quedar exhausta la placa neuromuscular.

Las anatoxinas son dificiles de obtener y solo se logran en escasa cantidad por lo que no sería factible diseminarlas como aerosoles, pero serían fáciles de ocultar y de transportar sin demasíado riesgo y difíciles de identificar; más probable sería su uso por terroristas que como agresivo de guerra.

El cuadro clínico es pues el de los OF al que hacemos referencia. El pretratamiento con atropina antagoniza los efectos parasímpatico-miméticos y alarga la supervivencia, aunque los animales mueren con fasciculaciones y fallo respiratorio,ya que la atropina no suprime la hiperactividad colinérgica sobre receptores nicotínicos en los músculos respiratorios,

ni los efectos sobre los receptores muscarínicos de los sistemas circulatorio y respiratorio. (Mahmood y cols. 1986, Cook y cols. 1990).

Prevención de las intoxicacioes por cianobacterias

Debe incluirse en la vigilancia del agua la determinación sistemática de cianotoxinas mediante pruebas de toxicidad en ratones, aunque es un método caro, pues debe ser continuo o bien por métodos químicos especificos de cada toxina o inmunoensayos o enzimoensayos con enzimas comercialmente disponibles para las más importantes tales como las microcistinas y la saxitoxina. Las concentraciones deben ajustarse a los límites de seguridad y aceptables de las cianotoxinas es decir los «Maximum Acceptable Level» o MAC, basados en estudios epidemiológicos y sobre todo toxicológicos. Falconer y cols. propusieron en 1994 un MAC para el riesgo de cáncer de 1,0 mg L de microcistina o de nodularina que basándose em eñ uso de células de Microcystis para pienso de cerdos equivaldría a una concentración de 5 millones de cianobacterias por litro. El «Canadian Drinking Water», estableció en 1994 una MAC de 0,5 mg L para la microcistina LR. La Guia de la OMS de 1997 fijó el límite en 1,0 mg L. La vigilancia debe ser muy estrecha para el agua destinada a diálisis renal. Hay que tener en cuenta que las cianobacterias pueden desaparcer de las colecciones de agua antes de que lo hayan hecho las cianotoxinas.

El tratamiento habitual del agua por floculación, precipitación, filtración y cloración eliminan a las cianotoxinas, aunque algunas resisten a la depuración e incluso a la ebullición. Los sistemas de depuración, si no han logrado eliminar a las cianobacterias pueden destruir las células provocando la liberación de sus toxinas. En 1931 un florecimiento masívo de microcystis en los ríos de Ohio y Potomac, cuya agua se trataba por precipitación, filtración y cloración (Tisdale, 1931) causó la intoxicación de unas 6.000 personas que bebieron agua de esos ríos. Falconer (1993,1994) vieron que al tratar el agua de un depósito de Palm Island (Australia), en 1979, con sulfato de cobre en el que habian crecido numerosos Cylindrospermopsis raciborskii intoxicó gravemente a 141 personas que bebieron ese agua. El propio Falconer (1994) calculó que el tratamiento de los florecimientos de cianobacterias tóxicas, en Australia requería unos 600.000 jornales anuales.

BIBLIOGRAFÍA DE CIANOBACTERIAS

(1) ABRAMSON, S. N.; RADIC, Z.; MANKER, D.; FAULKNER, D. J.; TAYLOR, P.; (1989) *Onchidal: a naturally occurring irreversible inhibitor of acetylcholinesterase with a novel mechanism of action. Mol Pharmacol* 36:349-354.

(2) AZEVEDO, S. M. F. O.;(1996) Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia.

(3) AZVEDO, S. M. F. O.;(1994) *Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. Journal of Applied Phycology*, 6: 261-265.

(4) BEASLEY, V. R., COOK, W. O.; DAHLEM, A. M., HOOSER, S. B.; LOVELL, R. A.; VALENTINE, W. M.; (1989) *Intoxication in livestock and water fowl. Clinical Toxicology - Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 5:345-361.

(5) BISHOP, C. T.; ANET, E. F. L. J.; GORHAM, P. R.;(1959) *Isolation and identification of the past-death factor in Microcystis aeruginosa NRC-1. Can.J.Biochem.Physiol*. 37:453-471.

(6) BOTES, D. P., VILJOEN, C. C.; KRUGER, H.; WESSELS, P. L.; WILLIAMS, D. H.;(1982) *Configuration assignments of the amino acid residues and the presence of N-methyldehydroalanine in toxins from the blue-green algae Microcystis aeruginosa. Toxicon*, 20:1037-1042.

(7) BOURNE, Y., TAYLOR, P.; MARCHOT, P.;(1995) *Acetilcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure ofthe complex. Ce11* 83:503-12.

(8) CARMICHAEL, W. W.; (1992) Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. J.Appl.Bact., 72: 445-459.

(9) CARMICHAEL, W. W.;(1994) *The toxins of Cyanobacteria. Scientific American.* 270(1), pp. 78-86.

(10) CARMICHAEL, W. W., BIGGS, D. F.; GORHAM, P. R.; (1977) *Toxicology and pharmacological action of Anabaena flos-aquae toxin. Science* 187:542-544.

(11) CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P. R.;(1981) The mosaic nature of toxic blooms fo cyanobacteria. In The Water Environment – Algal Toxins and Health. New York, Plenum Press.

(12) CARMICHAEL, W. W.; SCHWARTZ, L. D.;(1984) Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. Farmers Bulletin 2275, Washington, DC: US Dept. of Agriculture.

(13) CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V. R.; BUNNER, D. L., ELOFF, J. N.; FALCONER, I. R.; GORHAM, P. R.; HARADA, K. I.; YU, M. J.; KRISHAMURTHY, T.; MOORE, R. E.; RINEHART, K. L.; RUNNEGAR, M. T. C.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M.;(1988) *Na-*

ming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon. 26: 971-973.

(14) CARMICHAEL, W. W.; MAHMOOD, N. A.; HYDE, E. G.; (1990) *Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology, eds. Hall, S. Strichartz*, G. pp. 87-106. Washington, DC: Americam Chemical Society.

(15) CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; JOCHIMSEN, E. M.; HOLMES, C. E. M.; SILVA, J. B.; (1996) Analysis for microcystins involved in outbreak of liver failure and death of humans at a hemodialysis center in Caruaru, Pernambuco, Brazil. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia.

(16) COOK, W. O.; IWAMOTO, G. A.; SCHAEFFER, D. J.; CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V. R.; (1990) *Pathophysiologic effects of anatoxin-a(s) in anaesthetized rats: the influence of atropine and artificial respiration. Pharmacol Toxicol 1990*; 67:151-155.

(17) COOK, W. O.; BEASLEY, V. R.; DAHLEM, A. M.; DELLINGER, J. A.; HARLIN, K. S.; CARMICHAEL, W. W.;(1988) *Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. Toxicon* 26:750-3.

(18) COOK, W. O.; BEASLEY, V. R.; LOVELL, R. A.; DAHLEM, A. M.; HOOSER, S. B.; MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W.; (1989) *Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium Anabaena flos-aquae: Studies of ducks, swine, mice and a steer. Environ Toxicol Chem* 8:915-922.

(19) COOK, W. O.; DELLINGER, J. A., SINGH, S. S.; DAHLEM, A. M.; CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V. R.; (1989) *Regional brain cholinesterase activity in rats injected intraperitoneally with anatoxin-a(s) or paraoxon. Toxicol Lett* 49:29-34.

(20) COOK, W. O.; IWAMOTO, G. A.; SCHAEFFER, D. J.; BEASLEY, V. R.; CARMICHAEL, W. W.;(1989) *Effect of anatoxin-a(s) from Anabaena flos-aquae NRC-525-17 on blood pressure, heart rate, respiratory rate, tidal volume, minute volume, and phrenic nerve activity in rats. J Environ Pathol Toxicol Oncol* 9: 393-400.

(21) COOK, W. O.; IWAMOTO, G. A.; SCHAEFFER, D. J.; CARMICHAEL, W. W.; BEASREY, V. R., (1990) *Pathophysiologic effects of anatoxin-a(s) in anaesthetized rats: the influence of atropine and artificial respiration. Pharmacol Toxicol* 67:51-5.

(22) COSTA, S. M.; AZEVEDO, S. M. F. O.; (1994) Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. Iheringia- Série Botânica, 45: 69-74

(23) DEVLIN, J. P.; EDWARDS, O. E.; GORHAM, P. R.; HUNTER, N. R.; PIKE, R. K.; STAVRICH, B.; (1977) *Anatoxin-a a toxic alkaloid from Anabaena flos-aquae NRC-44 th. Can.J.Chem*. 55:1367-1371.

(24) DEVLIN, J. P.; EDWARDS, O. E.; GORHAM, P. R.; HUNTER, N. R.; PIKE, R. K.; STAVRIC, B.; (1977) *Anatoxin-a, a toxic alkaloid from Anabaena flos-aquae NRC-44h. Can J Chem* 55:1367-71.

(25) DURÁN, R.; CERVENANSKY, C.; DAJAS, F.; TÍPTON, K. F.; (1994) *Fasciculin inhibition of acetylcholinesterase is prevented by chemical modification of the enzyme at a peripheral site. Biochim Biophys Acta 1994*; 1201:381-8.

(26) ERIKSON, J. E.; GRÖNBERG, L.; NIGÄRD, S.; SLOTTE, J. P.; MERIKUOTO, J. A. (1990). Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. Biochim. Biophys. Acta. 1025:60.

(27) FALCONER, I. R.;(1991) *Tumor Promotion and Liver Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria. Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 177-184.

(28) FALCONER, I. R.; (1994) Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In Toxic Cyanobacteria current status of research and management. Eds. STEFFENSEN, D.A. NICHOLSON, B.C. Proceedings fo an International Workshop. Adelaide. Australia.

(29) FALCONER, I. R.; BURCH, M. D.; STEFFENSEN, D. A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O. R.;(1994) *Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) Microcystis aeruginosa water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. Environ.Toxicols.Water Qual.J*. 9:131-139.

(30) FALCONER, I. R.; (1996) *Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. Phycologia*, 35(6): 6-11.

(31) FAWELL, J. K.; MITCHELL, R. E.; HILL, R. E.; EVERETT, D. J.; (1999) The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II anatoxin-a. Hum Exp Toxicol 1999;18: 168-173.

(32) FUKIKI, H.;(1992) *Is the inhibition of Protein Phosphatase 1 and 2A activies a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? Molecular Carcinogenesis*, 5: 91-94.

(33) GALLACHER, S.; FLYNN, K. J.; FRANCO, J. M.; BRUEGGEMANN, E. E.; HINES, H. B.;(1997) *Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with Alexandrium spp. (Dinophyta) in culture. Appl Environ Microbiol* 63:239-245.

(34) GORHAM, P. J.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K.; (1964) *Isolation and toxic strains of Anabaena flos-aquae (Lyngb.). Breb Verh Internat Verein Limnol* 15:796-804.

(35) HARADA, K. I.; OGAWA, K.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M. F.; ITEZONO, Y., NAKAYAMNA, N.; (1990) *Strutural determination of geometrical-isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. Chemical Research Toxicology*. 3: 473-481.

(36) HARADA, K. I.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M. F., TERAO, K.; (1994) Isolation of cylindrospermopsin from cyanobacterium Umezakaia natans and its screening method. Toxicon.32: 73.

(37) HAREL, M.; KJEYWEGT, G. J.; RAVELLI, R. B. G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; (1995) *Crystal struclu- re of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fin- gered toxin from snake venom with its target. Structure* 3:1355-66.

(38) HAWSER, S. P.; CODD, G. A.; CAPONE, D. G.; CARPENTER, E. J.; (1991) A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium Trichodesmium. Toxicon, 29:277-278.

(39) HENRIKSEN, P.; CARMICHAEL, W. W.; (1997) An J, Moestrup O. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria blue-green algae from Danish lakes and in the stomach con- tents of poisoned birds. Toxicon 35:901-13.

(40) HOOSER, S. B.; BEASLEY, V. R.; WAITE, L. L.; KUKLENSCHMIDT, M. S.; CARMICHAEL, W. W.; HASCHEK, W. M.;(1991) *Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green algae Microcystis aeruginosa. Veterinary Pathology*, 28: 259-266.

(41) HUGHES, E. O.; GORHAM, P. R.; ZEHNDER, A.; (1958) Toxicity of a unialgal culture of Microcystis aeruginosa. Can.J.Microbiol. 4(3): 225-236.

(42) HYDE, E. G.; CARMICHAEL, W. W.; (1991) Anatoxin-a(s), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase. J Biochem ToxicoI 6:195-201.

(43) JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D. Y COLS.; (1998) *Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. The New England Journal of Medicine*. 36:373-378.

(44) KOSKINEN, A. M.; RAPOPORT, H.; (1985) *Synthetic and conformational studies on anatoxin-a: a potent acetylcholine agonist. J Med Chem* 28:1301-1309.

(45) KUIPER-GOODMAN, T.; GUPTA, S.; CAOMBLEY, H.; THOMAS, B. H.; (1994) Microcystins in drinking water: Risk, assessment and derivation of a possible guidance value for drinking water. In Proc.of Toxic Cyanobacteria – A global perspective. Adelaide, Australia, Australian Center of Water Quality Research.

(46) LAMBERT, T. W.; BOLAND, M. P.; HOLMES, C. F. B.; HRUDEY, S. E.;(1994) *Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphate bioassay. Environ.Sci.Tecnol.* 28(4):753-755.

(47) LAWTON, L. A.; COODM, G. A.; (1991) *Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins and their Significance in UK and European Waters. J.Inst.Wat.Environ.Management.* 5:460-465.

(48) LILLEHEIL, G.; ANDERSEN, R. A.; SKULBERG, O. M.; ALEXANDER, J.; (1997) *Effects of a homoa-natoxin-a containing extract from Oscillatoria formosa (Cyanophyceae) cyanobacteria) on neuromuscular transmission. Toxicon* 35:1275-89.

(49) MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A., KLUMP, S.; COHEN, P.; CODD, G. A.; (1990) *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Letters*, 264:189-192.

(50) MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W.; PFAHLER, D.; (1988) *Anticholinesterase poisoning in dogs from a cyanobacteial (blue-green algae) bloom dominated by Anabaena flos-aquae. Ann J Vet Res* 49:500-503.

(51) MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W.; (1986) *The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium Anabaena flos-aquae NRC 525-17. Toxicon* 24:425-434.

(52) MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W.; (1987) *Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium Anabaena flos-aquae NRC 525-17. Toxicon* 25:1221-1227.

(53) MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W.; (1986) *Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium Aphanizomenon flos-aquae NH-5. Toxicon*, 24:175-186.

(54) MARSUNAGA, S.; MOORE, R. E.; MIEZCZURA, W. P.; CARMICHAEL, W. W.; (1989) *Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from Anabaena flos-aquae. Journal of American Chemical Society*. 111: 8021-8023.

(55) MATSUHIMA, R.; YOSHIGAWA, S.; WATANABE, M. F.; HARADA, K.; FURUSAWA, M.; CAEMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H., (1990) *In vitro and in vivo effects of protein phosphatases inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. Biochemical and Biophisical Research Communications*. 171(2): 867-874.

(56) MAHMOOD, N. A.; CARRNICHAEL, W. W.; (1986) *The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium Anabaena f1os-aquae NRC 525-17. Toxicon* 24:425-34.

(57) MARCHOT, P.; KHÉLIF, A.; JI, Y. H.; MANSUELLE, P.; BOUGIS, P. E.; (1993) *Binding of fasciculin to rat brain acetylcholinesterase: the complex still binds diisopropyl fluorophosphate. J Biol Chem* 268:12458-67.

(58) MARRS, T. C.; MAYNARD, R. L.; SIDELL, F. R.; (1996) Organophosphate nerve agents. En: Marrs TC, Maynard RL, Sidell FR, editors. Chemical warfare agents: toxicology and treatment. Chichester: John Wiley Sons.

(59) MATSUNAGA, S., MOORE, R. E.; NIEMCZURA, W. P.; CARMICHAEL, W. W.; (1989) *Anatoxina{s), a potent anticholinesterase from Anabaena f1os-aquae. J Am Chem Soc* 111:8021-3.

(60) MOLLOY, L., WONNACOL, S.; GALLAGHER, T.; BROUGH LIVELL, B. G.; (1995) *Anatoxin-a is a potent agonist of the nicotinic acetilcholine receptor of bovine adrenal chromaffin cells. Eur J Pharmacol* 289:447-53.

(61) MOLLOY, L.; WONNACOTT, S., GALLAGHER, T.; BROUGH, P. A.; LIVETT, B. G.; (1995) *Anatoxin-a is a potent agonist of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenal chromaffin cells. Eur J Pharmacol* 289:447-453.

(62) NISSHIWAKI, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S. Y COLS.; (1992) *Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. J. Cancer Res. Clin. Oncols.,* 118:420-424.

(63) NOYA, B.; PAREDES, M. D.; OZORES, L.; ALONSO, R.; (2000) *5-exo radical cyclization onto 3-alkoxyketimino-1,6-anhydromannopyranoses. Efficient preparation of synthetic intermediates for (-)-tetrodotoxin. J Org Chem* 65:5960-5968.

(64) OHTANI, I.; MOORE, R. E.; RUNNEGAR, M. T. C.; (1992) *Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxic from the blue-green algae Cylindrospermopsis raciborskii. J.Am.Chem.Soc.* 114:7941.

(65) OJANOERA, R. A.; VUORI, E.; HIMBERG, K., WARIS, M.; NIIVAARA, K.; (1991) *Facile detection of anatoxin-a in algal material by thin-layer chromatography with fast black K salt. Analyst.* 116:265-267.

(66) ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; HENRIKSEN, P.; YASUMOTO, T.; (1997) *Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobaclerium Anabaena lemmermannii, as the cause of bird kills in Danish lakes. Toxicon* 35:1645-8.

(67) ONODERA, H.; SATAKE, M.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T.; CARMICHAEL, W. W.; (1997) *New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium Lyngbya wollei. Nat Toxins* 5:146-51.

(68) PARK, H. D.; WATANABE, M. F.; HARDA, K.; NAGAI, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M. Y COLS.; (1993) Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. Nat Toxins 1:353-60.

(69) PITA, R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; (2003) Neurotoxinas con actividad anticolinesterásica y su posible uso como agentes de guerra. Med Clin (Barc) 121:511-7511.

(70) PUU, G.; KOCH, M.; (1990) *Comparison of kinetic parameters for acetylthiocholine, soman, ketamine and fasciculin towards acetylcholinesterase in liposomes and in solution. Biochem Pharmacol* 40:2209-14.

(71) RADIC, Z.; DURÁN, R.; VELLOM, D. C.; LI, Y.; CERVENANSKY, C.; TAYLOR, P.; (1994) *Site of fas- ciculin interaction with acetylcholinesterase. J Biol Chem 269: 11233-9*

(72) REPAVICH, W. M.; SONZOGNI, W. C.; STANDRIDGE, J. H.; WEDEPOHL, R. E.; MEINSER, L. F.; (1990) Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. Water Research, 24:225-231.

(73) RESSON, R.; SOONG, F. S.; FITZGERALD, J. Y COLS. (1994) Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council. Camberra, Australia: Australia Government Publishing Service.

(74) RINEHART, K. L.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B. M.; (1994) Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J.Appl.Phycols. 6: 159.

(75) RUNNEGAR, M. T. C.; FALCONER, I. R., SILVER, J.; (1981) Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green algae Microcystis aeruginosa. Archives of Pharmacology. 317: 268-272.

(76) RUNNEGAR, M. T. C.; FALCONER, I. R.; (1986) *Effects of toxin from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. Toxicon*, 24: 109-115.

(77) SIVONEN, K.; HIMBERG, K.; LIIKKAINEN, R. Y COLS.; (1989) *Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacetrial blooms and strains from Finland. Toxicity Assessment*, 4:339-352.

(78) SIVONEN, K.; NIEMELA, S. I.; NIEMI, R. M.; LEPISTO, L. Y COLS.; (1990) *Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. Hydrobiologia*, 190:267-275.

(79) SKULBERG, O. M., CARMICHAEL, W. W., ANDERSEN, R. A., MATSUNAGA, S.; MOORE, R. E.; SKULBERG, R.; (1992) *Investigations of a neurotoxic oscíllatorialean strain (Cyanophyceae) and its toxin: isolation and characterization of homoanatoxin-a. Environ Toxicol Chem* 11:321-9.

(80) SPIVAK, C. E.; WITKOP, B., ALBUQUERQUE, E. X.; (1980) *Anatoxin-a: a novel, potent agonist at the nicotinic receptor. Mol. Pharmacol* 18:384-394.

(81) TEIXERIA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. P.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E.; (1993) *Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil. Bulletin of PAHO*, 27(3): 244-253.

(82) TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M.;(1992) Eutrofication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. En: Algae and Environment; a general approach, eds.: Cordeiro-Marino, M. y cols.

(83) VALENTINE, W. M.; SCHAEFFER, D. J.; BEASLEY, V. R.;(1991) *Electromyographic assessment of the neuromuscular blockade produced in vivo by anatoxin-a in the rat. Toxicon* 29:347-357.

(84) WATANABE, M. F., WATANABE, M.; KATO, T. Y COLS.; (1991) *Composition of cyclic peptide toxins among strains of Microcystis aeruginosa (blue-green algae, cyanobacteria). Botanical Magazine, Tokyo*, 104:49-57.

(85) WONNACOL, S.; SWANSON, K. L.; ALBUQUERQUE, E. X.; HUBY, N. J. S.; THOMPSON, P., GALLAGHER, T.;(1992) *Homoanatoxin: a potent analogue of anatoxin-a. Biochem Pharmacol* 43:419-23.

(86) WONNACOTT, S.; SWANSON, K. L.; ALBUQUERQUE, E. X.; HUBY, N. J.; THOMPSON, P.; GALLAGHER, T.;(1992) *Homoanatoxin: a potent analogue of anatoxin-A. Biochem Pharmacol* 43:419-423.

(87) YOSHIZAWA, S.; MATSUHIMA, R.; WATANABE, M. F. Y COLS.;(1990) *Inhibition of protein phosphatase by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. J.Cancer Res.Cli.Oncols*. 116:609-614.

TOXINAS PRODUCIDAS POR DINOFLAGELADOS

Algunos dinoflagelados, diatominas, haptofitos. crisofitas, clorofitas y otras algas marinas sintetizan substancias tóxicas. También las especies marinas del género Chrysochromulina producen potentes toxinas y la Chrysochromulina parva de agua dulce, causó mortandad de peces en una laguna danesa.

Las saxitoxinas.o stx o psps (paralytic shellfish poisons)

Son potentes toxinas paralítogénas, derivadas de la Saxitoxina, identificadas por primera vez en el molusco Saxidomus giganteus y luego en los dinoflagelados constituyentes del plancton marino, especialmente el Protogonyaulax, los Alexandrium catenella, minutum, ostenfeldii y tamarense, el Gymnodinium catenatum y el Pyrodinium bahamense var. compressum, responsables de las mareas rojas, y en cepas de cianobactarias, de los géneros Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbia y Cylindrospermopsis. La llegada de nutrientes al mar, permite el desarrollo brusco de los dinoflagelados del fitoplancton con pigmento rojo y de ahí las mareas rojas, cuyas toxinas matan masivamente a los peces, clásicas en el golfo de México, que aumentan la oxigenación del agua y como consecuencia la eutroficación. Los dinoflagelados producen saxitoxinas.

Las saxitoxinas son cuerpos sólidos blancos, alcaloides de carbamatos que como las anatoxinas, son neurotóxicos. Las saxitoxinas son substancias tricíclicas cuyo esqueleto tiene una estructura semejante a la te-

trodotoxina con una base tetrahidropurínica provista de dos grupos guanidínicos uno de ellos con pKa de 11, 3 que a pH fisiológico tiene carga positiva, y el segundo tiene una pKa de 8,2 desprotonizada parcialmente. Por su naturaleza polar la saxitoxina se disuelve bien en el agua y en alcoholes de corta cadena, siendo insoluble en solventes orgánicos. Estable en soluciones neutras y ácidas,aún a temperaturas elevadas, pero en medio alcalino y los oxidantes, la oxidan e inactivan. ermoestables y resistentes a los ácidos y a los oxidantes

Las saxitoxinas son 1.000 veces más tóxicas que el sarín. La DL_{50} para la rata es de 0,263 mg e intravenosa la de 0,0024 por kg de peso. La DL_{50} para el ratón i.p. es de 10 µg kg, i.v. de 3,4 µg kg y oral 263 µg kg. La DL_{50} parenteral para el hombre es de unos 0,57 µg kg, y diez veces más si la vía es oral.Se considera dosis letal oral, para el hombre, la de 0,5 mg, o sea, unos 0,007 a 0,010 µg kg pero por inhalación 0,02 mg kg correspondiendo a una LCt_{50} de 5 mg min m^3.La toxicidad se debe al grupo cetona-dihidroxi en posición 12. La sustitución del hidrógeno de los átomos 7, 11 ó 13 por otros radicales produce moléculas tóxicas pero menos potentes que la saxitoxina. La sulfatación de la STX produce gonyautoxinas (GTX) y las toxinas-B: si se introducen dos grupos sulfato se obtienen las toxinas-C. La decarbamilación da las dcSTX y el grupo de toxinas Lyngbia-wollei (LWTX) que solo se encuebtra en este dinoflagelado [Onodera y cols. 1997].

Las saxitoxinas pueden entrar en el organismo por heridas. La inhalación de aire con 0,5 mg m^3 o la inyección de saxitoxina matan en menos de 15 minutos. Como la toxina desparace pronto del intoxicado, si resiste 12 horas se suele recuperar.

Su neurotoxicidad se debe a que al unirse a los canales de sodio mediados por el voltage en las neuronas obstruye mecánicamente a la «bomba de sodio» de la membrana neuronal impidiendo el flujo de cationes de sodio a través de la membrana y su despolarización y por ello, los potenciales de acción, suprimiendo diversas funciones orgánicas entre ellas el funcionamiento de la musculatura respiratoria que causa fallo respiratorio y la muerte. No causa diarrea. Las saxitoxinas, como las toxinas botulínicas es un agonista colinérgico que inhibe la liberación de acetilcolina en las sinapsas de los nervios periféricos.

Clínica

La intoxicacion natural se produce el comer mariscos, especialmente los mejillones crudos o cocinados. Entre 10 minutos a cuatro horas, treinta minutos de media de haber ingresado la saxitoxina y antes si fue inhalada, aparecen parestesias periorales, de la lengua y de las extremidades, con hormigueo y ardor, que se pueden acompañar de nauseas y vómitos, sensación de constricción de la garganta, sed intensa, lenguaje incoherente y en los casos graves ataxia, insensibilidad, debilidad, vértigo, disnea, sensación de disociación seguida de parálisis completa. La letalidad media en la intoxicación natural es de 5, pero si el paciente no muere se recupera al cabo de unas doce horas.

Uso militar de la saxitoxina

Dadas sus características de gran toxicidad, fácil de obtener a partir de cultivos de los dionoflagelados, el ser relativamente persistentes y el que para su identificación se necesitan técnicas complejas, es posible que se pueda emplear como agresivo para contaminar el agua o dispersándola en el aire y en pequeña escala en el terrorismo arrojándola por medio de dardos. La Convención de los agresivos químicos las incluyen en la Lista 1

Prevención

Se podrán, obtener vacunas copulando las toxinas con «carriers» proteicos. La descontaminacion con agua con hipoclorito o con otros alcalinos

Tratamiento

Ante la presencia de paralisis respiratoria debe intubarse y hacer ventilación asístida, impensable en el teatro de operaciones. No hay antídoto y la atropina es contraproducente.

El dinoflagelado Peridinium polonicum, produce las polinicumtoxinas A, B y C (Oshima y cols. 1989), cuya dosis letal para el ratón es 1,5-2 mg kg, mucho menor que la de microcistina-LR, que han causado la muerte de peces. El Ames es negativo

BIBLIOGRAFÍA DE SAXITOXINAS

(1) ALBUQUERQUE, E. X.; DALY, J. W.; WITKOP, B.;(1977) *Batrachotoxin: chemistry and pharmacology, Science* 172:995-1002.

(2) ARMSTRONG, R. W.; BEAU, J. M.; CHEON, S. H.; CHRIST, W. J.; FUJIOKA, H. Y COLS.; (1989) *Total Synthesis of Palytoxin Carboxylic Acid and Palytoxin Amide. J Amer Chem Soc* 111:7530-7533.

(3) HABERMANN, E.; (1989) *Palytoxin acts through Na+, K+-ATPase. Toxicon* 27:1171-1187.

(4) MYERS, C. W.; DALY, J. W., MALKIN, B. A.; (1978) *Dangerously toxic new frog (Phyllobate) used by Emberá Indians of Western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. Bull Am Museum Nat History 161: Article 2.*

(5) LAUFFER, L., STENGELIN, S., BERESS, L.; HUCHO, F.; (1985) *Palytoxin-induced permeability changes in excitable membranes. Biochim Biophys* Acta 818: 55-60.

(6) MANN, J.; (1989) *Chemical synthesis. Scaling molecular Everests. Nature* 342:227-228.

(7) MÄRKI, F.; WITKOP, B.; (1963) *The venom of the Colombian arrow poison frog Phyllobates bicolor. Experientia* 19:329-338.

(8) MOORE, R. E.; SCHEUER, P. J.;(1971) *Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. Science* 172:495-498.

(9) MOORE, R. E.;(1985) *Structure of palytoxin. Fortschr Chem Org Naturst* 48:81-202.

(10) OZAKI, H.; TOMONO, J.; NAGASE, H.; URAKAWA, N.;(1983) *The mechanism of contractile action of palytoxin on vascular smooth muscle of guinea-pig aorta. Japan. J. Pharmacols.* 33:1155-1162.

(11) PATOCKA, J.; SCHWANHAEUSE, W. K.; MARINI, M. V. P.;(1999) *Dart poison frogs and their toxins. ASA Newsletter* 74:16-18.

(12) SHIMIZU, Y.;(1983) *Complete structure of palytoxin elucidated. Nature* 302:212.

(13) WARNICK, J. E.; ALBUQUERQUE, E. X.; ONUR, R.; JANSSON, S. E.; DALY, J.; TOKUYAMA, T.; WITKOP, B.;(1975) *The Pharmacology of Batrachotoxin. VIII. Structure-Activity Relationships and effect of pH. J Pharm Exp Ther* 193:232-245.

Ciguatoxinas

La ciguatera es una intoxicación debida al consumo de pescados tóxicos. Es conocida en las Nuevas Hébridas desde 1606. Rl propio James Cook describiço la enfermedad que padeció su tripulación en Nueva Caledonia en 1774 señalando que se debió a las vísceras de algunos pescados ya dadas a cerdos les produjo la muerte. La «cigua» es un proceso llamado así desde antiguo debido a la ingesta del caracol marino Turbo pica nombre que luego se aplicó a las intoxicaciones debidas a comer carne o vísceras de peces capturados en aguas del Caribe y del Pacífico.

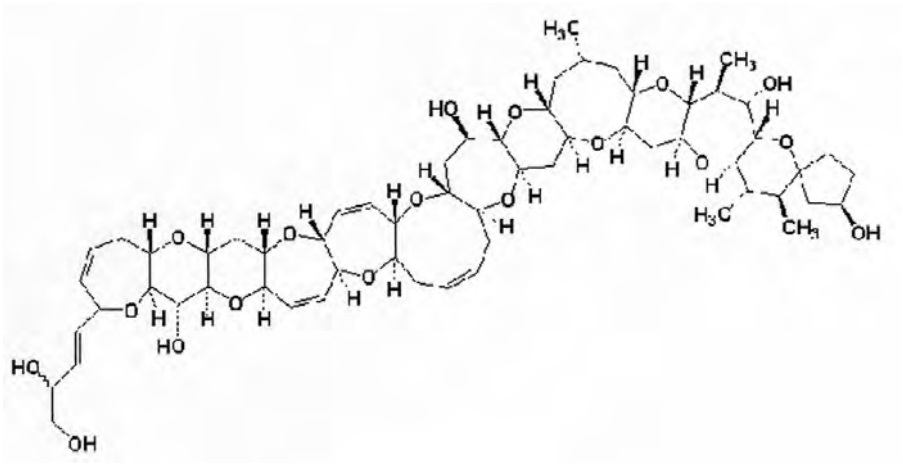


FIGURA 1. *Estructura de la ciguatoxina.*

Se conocen unas 25 ciguatoxinas, que son poliésteres, al igual que el ácido okadaico, la brevetoxina y otras toxinas que dan el mismo cuadro clñínico.

La ciguatoxinas son neurotoxinas [Pearn 2001], cuyo pm es 1.000; su $DL_{50,}$ como media de diversos autores y vias de entrada es 0,40 µg kg 0,40. Son sintetizadas por el dinoflagelado Gambierdiscus toxicus

Las ciguatoxinas estimulan la entrada de iones de sodio a través de las membranas del nervio y de las fibras nerviosas. Según el predominio de los síntomas presentados se clasifican en: neurologicas, cardiovasculares, gastrointestinales y con síntomas generales.

Los síntomas suelen comenzar entre los 10 minutos a las 12 horas, pero pueden aparecer pasadas 36 hoeas. El cuadro suele comenzar con nauseas, vómitos y diarrea, debilidad general, disminución de la sensibilidad táctil y al dolor o sensación de picor o de quemadura ante un ligero estímulo táctil en manos o piel o en torno a la boca; algias musculares con un curioso cambio de la identificación de la temperatura sintiendo frio ante un estímulo caliente y a la inversa: menos frecuentemente. Aparecen escalofrios,picores, cefaleas, vértigos, sudoración, sabor metálico em la boca. Los síntomas gastrointestinales suelen presentarse al cabo de 1 a 2 días. La debilidad a los 1 a 7 días. Los síntomas neurológicos como picores y la reversión de la sensibilidad al calor suelen persisitir una semana. Puede haber taqui o bradicardia y arritmia, hipotensión midriasis que dura dos o tres días (Crump y cols. 1999). Los síntomas pueden persistir semanas, meses o años. [Lehane y cols. 2000] y crónicamente las algias de articulaciones y de los músculos y la laxitud, no siendo raro que algunos síntomas reaparezcan hasta 40 días despues de haber desaparecido (Mattei y cols. 1994,Eastaugh 1996). Se ha señalado que la ingesta de grasa, alcohol o alimentos procedentes del mar favorece las recurrencias.

La infusión de manitol suele mejorar el cuadro salvo la diarrea. Se ha empleado la gabapentina [Perez y cols. 2001]. Los síntomas crónicos mejoran con el antiarrítmico cloruro de tocainida y con el antidepresivo amitriptilina más eficaz si hay depresión.

BIBLIOGRAFÍA DE CIGUATERA

(1) CRUMP, J. A.; MCLAY, C. L.; CHAMBERS, S. T.; (1999) Ciguatera fish poisoning. N Z Med J. 112:282-283.

(2) EASTAUGH, J. A.; (1996) Delayed use of intravenous mannitol in ciguatera (fish poisoning). Ann Emerg Med 28:105-106; 1996

(3) LEHANE, L.; LEWIS, R. J.; (2000) Ciguatera: recent advances but the risk remains. Int J Food Microbiol 61:91-125.

(4) MATTEI, C.; MOLGO, J.; MARQUAIS, M.; VERNOUX, J.; BENOIT. E.; (1999) *Hyperosmolar D-mannitol reverses the increased membrane excitability and the nodal swelling caused by Caribbean ciguatoxin-1 in single frog myelinated axons. Brain Res* 847:50-58.

(5) PEARN, J.; (2001) *Neurology of ciguatera. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:4-8.

(6) PEREZ, C. M.; VASQUEZ, P. A.; PRET, C. F.;(2001) *Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. N Engl J Med* 344:692-693.

Maitotoxina

Otra toxina es la maitotoxina cuyo pm es 3.400. La DL_{50} media de diversos autores y vias de entrada es 0,10 µg kg.

Las toxinas diarreógenas o «DSP» son producidas por dinoflagelados de los géneros Dinophysis (D. acuminata y D. acuta) y Prorocentrum, que ingeridos por moluscos bivalvos, fundamentalmente mejillones aunque también pueden serlo las ostras, vieiras, berberechos etc que se concentran en su hepatopáncreas y que al ser ingeridos por el hombre causan diarrea.No parecen toxinas de gran interés para su uso militar.

Las Pectenotoxinas (PTX), que son poliéteres lactónicos liposolubles de las que se conocen al menos seis. La PTX 1, se aisló de la glándula digestiva de la ostra Patinopecten yessoensis del Japón; es hepatotóxica e induce rápida necrosis de los hepatocitos,semejante a la que causa la phaloidina. Su pm es 299 d; es producida dinoflagelados marinos, especialmente la Gonyaulax catenella y de Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya.Los mariscos que se alimentan de plancton ingieren a los dinoflagelados y en su hepatopáncreas se concentra la saxitoxina. Su DL_{50} por ip al ratón es de 10-30 µg kg La saxitoxina se puede obtener de los moluscos contaminados o bien de cultivos axénicos o sintetizados artificialmente.

Brevetoxinas (BVX)

Son poliéteres lipofílicos de unos 900 d [Baden 1989]. Las de «tipo I» 8 tienen 11 anillos, dos son heptaméricos y uno es un anillo de 8 miembros y las de tipo II que tienen 10 anillos, de diverso tamaño con 5 a 10 enlaces (Nakanishi 1985). Los ph menores de 2 o mayores de 10 degradan a las brevetoxinas, estables entre un pH de 2 y 10. Las brevetoxinas son producidas por las algas «Ptychodiscus brevis» (antes «Gymnodinium breve»), al proliferar, cuando se producen circunstancias adecuadas, La toxina que por el oleaje pasa al aire irrita las vias respiratorias del hombre expuesto. A traves de la toxina concentrada en moluscos puede causar el síndrome de intoxicación neurotóxica (NSP) equiparable al de la

ciguatera [Lombety cols. 1987] con picazón facial, en gárganta y dedos de la mano, vértigo, fiebre escalofríos, algias musculares, calambres abdominales, nauseas, vómitos, diarrea, cefalea, bradicardia y midriasis. No se han señalado fallecimientos aunque experimentalmente por diversas vías incluida la oral, dosis altas producen la muerte de varios mamíferos. Las brevetoxinas cambian el voltage, despolarizan, abriendo los canales iónicos del nervio y de fibras musculares permitiendo la entrada selectiva descontrolada del sodio a la célula. Estos canales están abiertos en respuesta al cambio de potencial eléctrico entre ambas caras de la membrana celular. [Atchison y cols. 1986].

Podrían usarse las brevetoxinas desecadas o disueltas en acetona, acetonitrilo, alcohol, acetato de etilo o en DMSO para adicionarlas al agua en la que pueden persistir 4 a 6 meses.

BIBLIOGRAFIA DE LAS BREVETOXINAS

(1) ATCHISON, W. D.; LUKE, V. S.; NARAHASHI, T.; VOGEL, S. M.; (1986) *Nerve membrane sodium channels as the target site of brevetoxins at neuromuscular junctions. Br J Pharmacol* 189:731-738.

(2) BADEN, D. G.; (1989) *Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. FASEB J.* 3:1807-1817.

(3) BADEN, D. G.; (1983) *Marine food-borne dinoflagellate toxins. Intemat Rev Cytology 82*: 99-150.

(4) BADEN, D. G.; (1989) *Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. FASEB J.* 3:1807-1817.

(5) LOMBET, A.; BIDARD, J. N.; LAZDUNSKI, M.; (1987) *Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na+ channel. FEBS Lett* 219:355-359.

(6) NAKANISHI, K.; (1985) *The chemistry of brevetoxins: a review. Toxicon* 23:473-479; 1985

YESSOTOXINAS

Son poliéteres semejantes a la brevetoxina, encontradas en las ostras; inyectada a animales producen edema de las células del miocardio, sin que afecten al hígado, páncreas, pulmones, riñones y suprarrenales.

Dinofisitoxinas (DTX)

Son derivados del ácido okadaico. La DTX1 es el ácido 35-R-metil-okadadaico (que había sido aislado por primera vez de la esponja Halichondria okadai en 1981), que luego se encontró en los dinoflagelados Prorocentrum lima y Dinophysis spp. El DTX2 es el ácido 31, demetil-35-metilokadaico encontrado en mejillones de Irlanda, Portugal y España. El DTX3 es el ácido 7-O-acil-35-(R)-metilokadaico, que causó una intoxicación por ostras en Japón. Los agonistas del receptor D1 o el ácido okadaico que inhibe a la PP1 impiden la defosforilización y la asociada perdida de la respuesta de los receptores AMPA al glutamato.

La toxina diftérica no provoca citolisis ni fragmentación del ADN incluso a alta concentración, pese a que las inhibición por la toxina diftérica,de la síntesis proteica en las células Vero que la ricina. La brefeldina y el ácido okaico aumentan la acción apoptoica de la tóxina diftérica (Kusano y cols. 2001)

La brefeldina A (BFA) y el ácido okadaico (OA) aumentan significativamente la citolis y la fragmentación del ADN causadas por la toxina diftérica sin afectar la inhibición de la síntesis de proteinas La mutante CRM 197, que no cataliza la ribosilación del factor de elongación 2 (EF 2), no induce la apoptosis de las Vero aún en presencia de BFA y de OA. El cloruro amónico abole casi por completo la capacidad de la toxina diftérica de inducir apoptosis en presencia of BFA y de OA y la síntesis proteica. La translocación de la toxina diftérica al citosol y la subsiguiente inactivación enzimática de la EF 2 pudiera ser necesaria para la apoptosis. Es decir que la inhibicion de la síntesis proteica por las toxinas no es inductora de la apoptosis, ya que los mecanismos de inducción de la apoptosis puede ser diferente del de la ricina y de la toxina diftérica. Como se produce un cambio morfólogico en el complejo Golgi de las células Vero tratadas con BFA y OA, la modulación del complejo del Golgi por estas substancias puede ser parcialmente responsable del aumento de la induccion de la apoptosis por la toxina diftérica.

Ácido okadaico

El **ácido okadaico (OA)** y las dinofisiotoxinas ingresados por vía oral, se unen a receptores del tracto digestivo, penentran en las células en

donde inhiben a las fosfatasas PP1 y PP2A, lo que hace que estén aumentadas las proteínas fosforiladas entre ellas las que controlan la secreción de sodio por las células intestinales ocasíonando diarrea

Además de la diarrea que desaparece al cabo de unos tres días, las dinofisitoxinas promueven el desarrollo de tumores gastrointestinales y son mutagénicos e inhiben la producción de interleukina-1

TABLA 1

Tabla de Sivonen y Jones (1998)

País	*Número de sitios muestreados*	*Porcentaje de muestras con toxicidad*	*Referencias*
Inglaterra	78	70	Informe NRA, 1990
Escandinavia	51	59	Codd y cols. 1989
Finlandia	188	44	Sivonen y cols. 1990
Mar Báltico	25	72	Sivonen y otros, 1989
Hungría 1988	35	82	Törökné-Kozma y Gábor.
Wisconsin, EEUU	102	27	Rapavich y cols. 1990
Holanda	10	90	Leeuwangh y cols. 1983
Holanda	29	79	RIZA, 1994
Alemania (RDA)	6	67	Henning y Kohl. 1981
Alemania 1995-96	80	90	Fastner y otros, 1998
Dinamarca	96	72	Henriksen, 1997

Botulismo

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

y MANUEL DOMÍNGUEZ DE LA CALLE
Pharmaceutical Clinical Research Associated

Historia

El Botulismo, también llamado alantiasis, es la enfermedad grave, causada por toxinas codificadas por genes que se expresan casi exclusivamente, por el Clostridium botulinum, aunque ha habido raros casos de botulismo causados por la neurotoxina botulínica segregada por otros clostridia a como la cepa de Clostridium baratii, aislada por Harvey y cols. (2002) de los alimentos consumidos por un enfermo de botulismo, que segregaba toxina F y el C. butyrum que puede producir toxinas similares a las F y E (Hatheway 1992).

Dada su sintomatología y gravedad, es lógico que fuera conocido desde la antigüedad. Los romanos ya sabían que algunos alimentos causaban una grave intoxicación; el emperador bizantino Leon VI prohibió el consumo de morcillas, probablmente como medida preventiva. En la Edad Media, se tomaron medidas de higiene alimentaria para prevenir la enfermedad. Ya en 1735 se atribuyó a morcillas un brote en Würtenberg. A partir de 1793 se publicaron varias descripciones de este proceso destacando la del médico y algo poeta alemán Justinus Kerner (1786-1862), en 1820 basado en un brote que afectó a trece personas, de las que murieron seis, en el reino de Würtenburg, por haber comido carne con salsa o embutidos, por lo que se llamó a esta enfermedad durante mucho tiempo «enfermedad de Kerner». La palabra latina “botulus” que signifi-

ca salchicha, pasó al léxico médico a finales del siglo XVII. Müller publicó dos trabajos en 1869 y 1870 sobre el botulismo. Se fue extendiendo la idea de que la intoxicación era debida a un microorganismo, aunque el propio Virchow, no lo encontró en los alimentos causales. Van den Corput atribuyó su origen al hongo, que llamó Sarcina botulina.

La coexistencia de la ausencia de putrefacción de los alimentos, que a veces eran recientes, con el hecho de que había mas tóxico cuanto mas grueso fuera el alimento estando más en su parte central desechó que pudiera ser debido a ptomaínas e incluso de un presunto ácido botulínico.

En diciembre de 1895, en la villa de Ellezelles, Hainault, Bélgica, una sociedad musical tocando una elegía en un funeral. Después de la ceremonia fúnebre, la orquesta fue invitada a tomar una colación fría, donde el plato fuerte era un típico jamón salado de un cerdo sacrificado cuatro meses antes, y que fue comido fresco sin consecuencias en agosto salando el resto. Enfermaron 34 personas, incluyendo a todos los músicos, cuyos síntomas que se presentaron entre las 24 y 36 horas siguientes a la ingestión incluían estrabismo, diplopia, ptosis palpebral, afonía y disfagia. Tres intoxicados fallecieron, lo que arrojó una letalidad de 9,2. Del restos del jamón, así como del bazo de una de los fallecidos y en los restos del jamón Emile Pierre van Ermengem, de Ghent, aisló esporas de un bacilo anaerobio, que denominó Bacillus botulinus. El filtrado del cultivo, libre de bacilos y de esporas, produjo en animales de laboratorio parálisis, demostrando la existencia de una toxina.

Wilhelm Kempner, de Berlín, en 1897 obtuvo antitoxina inyectando a animales la cepa de Ermengem. Römer (1900) encontró el bacilo en un pequeño brote en Hesse, y en un brote debido a conserva.

Epidemiología descriptiva

El botulismo es poco frecuente causando casos esporádicos o pequeños brotes a menudo familiares, por comidas en común sin producir grandes brotes. En el botulismo es más importante el número de brotes, cuya declaración es obligatoria, que el de casos; al no ser claro el concepto de brote no se suelen notificar los brotes que afectan a una o a pocas personas. En Cataluña desde 1992 se deben declarar todos los casos.

La enfermedad está muy ligada a la conservación de alimentos, por lo que el desarrollo de las técnicas conserveras en latas o en envases de plásticos permite que el C. botulinum produzca toxina, (evitable haciendo orificios en el envase) favoreció la presentación de botulismo, pero al perfeccionarse las técnicas de conservación, redujo la incidencia de la enfermedad de modo que practicamente hoy solo aparece por el consumo de conservas caseras. En 1918 se produjeron en Europa 83 brotes con 297 casos con una letalidad de 33. Entre 1900 a 1950 se declararon en el mundo 5635 casos con 1714 defunciones.

Casos de botulismo en España:

Año	*Provincia*	*Casos*
1964	Guipuzcoa	6
1969	Guipuzcua	3
1970	Sevilla	2
1971	Navarra	9
1972	Soria	2
1973	Alava	4
1974	Valladolid	6
1975	Pontevedra	4
1976	Barcelona	1
1977	Ciudad Real	2
1979		2 (España)
1981		1
1982		4
1983		6
1984		5
1986		2
1987		4 (29 casos)

El número de casos por brote ha seguido esta evolución:

Periodo	*Media de casos por brote*
1890-1949	2,5
1950-1973	2,4
1974	1,5
1975	1,4

En enero de 1984 se produjo en Lérida un interesante brote, en una familia de seis miembros, cuatro de los cuales cenaron el 19 de enero una conserva casera de «mongetes». La noche del 20, el cabeza de familia de 45 años comenzó a encontrase mal, ingresando en un hospital en el que murió el día 23 con el diagnóstico de hemorragia subaracnoidea. El día 25 ingresó en Urgencia su esposa de 43 años; se le dio el alta pero murió el día 26; una hija de 18 años ingresó el 26 ya con sospecha de botulismo a la que se trató con antitoxinas A y B la cual evolucionó bien y quedando solo con ligeras alteraciones neurológicas;a la cuarta hija de 16 años, aunque no tenía síntomas se le administró preventivamente antitoxina. Otro brote curioso afectó en julio de 1987 en Aragón que afecto a cinco personas y en marzo de 1992 se produjo un brote familiar en la provincia de Tarragonaa con dos casos (tasa de ataque 100%) por conserva casera de «pebrots»

En los últimos años los datos referentes a USA son:

Año	*Brotes*	*Casos*	*Porcentaje de brotes respecto al total de intóxicaciones alimenticas*
1967	3	6	1,3
1968	9	10	2,6
1969	10	17	2,7
1970	0	0	0
1971	10	23	2,8
1972	4	24	2,9
1973	10	31	7,9
1974	20	30	
1975	15	19	

En 1999 se produjeron en Polonia 97 casos, lo que supone una inicidencia de $0,25/10^5$, sin ninguna muerte; 61 casos en el medio rural (incidencia de $0,41/10^5$), y 36 en el medio urbano (incidencia de $0,15/10^5$), 0,32, en varones y 0,18 en mujeres. Entre 24 brotes sólo había una persona intóxicada, en 6 dos personas, con tres afectados y en dos brotes con 4 casos. En el año 2000 se notificaron en Polonia 46 brotes con 72 pacientes de botulismo, es decir una incidencia de 0,19 por 100.000 siendo en el medio rural de 0.38 y en el urbano 0.07.

Microbiología

El C. botulinum fue descubierto por van Ermengem de Gante en un brote ocurrido en 1895 en la localidad de Ellezeles que afectó a 34 músicos de la banda local. Los clostridia como los del tétanos, los de las gangrenas gaseosas o el del botulismo son bacterias Gram positivas, anaerobias estrictas, grandes, de unos 3 a 6 (2 a 8) micras de largo por 0,9 a 1,2 (0,5 a 1,8) de ancho, a veces ligeramente encorvados,con extremos cortados a pico o redondeados, con 4 a 8 flagelos peritrícos, que le confieren una pequeña motilidad; carecen de cápsula. La bacteria, y las esporas, contienen nicotinamida adenina dinucleótido reducido (Simmons y col.1962). La especie Clostridium botulinum la constituyen microorganismos autóctonos, saprofitos de los suelos y de las aguas. Crece facilmente, requiriendo solo azúcares y aminoácidos,de los que la ornitina y la glutamina mejoran su desarrollo, siempre que el pH sea mayor de 4,6 y la concentración salina baja. Se desarrolla a baja temperaturas siendo la óptima de 20 a 23ºC; el pH de 8,4 a 9 pero puede desarrollaarse en medios ácidos si tienen una concentración débil de ClNa. Enturbia uniformemente el caldo glucosado; en agar profundo forma finas colonias lenticulares rodeadas de una areola de liquefacción que desprende olor butírico. Forma gas en todos los medios. La bacteria resiste poco al calor de modo que a 60ºC bastan 10 minutos para que se destruya.

Los C. botulinum se clasifican en cuatro grupos, atendiendo a la morfología del bacilo y a la de la espora, a la estructura de su ADN y a la de su ARN ribosómico, y sobre su acción proteo y sacarolítica sobre los substratos, y a susceptibilidad a los fagos.

Los clostridia del grupo I son proteolíticos y por ello ovolíticos, y sacarolíticos.Forman a partir de la glucosa, ácido butírico que da a la conserva olor a manteca rancia; comprende los serotipos productores de las toxinas A, parte de los B y F. Sus esporas son mas termoresistentes que las del grupo II. Las toxinas se segregan con toda o con casi toda su capacidad tóxica. El serotipo B del grupo I, es similar al serotipo A pero es muy diferente al serotipo B del grupo II. Para desarrollarse requieren temperaturas superiores a los 10ºC. Pueden causar botulismo humano.

Los bacilos del grupo II no son proteolíticos. Se incluyen en ellos los serotipos E, la mayoría de los F y algunas cepas del B. Los bacilos del grupo II pueden crecer a 4ºC. Sus espora son menos resistentes al calor que los del grupo I. Germinan y crecen a 4ºC. Pueden causar, al igual que las bacterias del grupo I, casos en el hombre. Se incluye el resto del B, el E. Se neutraliza parcialmente con la anti-F.

Los C. botulinum del grupo III son débilmente proteolíticos o no-proteolíticos y algo sacarolíticos; comprende las cepas C1, C2, y D. La toxina segregada necesita ser activadas por proteasas, para alcanzar su máxima actividad. Las cepas C son causa importante de botulismo en pollos y patos.

Grupo IV contiene cepas proteolíticas pero no sacaroliticas; a este grupo pertenecen los serotipos G.

Serotipos

Se conocen 7 serotipos diferentes de Clostridium botulinum cada uno de los cuales produce, al menos una toxina estructural y antigénicamente específica, aunque la pueden producir en escasa cantidad otros serotipos: por ej la F es producida por la variante Af del serotipo A. Asi como el C. tetani produce una sola toxina el botulinum puede producir siete designadas con las letras mayúsculas A, B, C, (la C tiene las variantes C_{α} y C_{β}) D, E, F y G, muy semejantes estructuralmente lo que sugiere a mi juicio, el resultado de una serie de adaptaciones.

Los serotipos A, E y B por este orden son los más toxigénicós. Los casos de botulismo humano se producen sobre todo por las toxina B y A y luego por la E y por la F. La cepas que se aislan en un mismo brote

tanto en los alimentos como en el intestino o en la sangre son del mismo serotipo.

El serotipo A fue identificado por Leucks en 1910. Es el serotipo,más frecuente siendo ubicuo. Es proteolítico; reduce la safranina, no crece a 4ºC. Su toxina es la mas potente de las producidas por el Cl. botulinum y es activable por las radiaciones. Las esporas son bastantes resistentes. Causa en el pollo el Iimbernek y es el serotipo que afecta con más frecuencia al hombre en América y en Europa. Los alimentos mas incriminados son las conservas de vegetales, de frutas, carne y pescados.Una variante, la Af, hallada en suelos de Argentina, forma especialmente toxina A mas 1 a 10 % de la F.

El Serotipo B fue encontrado por Leucks en 1910, al aislar cepas cuya toxina no se neutralizaba con la antitoxina obtenida de las cepas conocidas que luego se llamaron A. Se supone que era B, la cepa que aisló Ermengen. La mayoria de sus cepas son proteolíticas y hemolíticas. Se aisla del intestino del hombre, caballos y vaca. La toxina es menos potente que la A teniendo la DL_{50} para el ratón 5 a 9.10^{-9} mg de N. Ubicuo siendo el serotipo mas frecuente en Europa; en Paris entre 1939 al 45 causó mas de 1.000 casos; en Noruega y en la parte oriental de USA. Este serotipo es el que causa los casos españoles al menos desde 1969. Los alimentos que causan mas casos son las conservas y preparados de carne, especialmente porcina, jamón salado o ahumado, pescados, queso, legumbres, pastas,guisantes Causa intóxicaciones en bóvidos, équidos y pavos.

Serotipo Cα o C1. Su conocimiento se debe a Bengston (1922). No es proteolítico y su patogenicidad es débil. La bacteria se desarrolla en la vegetación alterada de estanques alcalinos. Causa botulismo en aves silvestres acuáticas («enfermedad occidental del pato»). Se ha encontrado su toxina en las larvas de las moscas, Lucilia caesar. Poco frecuente en el hombre. Ha causado casos de botulismo en el Occidente de Estados Unidos, en Canadá, Suramérica, Suráfrica y Australia. Tambien se ha encontrado en el botulismo por heridas. Los animales enferman al comer pienso con larvas de la Lucila caesar o forraje con carroña.El hombre al comer hígado de cerdo o aves Serotipo C(u C2. Señalado por Seddon en 1922, recibiendo el nombre de Cl. parabotulinum. No es proteolítico y es poco toxigénico. Causa la «enfermedad Midland» de los bóvidos, (lamziekte) y la «intóxicación por forraje» de los équidos. Ha causado algunos casos hu-

manos por comer hígado de cerdo en Australia, Suráfrica, Europa, y Norteamérica. El hombre enferma al comer hígado de cerdo o de aves.

Serotipo D. Theller y Roblnson (1927) demostraron que la «lanziekte» de la vaca era debida a un nuevo serotipo el D. No es proteolítico. Meyer y Gunnison lo identificaron en 1929 en heridas humanas. Causa pocos casos humanos, la mayoría de ellos debida a conservas vegetales. El primer brote debido a conservas vegetales ocurrió por porotitos en Darmstadt en 1904 estudiado por Landmann y Gaffky. Tambien se debió a conserva de porotitos el primer brote de botulismo de Chile preparados por una comunidad de religiosas; al principio las monjas reían ante su diplopia pero enseguida tuvieron parálisis y murieron algunas.

El primer foco de botulismo alimenticio se encontró en una comunidad del Tchad que habia comido jamón salado en el que encontraron la bacteria Demarchi y cols.(1958). Se ha encontrado en Australia y en Suráfrica. La bacteria es abudante en los fangos del golfo de Tailandia; se encuentra en el intestino de rumiantes (bóvidos y équidos) y en los vegetales. La toxicidad de la toxina D, es 5.000 veces superior a la del serotipo A. Las cepas D producen toxina en cantidades muy variables y a menudo pierden la toxicogénesis. Prévot y col. (1959,1962) encontraron en el jamón que provoco los casos del Tchad, la coexistencia con el B. licheniformis que multiplicó por 1.000-2.600 su toxicidad, debido a proteasas del bacilo, existentes en los cultivos, las cuales liberarían a la toxina botulínica del clostridium. La tripsina no tiene ese efecto. Ha producido brotes en varias especies animales entre ellas en pollos y visones de granjas y en patos salvajes, sin afectar al hombre.

El serotipo E fue aislado por Gunnison, Cumminas y Meyer en 1934 a partir de un cultivo de la cepa obtenida por Bier de un esturión de Ucrania, considerándolo una variante, pero Gunnison y cols. (1936) vieron que su toxina no se neutralizaba con ninguno de los anticuerpos conocidos. No es proteolítico: es termosensible y es muy toxigénico. La toxina se sintetiza a temperaturas bajas. La cepa P34 del Pasteur en caldo VF produce toxina a 26ºC pero no lo hace a partir de 33ºC. La toxina se obtiene facilmente en medios con triptona, glucosa a pH 7,6 o en caldo de carne con peptona. Rey Calero (1963) lo cultivó en embrión de pollo de 1 a 2 semanas en el que se desarrolla abundantemente incluso aumentando su virulencia. La toxina es marcadamente termolábil.

Los peces, los moluscos y los mamíferos marinos se contaminan con el C. botulinum de fangos y arenas, a los que llega la espora con las aguas fluviales contaminadas. Se ha hallado el C. botulinum E en músculos de arenque, incluso ahumado, de caviar, de salmón, de perca fluviatilis es decir en peces que parte de su ciclo lo realizan en agua dulce. Cada vez se producen mas casos por conservas de peces, y mamíferos marinos, especialmente por las no tratadas por el calor. En Francia, Prevot describió casos por percas de agua dulce y Boyer y cols. (2001) publicaron dos casos en ese país. En Canadá se han producido casos aislados por el serotipo E por comer carne cruda de foca. (Weekly 48;427;1973). Entre 1952 y 1999 se comunicaron 16 casos causados por pescados empaquetados en vacio procedentes de zonas contaminadas. También ha causado algunos pocos casos el jamón, las cebollas etc. La mayoría de los casos se han señalado en el norte del Japón, Columbia británica, Labrador, Alaska, región de los Grandes Lagos, Canadá, Alemania, Suecia, Dinamarca, Rusia y Paises balcánicos. En 1956 se habían declarado 17 brotes que causaron 21 defuncion

La toxina es la más activa de las botulínicas, debido a que la tripsina ataca a la protoxina producida por el bacilo, aumentando 12 a 47 veces su actividad. Curiosamente el pollo es insensible.

El serotipo F, fue encontrado por Moeller y Scheibel en 1960 en el hombre. Causa el 0,1 % de los casos humanos en Dinamarca, USA y Argentina. Parece ser una mutante del E. Se debe a conservas de carne,pescados como el salmón o a en patés, pasta de hígado etc.

El tipo G ha sido aislado en 1970 en un maizal de Argentina.

Esporas

Los clostrodia forman esporas ovales, cuyo diámetro es mayor que el de la bacteria que están rodeadas unos tubos de unos 20 nm de ancho, y de un calibre de unos 8 nm, cerrados por el extremo distal; las esporas son apatógenas, altamente resistentes. Son termoresistentes; el calor seco a 180ºC necesita 5 a 15 minutos para destruir las esporas. La ebullición a 100ºC destruye las esporas al cabo de 5,5 a 6 horas; con 103ºC se necesitan dos horas: con 115ºC 9 minutos y con 120ºC bastan 4 minutos.La termorresistencia varia según las cepas, aumentando

en medio graso, también influye la concentración de cloruro sódico; con la de 0,1 a 0,6% resiste mucho al calor, mientras que si la concentración de sal es de 0,8 a 2 % resiste poco, y a partir del 10% se inhibe la germinación.

Resiste un pH alto, resiste al ahumado y a la desecación etc. En los medios de cultivo, como puede ser la gelatina la espora puede quedar quiescente muchos años.

Ecología

Las esporas del Clostridium botulinum, tienen su hábitat en la tierra en donde Burke las encontró en 1919. Tambien están en el agua estancada o muy quieta especialmente en sus cienos (el E se encuentra principalmente en el sedimento marino), la espora permanece en el cieno en donde germina cuando la temperatura pasa de los 9ºC.

Las esporas son transportadas por el movimiento del agua o de la tierra, causado por el viento o por animales. Las esporas contaminan la hierba, el forraje, el heno, las plantas terrestres y acuáticas entre ellas los vegetales que consume el hombre como verduras, legumbres y frutos. En los medios carentes de oxigeno, como ocurre con la materia orgánica en putrefacción o en conservas, si la temperatura es de 4,5°C a 49°C, y preferentemente si está entre 20 y 37ºC el esporo germina, dando formas vegetativas, que se multiplican y segregan toxina.

El serotipo E se puede encontrar en el suelo sobre todo en cienos de los que se pueden contaminar los peces de agua dulce como arenques, percas y salada, en los que se desarrolla muy bien, produciendo mucha toxina ya que son animales de sangre fría, aunque también lo hace en peces y mamíferos que viven en agua salada, contaminada con el cieno y que naturalmente van luego a los peces conservados o ahumados.

Los bacilos del C. botulinum o sus esporas, procedentes del medio pueden ingresar por vía oral al intestino de numerosos animales sobre todo en los herbívoros y aún más en el cerdo y en el caso del E a los peces. La bacteria se puede multiplicar saprofíticamente en el intestino de esos animales, y ocasionalmente lo hace en el del hombre. En los animales la bacteria puede pasar en el postprandio a la sangre, en donde es

destruida por la inmunidad inespecífica, pero si se sacrifican a animales durante la bacteriemia, queda la bacteria en los capilares y se desarrolla si las condiciones son favorables en el músculo y vísceras; por eso no se deben sacrificar a los animales carnizables, sino después de haberlos mantenido con dieta hídrica durante 24 horas. La espora en el intestino no ocasiona enfermedad salvo excepcionalmente.

Los animales y especialmente las aves migratorias, pueden transportar las esporas de unos nichos a otros. A los embalses, lagunas marismas españoles llegan anualmente millones de ánades cucharas, ansares, agujas colinegras, correcaminos, archibebes. chorlitejos etc. las cuales se contaminan en aquellos con el C.botulinum.

Cuando un microorganismo patógeno mata a los huéspedes, infectados por él, pierde la ocasión de seguir multiplicandose; por eso algunos finalistas consideran que los microrganismos matan solo a una proporción exigua de infectados. En el caso del botulismo (o en del tétanos) a la bacteria «le interesa» causar una gran mortalidad pues, los cadáveres en putrefacción les proporciona un magnífico pábulo nutritivo, solo existente en el intestino del animal vivo, tanto más cuanto mayor sea el animal; por eso las toxinas tetánica y botulínica tendrían elevada letalidad.

Los cambios ecológicos, como la sequía, los contaminantes, especialmente los pesticidas en el agua, al matar a los animales y especialmente a las aves de lagunas, estanques, proporcionan medio adecuado para la multiplicación de los clostridia. En 1978 hubo una gran sequia que causó la muerte de muchos animales, cuyos cadáveres hubo que recoger para reducir el riesgo de botulismo.Las larvas de mosca como la Piphila casei que se alimentan de la materia putrefacta, ingieren la toxina pero resisten perfectamente a ella. En cambio las aves que comen estas larvas se intoxican y mueren por la acción directa de la toxina o por la minusvalia causada por la parálisis de los músculos oculares o al ahogarse por la caida del cuello de las aves acuáticas (la rigidez de cuello en el caso del tétanos que les dificulta el obtener alimento y huir de los depredadores). Los cadáveres de los animales muertos de botulismo contribuyen a aumentar la carga botulínica del medio. De acuerdo con lo expuesto deducimos que los animales carroñeros deben ser resistentes a la toxina. Las aves incluidos los pájaros pueden transportar fragmentos de cadáveres animales o sus carcasas de un lugar a otro, diseminando así las esporas.

El botulismo, mucho más que el tétanos, es una importante causa de muerte de las aves de lagunas, marismas, embalses etc. a veces de forma epizoótica. EEUU sufre epizootias muy letales de patos salvajes y de otras aves acuáticas causadas por el tipo Cα. En 1983 hubo epizootia en Doñana. En septiembre de 1986 se produjo la muerte de unos 27.000 (10 a 20.000 según Alfonso Guerra a la sazón Presidente del Patronato de Doñana anátidos y lucios, de las marismas del Guadalquivir, atribuido inicialmente a piretrinas, metil-paratión y malatión, usados como plaguicidas, pero en cantidad insuficiente para este efecto. La mortandad se debio a la fumigación aerea de tricloform, 625 mg/l, insecticida autorizado por la Junta de Andalucía para tratar arrozales; se encontró triclorfón a una concentración mínima de 1,8(g en sangre a la máxima de 66,23(g en músculo y de diclorvos 1,3 (g mínima en sangre y máxima de 8,56(g en cerebro.Aunque el desastre fue detectado el 19 de septiembre, las fumigaciones empezadas en julio, solo se interrumpieron el 26. Las aves muertas fueron recogidas e incineradas. La DL_{50} para aves es de 40 mg/kg (sin plumas,pico y patas). El tricloroform se degrada dando diclorvos, cuya concentración en el agua llegó a 1.368 mg/l. El médico titular de Villafranca declaró (ABC 19.X-1986) haber visto mas casos de alergia cutanea y de erupciones de lo habitual, por cierto que fue destituido por la Junta de Andalucía el 31 de octubre.

En el otoño de 1973 se produjo una epizootia en Doñana que mató a 2.800 aves,entre ellas garzas, cerceta común,ánade real, pato cuchara, fochas, espátulas, y flamencos, especialmente en la laguna «La Nueva» más otras 13.751 en las zonas limítrofes aunque algunas informaciones de Prensa elevaron esa cifra a 50.000, poniendo a algunas especies en riesgo de extinción. Aunque se habían empleado al 50% los organofosforados tricloroformo y fenitrotion para tratar a los arrozales en las marismas del Guadalquivir, lo fueron en concentración insuficiente para causar la muerte de las aves pero en unión de organoclorados podrian haber causado la muerte de las aves, provocando con ello el botulismo.

La catástrofe de Aznacollar en julio de 1998 mató en el Parque Nacional de Doñana a numerosas aves por botulismo, pues aunque se cerró la compuerta de Cherry para evitar la llegada del agua tóxica, Doñana perdió la capacidad de regular el agua y aumentó la posibilidad de que germinaran los esporos del botulismo existentes en los lodos.

Botulismo animal

Las aves de corral intoxicadas tienen flaccidez de cuello; es el «limberneck». Los visones de granja puede padecer botulismo por el tipo C siendo, al parecer, refractarios a los A, B y E (El Pasteur tenia vacuna para proteger a visones); el botulismo es una causa importante de mortalidad en las granjas de zorros. Los animales domésticos,herbívoros y rumiantes pueden padecer botulismo, si ingieren con el forrage el «forage poisoning» cadáveres de animales o la carroña. con toxina. Juega papel la sarcofagia que sufren los bóvidos para completar fósforo. El botulismo de los bóvidos llamado en Suráfrica «lamziekte» o «Tassmanian Midland Disease», cursa con estreñimiento que alterna con diarrea, anorexia, parálisis de la deglución, hipotermia, engrosamiento de venas, edemas, abdomen retraido, emaciación y apatía que se debe al serotipo D. Heider y cols. (2001) encontraron en el rumen de 52 vacas de una granja canadiense con signos de botulismo debidos al Clostridium botulinum de tipo D que también se aisló del estiercol de la granja. El serotipo D fue la causa de la muerte en una granja de vacas lecheras en 14 días de 22 vacas (Van Wuijckhuise y cols. (2002). Sharpe y cols. (2002) estudiaron en una granja de vacas lecheras,un gran brote de botulismo, en el que los bóvidos afectados estaban apáticos, caidos, con inestabilidad y debilidad de remos posteriores evidenciado al obligarlos a levantarse. Los animales tenian neutrofilia e hiperglucemia sin otras anomalias hematológicas o bioquímicas. La autopsia no encontró anomalías claras macro ni microscópica; el proceso es a menudo causa de muerte súbita. En la parte baja del intestino se encuentra la toxina lo que no ocurre en vacas de granjas sin botulismo. Cuando se produce poca toxina en el intestino distal,puede no dar el cuadro del botulismo, pero basta para interferir con el control neurológico del intestino y de ahí el estreñimiento (Bohnel y cols. 2001) y la disminución el crecimiento de las terneras y la producción de leche de las vacas. ¿Podría deberse a la toxina botulínica el estreñimiento humano?

Los óvidos pueden padecer botulismo llamado «piva» debido a la sarcofagia de estos animales para compensar su déficit de N y de P, por lo que aparece en ciertas épocas del año. La carne y la leche de los animales con botulismo, no deben consumirse hasta pasados 14 días de la aparición del último caso (Cobb y cols. 2002).

Los caballos, como demostraron Goehring y col. (2002) pueden padecer botulismo al comer carroña con la toxina mezclada con el forraje. Los animales intoxicados pueden tener disfagia, debilidad, intolerancia al ejercicio o parálisis. Los caballos, especialmente los potros, pueden sufrir también toxinfección botulínica si el bacilo coloniza el intestino y produce toxina en él. Los animales tambien pueden sufrir botulismo por heridas. El catgut puede contener esporas

Epidemiología

El botulismo es la intoxicación consecutiva a la ingestión de toxina preformada en conservas, debido a fallos en la preparación, envasado y tratamiento de las conservas que han permitido la multiplicación y la producción de toxina. El proceso toma mas importancia con el desarrollo de las técnicas de conservación que deben inactivar a las esporas, impidiendo su germinación. Pese a la gran resistencia de la espora, la industria alimentaria moderna ha eliminado prácticamente el riesgo de botulismo.

Los alimentos frescos aunque contengan la bacteria o el esporo no producen casi nunca la enfermedad. Los gérmenes llegados al intestino, son eliminados por las defensas especialmente por la flora comensal y no se incorporan a esta.

Dada la difusión de la espora prácticamente todos los alimentos naturales contienen bacilos. Los vegetales se contaminan por la tierra y el agua, los animales, por el paso postprandial de la bacteria del intestino a la sangre y de ella a músculos que también se pueden contaminar en el matadero por los fómites empleados.

Los clostridia pueden proceder de la germinación de las esporas. Los alimentos contienen los mismos tipos toxigénicos que se encuentran en su hábitat.

Como la germinación del Cl. botulinum solo tiene lugar en anaerobiosis, solo lo hace en alimentos en latas, tarros, en las partes profundas de jamones, conservas en aceite o manteca,embutidos en tripa o en plástico, en las que el esporo está protegido del aire. El ahumado puede no llegar a las partes profundas de las conservas. Al desarrollarse la

mayoria de las cepas del Clostridium botulinum en conservas, producen gases (CO_2 e H_2) que abomban las tapas, latas que se deben desechar aunque en la mayoría de los casos, el abombamiento se debe al hidrógeno desprendido por el ataque de los ácidos del alimento sobre el metal del envase.

La multiplicación del gérmen y la producción de toxina dependen de la composición del substrato, de la imprescindible anaerobiosis y de un pH superior a 4,5; los jugos de frutas, jarabes, la carne, los pescados, las legumbres y los platos incluso los preparados con vinagre tienen un pH mayor de 4,5; hay que tener en cuenta que las esporas aerobias en las hortalizas pueden alterar el pH. Las salchichas fermentadas en seco bajan el pH a menos de 5; la temperatura debe ser superior a los 3,3ºC;a 10º-15ºC, la toxina se elabora lentamente y en pequeña cantidad pero a la de 20ºC, que es la temperatura ambiente habitual de locales habitados se sintetiza rápidamente en grandes cantidades. La salazón y los nitritos impiden la germinación de las esporas botulínicas y por ello se emplean para madurar embutidos como el salami.

En España el mayor riesgo lo constituyen las conservas caseras. Entre 1900 y 1967 el 60% de los casos fueron debidos a conservas de judias verdes, el 13% a frutas, el 12%, a pescado ahumado o enlatado, a salsas el 7%, a carne el 11 % correspondiendo a la de vacuno el 8%, a la de cerdo el 1,5% y a la de ave 1,5%. Los brotes de botulismo ocurridos entre 1969 a 1987 fueron causados por las siguientas conservas:

Tipo de conserva	*Número de episodios*
Judías verdes	30
Espárragos	12
Pimientos	5
Tomates	5
Cardo, Alcachofas, pera, aguja (pescado)	1
Jamón o paletilla de cerdo	17
Desconocido	14

El 50,8 % de los 97 casos ocurridos en Polonia, en el 2000 se debió a pescados especialmente en los conservados en el hogar, el 26,8% a conservas de cerdo. El 46,9 %, fue debido a platos de carne de los que el 18,1 % eran conservas de cerdo, el 13,9% salchichas hechas en casa, el 12,5%, a pescado enlatado, el 12,5% a salchichas comerciales y el 11,1% a platos con carne de ave (Przybylska 2002).

Son peligrosos los alimentos conservados por desecación como el jamón; en 1986 se produjeron en Huelva 18 casos de botulismo por consumo de jamón, brote que destapó una red que desde 1983 comercializaba fraudulentamente jamones serranos, con marchamos de inspección sanitaria falsos, fraude que se estimó que ascendía a veinte mil millones de pesetas. Se puso a disposición judicial a dos personas en Sevilla y a cuatro en Cataluña, pero fueron puestos en libertad sin cargos, por no existir según el juez, por el momento elementos suficientes de juicio.

Las conservas con mayor riesgo son las caseras debido a la inadecuada preparación. Llywelyn nos informó sobre los alimento cuasantes de bortulismo.

Alimentos	*Inglaterra*	*USA y Canadá*	*Otros países*
Conservas no enlatadas de carne o pescado	2	1	5
Conservas de legumbres	2	1	0
Conservas domésticas	0	27	0
Conservas industriales	0	2	0

Las conservas que con mayor frecuencia dan lugar a brotes son las vegetales, por su facil contaminación a partir del reservorio telúrico; por eso las conservas de espárragos pueden causar la enfermedad. Las conservas de frutas, la mayoría de las cuales, están separadas de la tierra tienen menos riesgo, mientras que las de verduras, especialmente las que se cultivan someras en la tierra como espinacas, contienen esporas, que no elimina el lavado. El Weekly (48;427;1973), relata la intóxicación de una señora de

28 años que presentó fatiga, diplopia, disartria,disfagia y trastornos respiratorios, debido a champiñones marinados importados a Quebec desde USA, cuyo pH era de 6,3 en el que se encontró toxina botulinica B.

Dada la tecnología moderna las conservas industriales solo ocasionalmente, producen botulismo pero cuando ocurre, las consecuencias económicas y sociales son grandes, debido a la gran difusión, a menudo aireada intencionadamente por la competencia incluso política.

En julio de 1984 aparecieron algunos casos de botulismo, en dos localidades francesas lo que llevó al Gobierno francés a publicar el 10 de julio, un decreto, prohibiendo la importación, exportación y comercialización de un lote de conservas de espárragos, marca Pic Nic, producidos durante 1984 (País 19 de agosto de 1984) por la conservera navarra Acopasa. Acopasa presentó un recurso ante el Ministerio francés de Economía, Finanzas y Presupuesto contra el decreto de prohibición que no afectaba a las conservas de dicha marca cuando llevaran estampada la identificación NA 6182, que podían ser comercializadas, tras ser analizadas en laboratorio. La reclamación de Acopasa, presentada el 17 de julio se basaba en un supuesto abuso de poder y persigue la anulaclón del citado Decreto. Acopasa difundió un comunicado en el que señalaba que los resultados de los análisis realizados por el Instituto Pasteur y por el Hospital de Caen en muestras de este producto fueron negativos». Estos informes, no llegaron a las autoridades españolas. Por lo que respecta a la conservera «V. Garcia» de la localidad navarra de Funes, implicada ésta sí, en un posible caso de botulismo, un portavoz de la misma se quejó de que al asunto se le habría dado «un bombo y platillo que muy lejos de los justo. La conservera consideraba que sus espárragos no eran tóxicos. ya que la bacteria botulínica se encontró en una lata que llevaba abierta siete días. «Nadie puede admitir añadió el portavoz—, con una lata de siete días, una base de acusación, al haber estado en contacto con restos de alimentos posiblemente botulínicos. Todos los análisis que posteriormente se han hecho dan ausencia de botulismo. tanto en España como en otros países Europeos.» Alemania Federal había recomendado no consumir espárragos de las marcas españolas Beanmont, y Acopasa. El 24 de julio de 1984 Dinamarca se sumaba al boicot de Francia, embargando dos contenedores con latas, sin que se hubieran señalado casos.

El jefe del gabinete de abogados franceses de la empresa Acopasa (Agrícola Conservera Pamplonesa, S. A.), de la Iocalidad navarra de Cintruénigo, señor Branzchon, se dirigió el 6 de agosto de 1984 al Ministerio francés de Sanidad para solicitar indemnlzaclón por los perjuicios económicos y de prestigio ocasionados a la conservera por las acciones que se habían llevado contra la empresa en el país galo.

En abril de 1987 el Ministerio de Economía y Finanzas francés volvió a prohibir durante un año, la importación, exportación y salida al mercado de conservas de espárragos españoles fabricadas entre el 21 de marzo y el 25 de mayo de 1984, por representar graves riesgos de intóxicación. La medida fue adoptada por el hallazgo en un comercio de Montpelier de trescientas latas, cuyo consumo fue prohibido en 1984. Las empresas españolas afectadas anunciaron su intención de emprender medidas legales contra los medios de comunicación franceses que desde hacía tiempo habían emprendido una campaña contra estos productos.

A finales de 1991 se detectaron en Zaragoza, casos de botulismo que se atribuyeron a las conservas «El Picuezo», de la localidad riojana de Autol aunque el análisis de cientos de muestras de dichos espárragos demostraron que no solo ofrecían absolutas garantías sanitarias, sino gran calidad. Para paliar las graves consecuencias de esta intóxicación, el 16 de enero de 1982 se celebró una «fiesta de desagravio a la conserva de espárragos» celebrada por la Asociación de Conservas Vegetales de La Rioja, Navarra y Aragón en Logroño, La asociación dirigió cartas a todos los conserveros de la regíón para que cada uno aportara medio kIlo de espárragos para la comida de comunidad», a la que asistieron autoridades de Navarra, La Rioja, Aragón y Madrid.

Las conservas de pescado producen la mayoria de los brotes por C. botulinum tipo E. El músculo y especialmente las huevas de peces pueden estar contaminados desde su intestino bien en las maniobras de evisceración o en vivo por su paso a la sangre. Al dejar fermentar las huevas en recipientes abiertos las de las capas inferiores estan en anaerobiosis.

Schjonsby en 2002 descubrió e hizo público el informe que Peter Heiberg (1778-1849), de la Sanidad pública, envió al gobernador del condado noruego de Hedmark en 1831, sobre un brote de botulismo con dos casos, uno de ellos fatal, debido a truchas saladas y fermentadas. Hasta 1934 no se produjo otro brote, con cinco casos, que curaron causado por

jamón salado y seco. En 1981 se econtró el clostridium en latas de cangrejos «Fiesta» enlatados en Maracaibo.

Los alimentos envueltos en celofán para su venta están en anaerobiosis. Las conservas en atmósfera modificada o al vacío pueden favorecer la germinación del esporo; el vacío efectuado en conservas envueltas en plástico no impiden el desarrollo del clostridium y estan causando casos.

Una conserva casera de espárragos causó la muerte de una mujer de 70 años, el 28 de Agosto de 1992 en La Rioja por botulismo tras haber consumido una conserva casera de espárragos en la que se encontró la toxina, asi como en otro tarro con espárragos que estaba en el domicilio de la afectada. En los 13 años anteriores se habían dado en La Rioja 8 casos de botulismo, región en la que hay bastante costumbre de realizar conservas caseras.

Castedo y cols. (1958) refieron un brote por comer pimientos en lata en un restaurante que causó 21 casos, de los que murieron 12. También pueden causar botulismo los platos preparados; el MMWR 32:39:1999 informó de botulismo por serotipo A causado por una empanada congelada, que se dejó a temperatura ambiente dos días y medio.

El sexo y sobre todo la edad influyen en cuanto a la probabilidad de tomar alimentos con la toxina. Los niños suelen tomar alimentos diferentes de los de sus mayores. El enfermo de menor edad (aparte de los que tienen botulismo del lactante), fue un niño de 15 meses que enfermó en un brote familiar

Toxinas botulínicas

Las toxinas botulínicas se forman en el interior de las bacterias desarrolladas en condiciones óptimas, de las que se pueden liberar por autolisis. Las toxinas se designan con las letras BT seguidas del signo x y de una mayúscula expresiva del serotipo; vg la neurotoxina del Clostridium botulinum tipo A seria «BTxA» y mas comúnmente por las letras BoNT,seguidas, después de una barra inclinada, de una letra mayúscula indicativa del serotipo vg. BoNT/A. Las toxinas botulínicas son las substancias mas tóxicas existentes, incluidas las sintetizadas por el hombre. La cepa Hall, en un medio simple puede producir en 1 ml, diez millones de DL_{50} para el ratón en 24 horas. La dosis mínima mortal, para un animal de laboratorio,

generalmente el ratón de 20 g en 24 horas, oscila según diversos autores entre 0,05 a 0,00005 μg/kg (la tetánica iría de 0,1 a 0,0001; la tarichatoxina 0,5, la batrachotoxina 4 y la saxitoxina 8. Un mg de toxina A contiene 31.10^6 DMM de ratón u 88.10^6 DL_{50}. Para el cobaya la DMM es $4{,}8.10^6$. Un hombre muere con 100 a 3.500 DL_{50} ratón, es decir con 5 a 160μg/kg. Para Gill y cols. (1982) y otros laboratorios basandose en la inoculación a varias espcies, la $DL_{50,}$ para el hombre sería la de 1 ng/kg. Tomando como dosis letal para el hombre la de 0,065μg por kg de peso, 4,5 μg de toxina, botulínica mataría a un hombre y con 80 kg distribuidos equitativamente se podría matar a la humanidad. La LCt_{50} de la A es 22,5 μg • min/m_3 para el ratón y para el rhesus mientras que la de la enterotoxina B estafilocócica es 80–100 mg • min/m_3 para el ratón. Un Jefe de Servicio del Instituto Pasteur al que le había caído una gota de toxina murió con botulismo.

La toxina botulínica al ser un péptido, es relativamente termolábil ya que 80º C durante 30 minutos, o 100ºC durante 10 minutos, separa sus cadenas H y L, con perdida total de su toxicidad.; una cocción prolongada evita la intoxicación. Resiste parcialmente hasta un pH de 2,5 y por ello a los jugos gástricos, y se descompone en un pH alcalino. La toxina se conserva muy bien a 0ºC y a temperaturas inferiores, o bien liofilizada. La toxina se descompone en el aire, por la luz y por agentes químicos especialmente por los oxidantes, permanganato o yodo. La toxina tratada por el método de Ramón se convierte en la anatoxina o toxoide botulínico, mientras que si se somete a radiaciones (Levaditi) pasa a una supertoxina que se llamó hipertoxina.

La toxina se obtiene cultivando el C. botulinum en un medio nutritivo líquido durante unos días hasta el agotamiento de los nutrientes, que determina la muerte de las bacterias, al separar estas por centrifugación quedan las diversas presentaciones de la toxina en el sobrenadante.

Una mínima cantidad de neurotoxina que tiene 5-7S se segrega aislada pero la mayoría lo hace rodeada por una hemaglutinina, absorbible por hematíes, sin que el conjunto pierda toxicidad, y por una proteina atóxica no hemaglutinante que rodea y protege a la neurotoxina de la degradación por los ácidos y por las proteasas, formando complejos y agregados extracelulares, lábiles en el ambiente y al calor con diferencias según las cepas, cuyo tipo depende del bacilo, de las condiciones de su cultivo y del solvente empleado (Sugii y cols.1977). Los complejos M, (inicial de mean) son los menores, de 10-12 S; están constituidos por la

unión de la neurotoxina con una molécula atóxica no hemaglutinante. Los complejos L (inicial de large) de 16S, están formados por la unión del complejo M con la proteina β de 7,2S de 128.000 daltons, mas una gran cantidad de una proteina hemaglutinante (Das Gupta y cols. 1966), al menos en los complejos de las neurotoxinas A y D y probablemente en los de la B. La formación de complejos M o L depende mucho de la concentración de iones Fe^{++}; si es de 1 mM los complejos M y L, se producen equimolecularmente, pero si la concentración es de 10 mM predominan mucho los M. La descomposición de los complejos, en otros menores aumenta la toxicidad al concentrarse en ellos la toxina.

Los agregados son macromoléculas que contienen como demuestra el microscopio electrónico una cadena de neurotoxina envuelta por una hélice de hemaglutinina (Boroff y cols. 1972). La adición de tripsina, al medio de pH 6,7 modifica ligeramente la estructura de los agregados, quedando más accesible la toxina.

La agregación dimérica de dos complejos L da un agregado tóxico de 19S (unos 900.000 daltones) en el caso de la BoNT/A y de 500.000 para la BoNT/B, y de unos 350.000 (11 S) para la BoNT/E. El agregado de 19S se retiene en las columnas de Sephadex de las que se puede eluir con cloruro sódico obteniéndose una fracción de 7,2 S con 150,000 d que es el 20% del total que contiene entre 3 a 5 veces mas neurotoxina que los cristales y poca hemaglutinina y la (fracción que constituye el 80% que contiene poca neurotoxina y mucha hemaglutinina. La hemaglutinina se reparte en diversos picos, al modificar las condiciones de la elución (Das Gupta y cols. 1968).

Otro agregado es el formado por la unión de los complejos M y L que forma cristales de 840.000 a 1.000.000 daltones, de unos 19S, salvo la BoNT/C_2 y laBoNT/G.

Tipo	*Composición*
Complejo M	Toxina + proteina atóxica
Complejo L	Complejo M+proteina de 128.000 d + hemaglutinina
Agregados de L	
Agregados de M y L	

La diálisis de los agregados contra puffer fosfato separa los complejos M y la hemaglutinina,al menos en el caso de la neurotoxina A. La hemaglutinina puede separarse absorbiéndola con hematíes (Kozaki y cols. 1975).

La electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico separa las proteinas estabilizadoras de los agregados. Las columnas de Sephadex (dietilaminoetil) retienen a todas las proteinas de las soluciones de los cristales en un tampón de pH 7,2. La elución de la columna con el mismo tampón con gradiente de ClNa separa dos fracciones, la α que contiene el 20% de las proteinas, entre ellas la mayoria de la neurotoxina, siendo, (Knox y cols. 1970, Lammanna y cols. 1970,Das Gupta y cols. 1966) tres a cinco veces más tóxica que los cristales y escasa cantidad de una proteina de similar peso, atóxica y no hemaglutinante. La ultracentrifugación de la fracción α da un solo componente de 7,2S de 128.000 ($\pm$12.800) de pm y la gel fitracion otro componente único de 150.000 daltons. Los cristales disueltos solución salina molar tamponada se resuelven en complejos L (Sugii y cols. 1975). La ultracentrifugación de la solución de los cristales en medio ácido solo da una banda pero en un pH alto aparecen varias bandas. La disgregación de los agregados en los que la toxina está protegida del pH ácido y de la pepsina, libera a aquella. Por ello, por ej, la toxicidad aumenta, si el alimento se conserva a 0ºC.

La neurotoxina se separa de los agregados y complejos, por el metodo rojo que comienza precipitando el producto bajando el pH, redisolviendo el precipitado en un buffer acuoso en el que al agregar sulfato amónico precipita la neurotoxina muy pura y estable en forma cristalina, que da una sola banda de precipitación con la antitoxina por el método de Ouchterlony. La toxina se liofiliza y el polvo resultante se puede almacenar en viales pequeños. Hay tanbien cristales formados por la neurotoxina unida a la hemaglutinina, y en algunos casos a otra proteina

Detección de la toxina en alimentos

En los alimentos sospechosos se puede buscar al C. botulinum. Los materiales se emulsionan y filtran por Seitz o Berkefeld. 1 ml del filtrado se inyecta subcutánea o peritonealmente al cobaya. Si hay toxina se produce a las 15 a 18, parálisis fláccida de abdomen y cuello de modo que la cabeza está apoyada en el suelo; el signo del diente consiste en

que al soltar al animal cogido por la nuca, cae de golpe sin apoyarse en las patas delanteras y chascan las mandíbulas. Se encuentra congestión y hemorragias petequiales en hígado, bazo, riñón y bronconeumonía espirativa, a veces trombosis cerebral y meningea. Si se mezcla la toxina con antisueros dejando la mezcla 30 minutos, se puede identificar el tipo de toxina utilizando como controles el filtrado calentado (hay que tener en cuenta que las antitoxinas contienen ácido fénico que podría llegar a matar al animal). La ténica de Orr consiste en inyectar en el peritoneo a siete lotes de 3 ratoncillos con extractos de alimento, heces etc., alicuotas mezcladas con cada uno de los siete antisueros o al menos con los A B y E. Sobreviven los animales que recibieron la toxina neutralizada. Se puede administrar el producto sin tratar,por vía oral a aves (la gallina es muy sensible sobre todo a la toxina A) o al gato aunque este puede ser insensible a la toxina C; los animales muestran anestesia pupilar, midriasis y sintomas paráliticos debidos a lesion bulbar y de los centros de los nervios craneales, deglución dificil, que puede matarlo.

Hay una técnica colorimétrica rápida (1991). La existencia de botulismo por clostridios no botulinum obliga a ampliar la búsqueda a estos. Se han ideado técnicas basadas en la disminución de la fagocitosis de los estafilococos expuestos, pero logicamente no es una prueba específica.

La neurotoxina se segrega como una prototoxina que es un péptido lineal de 1.291 aminoácidos de 150.000 a 167.000 daltones (unos 5,7 S) para la de los C. botulinum A y B. Un puente disulfuro intracatenario, encorva a la cadena, dándole forma de «J». La activación a neurotoxina se produce por la separación de los dos extremos de la cadena. Las proteasas SH-dependientes, como las bacterianas, la tripsina, pero no la quimiotripsina, cortan en un único punto a la prototoxina formando a partir del extremo C-terminal, una cadena H o pesada (de 97 a 105.000 daltones según el serotipo) que queda unida a la L o ligera (de 53 y 60.000 daltones) por unión no covalente y sobre todo por un puente disulfuro en la toxina A, que tiene una molécula de zinc y por dos en la toxina B. La reducción de los puentes disulfuro entre las dos cadenas separa dos fracciones con actividad antigénica diferente; la H de 104.000 d y la L de 59.000. La quimiotripsina separa en la holotoxina a la fracción H en dos partes una la H_1 de 50.000 d en la que radica la mayor actividad y otra de 100.000 d formada por la L y por la H_2, a la cual la tripsina separa la

fracción H_2. Esta disposición de la toxina aumenta la neurotoxicidad. La toxina C_1 esta formada por dos proteinas no ligadas la I y la II.

La cadena H está constituida por la unión de una fracción llamada H_1 de unos 50.000 daltons con un puente intracatenario se disulfuro y la H_2 que se separa unida a la L, formando el complejo L-H_2, de unos 100.000 daltons, separables por la tripsina y por la quimiotripsina. Los pm de las subunidades H y la L son:

Tipo de toxina	*Peso molecular de la cadena L (o fraccion 1)*	*Peso miolecular de la cadena H (o fracción 2)*
A	53.000	97.000
B	59.000	104.000
C α	53.000	98.000
D	60.000	110.000
E	50.000	102.000
F	56.000	105.000
G		

La destrucción o la reducción de los enlaces disulfuro con puffer de Nicotinadenina dinucleótido al 1% en solución de Cloruro sódico 0,5N o por el ditiotreitiol, suelta a las cadenas H que queden en el supernadante y a las L que se pueden separar por electroforesis en gel de acrilamida o bien dejando que se agreguen entre sí, precipitando cuando la concentración de toxina supera el mg/l salvo que, como pasa con la toxina tétanica, se adicione urea. La diálisis de una mezcla equimolecular de las cadenas H y L regenera el 40% de la neurotoxina.

Las neurotoxinas producidas por los clostridia, analizadas por clonación y secuenciación de genes, demuestra que tienen en común solo algunos segmentos no consecutivos, localizados preferentemente en la cadena L. Las toxinas botulínica y tetánica tienen un segmento muy homologo, en la mitad de la cadena ligera (NH2-terminal 50 k Da), que contiene el motivo ligado al zinc de la metaloendopeptidasas, HEXXH, que en cinco serotipos de la toxina botulínica, asi como en la tetánica,

quela al catión zinc, necesario para la catálisis. La HEXXH se ha sintetizado (Jongeneel y cols.1989) y se sabe que actúa intracelularmente, lo que llevó a Schiavo y cols. (1992) a pensar que seria una endopeptidasa zinc-dependiente, cuya cadena L, contiene la secuencia histidina-ácido glutámico-xaa-xaa-histidina típica de estas enzimas, que media la fijación a la proteína, siendo imprescindible para su toxicidad.(Nieman y cols. 1994). Middelbrook y cols, demostraron que los inhibidores de las zinc-endopeptidasas bloquean la actividad intracelular de la toxina. Ello proporciona una prueba indirecta, pero muy convincente, de que la toxicidad celular radica en una actividad proteásica. Igualmente las cadenas L de las neurotoxinas tetánica y diftérica y la encefalina,que interviene en la inflamación, y en la invasión y producción de metástasis de tumores malignos, asi como en los subsiguientes procesos de reparación hística (proteasas de los PMN), son endopeptidasas zinc-dependientes, que cortan proteinas en puntos específicos.

Ihara y cols. (2003) demostraron que la neurotoxina de la cepa 111, la 111/NT, aislada de un caso de botulismo del lactante del serotipo B, tiene un 97,6% de homología y del 85,7% la de los aminoácidos con la neurotoxina de la cepa Okra aislada de un botulismo alimentario, diferencia que se traduce en cambios bioquímicos y antigénicos. La razón de substitución de los no sinónimos respecto a la de los sinónimos fue 0,47. Las substituciones de aminoácidos entre las toxinas 111/NT y Okra/NT tienen lugar preferentemente en el dominio C terminal de la cadena pesada «H(C)»responsable de la unión con el complejo de proteina y ganglósido de su receptor.

Es posible que los Cl. botulinum A, B y E produzcan otras moléculas tóxicas de 9.000 a 18.000 daltones.

Se conocen cientos de inbibidores de las zincproteasas (el captopril inhibe específicamente la zinc-proteasa encargada de la conversión del angiotensinógeno en angiotensina, lo que abre una vía para emplear antídotos.

Hay diversas toxitecas, siendo la más importante la del «American Type Culture Collección»

Las antitoxinas contienen anticuerpos contra ambas cadenas siendo los anti-H (constituidos por anti-H_1 y por anti-H_2) más potentes que los anti-L (Kozaki y cols. 1977, Krysinski y cols. 1980). Ambos anticuerpos son ca-

paces de proteger al ratón frente a la neurotoxina. La BoNT/A y laBoNT/B solo se neutralizan con sus correspondientes antitoxinas; la BoNT/D, la BoNT/F y la BoNT/E se neutralizan parcialmente con las antitoxina C y F.

Genética de la toxicogénesis

Cada tipo de C. botulinum produce una neurotoxina principal, pero puede segregar otras en menor cantidad como la Af. La toxina se produce al expresarse los genes BoNT, de las toxinas A,B,E y G situados en plásmidos, (Eklund y cols. 1988) en donde está también el gene de la toxina tetánica; los genes de las neurotoxinas A y B, tienen un «open reading frame» de 3.873 bp que codifica la formación de una proteina de 1.291 aminoácidos que pesa 150.000 a 167.000. daltones (unos 5,7S) y tiene dos uniones sulfhidrilo intracatenarias. Los genes de las toxinas C y D están en el profago lisogénico llamado tox^{+}. Algunos fagos tienen genes que codifican la toxina principal y otros fagos tienen genes que codifican otras toxinas menos específicas; la curación de una bacteria elimina a algunos profagos pero no a todos por lo que la bacteria continuará produciendo las otras toxinas: la ingenieria genética puede convertir un serotipo C en uno D o viceversa, o bien modificar la cantidad de toxina producida.

Para que se expresen los genes se requiere anaerobiosis, un pH superior a 4,6 (alimentos poco ácidos) y menos del 15% de sal. La adición de ornitina y citrulina aumenta la producción de toxina. También se requiere una temperatura superior a los 3ºC. Para que una conserva sea tóxica si está a 10 a 20ºC se necesitan varias semanas,mientras que a 28ºC bastan 8 días; por eso los alimentos frescos no tienen suficiente toxina.

El calentamiento de las esporas a 70º C durante veinte minutos o bien adicionando a los cultivos de cepas C un suero antifago o naranja de acridina cura a algunas bacterias, perdiendo los genes BoNT. Los C. botulinum no toxigénicos pueden adquirir, si no tienen el fago tox+ la propiedad de fabricar toxina, incubándola con los lisados de un cultivo de bacilos toxigénicos estimulados por la Mitomicina C.

Las toxinas se sintetizan antes de que lo hagan las proteasas en las cepas que tienen estos enzimas y se producen a un pH bajo en el que se

forma poco gas y pocas proteasas. Las cepas proteolíticas no forman toxina por debajo de un pH 5 y con una concentración de cloruro sódico superior al 5%. La sal y los nitritos adicionados a los alimentos enlatados o en frascos, inhiben la producción de toxina.

Además del C. botulinum, pueden tener y expresar los genes codificadores de la neurotoxina botulínica el C. argentinense, el C.butyricum, así llamado por poder producir en algunos alimentos acético y butírico agresivos para el intestino y el C.baratii (que causa el botulismo infantil si coloniza previamente el intestino en donde produce la toxina. Harvey y cols. (2002) describieron un caso de botulismo causado por la toxina F producida por un Clostridium baratii. Los genes codificadores de las toxinas se pueden secuenciar, clonar e insertar en otras bacterias. (Eisel y cols. 1986, Fairweather y cols 1986, Hausor y cols. 1990, Binz y cols 1990, Thompson y cols. 1990, Whelan y cols 1992, Alison y cols. 1992, Campbell y cols. 1993), fabricando nuevos agentes productores del botulismo, aunque los experimentos de este tipo están prohibidos en muchas naciones entre ellas USA pero no hay prohibición internacional.

Sistema nervioso

El sistema nervioso está formado por neuronas, conectadas entre si, formando cadenas,circuitos o redes que transmiten, potencian y modulan señales. La llegada de un estímulo a una neurona se transmite, sin modificar el mensaje, hacia el axon, a una velocidad constante de 0,3 a 100 m por segundo, mayor en las fibras largas y gruesas. El paso del estímulo a otra neurona requiere casi siempre, la salida al espacio sináptico de un neurotransmisor, capaz de reaccionar con uno o con varios receptores postsinápticos. Al unirse los NT a sus receptores aumenta el potencial sináptico excitando o inhibiendo a la neurona postsináptica, cuyas ramificaciones nerviosas pueden hacer llegar a numerosas células el impulso en un fenómeno de divergencia e igualmente a una misma neurona pueden llegar muchas aferencias en un fenómeno de convergencia.

El sistema autonómo está formado por fibras amielínicas que terminan en los músculos lisos de los vasos, en las vísceras y en las glándulas en forma de retículo. La acetilcolina es el neurotransmisor del vago y con

la noradrenalina la del simpático; la acetilcolina es tambien el neurotransmisor de muchas conexiones del sistema nervioso central,que terminan en la placas motoras, haciendo que el músculo estriado se contraiga.

La acetilcolina se sintetiza en las terminaciones axónicas, transfiriendo en la neurona, el acético del acetilcoenzima A procedente de la sangre a la molécula de colina, por la acción de la colin-deaciltransferasa transportada desde el soma de la neurona hasta las terminaciones axónicas. La mayor parte de la acetilcolina se almacena en las vesículas, estructuras esféricas, limitadas por una membrana procedente de la de la neurona. Cada vesícula contiene unas 10.000 moléculas de acetilcolina; las vesículas regulan el gasto de la acetilcolina citosólica y acumulan calcio que colabora en la liberación de acetilcolina.

Parte del contenido de las vesículas puede pasar al citoplasma especialmente en la exocitosis. Al llegar el estímulo nervioso a una sinapsis, salen del citoplasma unas cuantas moléculas de acetilcolina por una especie de válvula de la membrana formada por un compuesto proteico (Dunant y col.1985), pasando al espacio postsináptico. La union de unas pocas moléculas de acetilcolina a sus receptores origina una diferencia de potencial mínima entre las dos caras de la membrana, llamada potencial subminiatura.

Cuando han reaccionado menos de 150 moléculas de acetilcolina con sus receptores, se producen los potenciales miniatura o MEPP (miniature end plate potential), descubiertos por Fatt y Katz, en 1952 en la fibra muscular en reposo.

La exocitosis se produce al fundirse las vesículas con la membrana celular, dando salida a los neurotransmisores (o neurohormonas) al espacio intersináptico o a la unión neuromuscular, que actíva a las fibras musculares contrayéndolas.

Para que tenga lugar la exocitosis se requiere la aproximación de las vesículas a la la membrana celular mediante la activación del citoesqueleto y la fusión de ambas membrana, proceso en el que intervienen, una serie de proteinas de la membrana. Entre ellas la sintaxina, la NSF que es una ATPasa, los factores α, β γ NAP muy semejantes entre sí, la proteina SNAP-25, anclada en la superficie interna de la membrana presináptica, la cual es esencial para el crecimiento del axon.

Unos componentes específicos de la membrana de las vesículas son las isoformas 1 y 2 del V-NAP o sinaptobrevinas, que solo se diferencian significativamente en su porción aminoterminal; está codificada por un gen que se ha encontrado en el hombre, vacas, rata, mosquito, que se expresa en el tejido nervioso y en el neuroendocrino.

Cuando el potencial de acción llega a la sinapsis, el calcio de la terminación actúa en la membrana de las vesículas desencadenando la salida de acetilcolina de la sinapsis a la hendidura sináptica estimulando a la neurona contigua o en su caso a la placa motora.

Cuando se necesita una intensa actividad nerviosa, pasa más calcio a la membrana de las vesículas, varias de las cuales se funden entre si y como antes, liberan por exocitosis acetilcolina, acetilcolina de 150 a 200 vesículas o de 400 en el caso de las fibras grandes.

Reacción de la acetilcolina con sus receptores postinápticos

La acetilcolina sináptica se une a sus receptores postsinápticos que son glucoproteinas de 300.000 d formadas por 3-4 subunidades especificas de especie, disponiendo cada una de dos lugares de recepcion de la acetilcolina; los receptores de la acetilcolina son muscarínicos o nicotínicos, y están acoplados a canales de iones. La subunidad α de los receptores nicotínícos se fosforila por la proteinquinasa C, la subunidad β por quinasas tirosín-específicas, la subunidad γ, la subunidad γ por la proteinquinasa A y quinasas tirosín-específicas, y la subunidad por las tres quinasas. La fosforilación dependiente del AMPc de las subunidades β y γ desensibiliza al receptor, haciendolo menos capaz de activar a la proteina Ge, aumentando su unión con la proteína inhibidora arrestina; de este modo regula por retroalimentación, haciendo que las respuestas celulares sean mucho más precisas.

En las sinapsis aunque se hayan producido muchas uniones de la acetilcolina con su receptor, solo se activan unos pocos receptores, que disminuyen en la segunda neurona, la resistencia de su membrana, a la entrada de iones de sodio y de calcio y a la salida de los de potasio a través de los poros, en la zona contigua de la membrana. El flujo de iones, como lo haría una pila eléctrica, origina una diferencia de potencial eléctrico

de varias decenas de milivoltios entre las dos caras de la membrana celular, produciendo una corriente eléctrica que atraviesa la membrana y que se transmite por ella hacia la terminación axónica propagándose como una onda, llamada potencial de acción, a lo largo del axon.

La acetilcolina que no llegó a unirse a su receptor y la que ya lo hizo se hidroliza por la acetilcolinesterasa, impidiendo el acúmulo de la acetilcolina, que sería tóxico, y dando colina y acético que se reabsorben formando en la sinapsis por la colin deacil transferasa, nueva acetilcolina.

Patogenia de la intoxicación botulínica

La toxina libre, ingerida con los alimentos, se destruye parcialmente por la masticación. La toxina incluida en los agregados está protegida del pH ácido y de la pepsina. En el intestino la tripsina libera y activa a la neurotoxina, acción necesaria para la toxicidad de las toxinas E y G, sin que modifique la toxicidad de la toxina D. Colaboran, en menor grado a la activación, otras enzimas digestivas y las proteasas segregadas por el C. sporogenes y por los propios C. botulinum proteolíticos, (los A y algunos B y F). Prévot y cols. (1966) en una epidemia por el tipo D en el Tchad, en 1959 encontraron que el C.botulinum estaba asociado al Bacillus licheniformis, cuya proteasa aumentaba la toxicidad de la botánica. La reiteración de las tomas de toxina aumentan los efectos; es posible que se trate del fenómeno de facilitación observado en el tétanos.

Si se dispersa la toxina en el aire en forma libre está mas expuesta a su degradación ambiental y si lo está formando complejos, no se pueden activar al carecer de enzimas digestivos; la dosis mortal para el hombre es para McNally y cols. (1994) 3 ng/kg.

La toxina, llegada a la sangre, no se une a extractos de cerebro como obtuvo Wassermann Takaki en el tetanos, pero si se fija en los sinaptosomas (Habermann 1974) que son terminales nerviosos, obtenibles experimentalmente del cerebro de ratón que conservan gran parte de la estructura de la presinapsis, entre ellas las vesículas; es decir necesita para fijarse no solo componentes bioquímicos sino las estructuras. La afinidad para los sinaptosomas no es muy grande pero permite estudiar la fijación de la toxina; Schlavo y cols. (1983, 1989) usaron pequeñas vesículas muy

purificadas obtenidas de cerebro de rata. Para el efecto tóxico se requiere la holotoxina (al igual que en la tetánica TaTx) lo que no hacen las cadenas H y L separadas).

El anclaje se efectúa por el dominio, esférico del extremo carboxilo terminal de la cadena H de las holotoxinas, botulínica, (al igual que pasa con las toxinas diftérica y tetánica) a los receptores que son un complejo de una proteina de unos 200.000 daltones, encontrada en 1996 por Middlebrook y cols. expresadas en la membrana de células del feocromocitoma de rata diferenciadas en sentido neuronal por la inducción ejercida por el factor de crecimiento nervioso NFG, unida a un esfingolípido. Similarmente otras tóxinas microbianas como la diftérica, tienen dominios estructurales que se unen, internan y realizan la actividad enzimática. La toxina botulínica fijada, como ocurre en el tétanos, no se neutraliza por la Ig, por lo que no se evita el bloqueo de la liberación de la acetilcolina.

La cadena H recombinante obtenida por la clonación en la E coli de los genes de la toxina 111/NT tiene una actividad ligante a la sinaptotagmina II, 4,2 veces menor que la de la Okra/NT. El híbrido de los extremos COOH-terminal de las cadenas H de las dos toxinas revela que la disminución de actividad ligante se debe a la mutación de 23 residuos en esa fracción (1029 1291) de la Okra/NT. (Ihara y cols. 2003).

Los receptores son específicos de cada serotipo de toxina, (De Black y cols. 1986, Simpson 1989); están situados en regiones especializadas denominadas «coated pits» traducibles como «pozos revestidos» que se presentan concentrados en la membrana de las presinapsis colinérgicas y sobre todo en la de las placas motoras amielínicas de las que hay 150 a 500 por cada μ^2 de membrana muscular dispuestos. Basta la fijación a los receptores de cantidades extremadamente bajas de toxina para provovocar la enfermedad. La estructura de estos receptores determina la diferente susceptibilidad de las especies e individuos. Las drogas lisosomotrópicas inhiben o al menos retrasan la parálisis botulínica, lo que hace pensar, que la toxina entra en las neuronas por el RME, via utilizada por otras toxinas bacterianas, por muchas hormonas polipeptídicas,por factores de crecimiento, e incluso por algunos virus (Goldstein y cols. 1979).

La toxina entrada en las neuronas emigra centrípetamente por los filetes nerviosos y llega por los pares craneales, a los centros nerviosos, a los nervios autónomos (colinérgicos) y a la función neuromuscular lo que

explica la parálisis fláccida de los músculos intrínsecos y extrínsecos del ojo y de los deglutorios. La toxina de la sangre, no atraviesa la barrera hematoencefálica.

La toxina botulínica no modifica la síntesis de acetilcolina, ni el número de vesículas, ni su contenido en acetilcolina, ni inhibe a la colinesterasa, y no forma anticuerpos contra la acetilcolina pero impide que se libere suficiente acetilcolina capaz de contraer al músculo. A concentraciones mayores puede inhibir la liberación de otros neurotransmisores como la noradrenalina (Habermann y cols. 1987). A diferencia de la parálisis por el curare, la inyección directa de acetilcolina en el músculo para que llegue a la placa neuromuscular, o aún mejor la introducción por iontoforesis de tetraetilamonio contrae al músculo igual que si se hubiera aplicado una corriente eléctrica.

Una vez unida la cadena H a su receptor, otro dominio contiguo de la H reduce el puente disulfuro separando Ia cadena L que tiene actividad Zn-endopeptidasa, translocándola al citoplasma, en donde se une a lugares especificos de cada serotipo de toxina, en las membranas de las vesículas colinérgicas; las neuronas que tienen neurotransmisores distintos de la acetilcolina como los órganos con inervación adrenérgica no se afectan y en aquellos con transmisión mediada por la norepinefrina y por la acetilcolina solo se afecta esta (Wright).

La neurotoxina B, se une y corta a la sinaptotagmina, proteina asociada a las vesículas permitiendo que entre la cadena L en las vesículas (Nishiki y cols. 1994), lo cual no implica necesariamente que este fenómeno sea el que interne a la toxina.

La neurotoxina A separa solo nueve aminoácidos, menos del 5 % de la porción carboxiterminal de la SNAP-25, esenciales para la neuroexocitosis. La toxina E la corta en otro punto, e igualmente impide la exocitosis.

Las dos isoformas de la sinaptobrevina proteina de la membrana de las vesículas, cuya motilidad electroforética es de 19K son cortadas, (Schlavo y cols. 1992) al igual que lo hace la toxina tetánica, produciendo fragmentos de 12 y de 7 K en el topo y en el hombre, por las toxinas botulínicas B, y F y por la tetánica, separando la glutamina de la lisina; la D hidroliza el enlace peptídico entre la lisina y la leucina. Las

toxinas B,D y F en eI ratón y en el pollo, cortan a la isoforma 1 a nivel de la valina y la de la 2 entre la glutamina y la fenilalanina; la eliminación de los extremos de la sinaptobrevina del SNAP-25, o de la sintaxina, impide que se una la vesícula a la membrana presináptica y la consiguiente exocitosis, lo que explica en parte la alta resistencia del ratón y del pollo y la baja del topo y del hombre en lo que interviene la diferente presencia de receptores de alta afinidad para las toxinas en la unión neuromuscular. Al tratarse de una enzima catalítica, una sola cadena L puede cortar sucesivamente todas las moléculas de sinaptobrevina, de SNAP-25 o de la sintaxina, existentes en la terminación nerviosa, bastando menos de una molécula de toxina por célula para provocar la enfermedad y su persistencia pese a cesar el ingreso de toxina. La cadena L de cada serotipo como endopeptidasa actúa sobre una proteina SNARE o lo hacen sobre la misma proteina pero cortándola en puntos diferentes, formando un complejo hetero-oligomérico, asociado con la membrana de las vesículas sinápticas con una parte exterior a las misma, que impide la exocitosis.

La entrada de la cadena L en las vesículas, acidifica su contenido, gracias a la bomba protónica ATPásica de la membrana hasta un pH de 4,5. Algunas drogas o las aminas lisosomotrópicas, impiden la disminución del pH y casi siempre, inhiben la liberación de ligandos, hecho que es un marcador de endocitosis mediada por el receptor. 1955).

El calcio de las vesículas se une a dos histidinas del segmento central conservado de la cadena L, como se preveía por su homología con las zincproteasas, impidiendo la acción del calcio sobre la membrana de las vesículas presinápticas inhibiendo, aún a concentraciones mínimas, la salida de acetilcolina de las vesiculas, quedando interrumpida la transmisión nerviosa entre las neuronas motoras y muy selectivamente en la placa neuromuscular (Brin 1997), causando parálisis flaccida de los músculos inervados por el sistema nervioso periférico, como se ve en el preparado frénico-diafragma de rata o ratón y se altera la transmisión parasimpática.

Las proteínas GTP son el blanco intracelular preferido de las toxinas proteicas bacterianas.Las Rho GTPasas RhoA/B/C, Rac1/2 y la Cdc42, pertenecen a la superfamilia Ras de bajo pm, son las principales reguladoras del citoesqueleto de actina.

Las toxinas A y B del Clostridium difficile, causantes de la colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos son citotoxinas que actúan intracelularmente con las mono glicosiladas Rho GTPasas.

La toxina C3 del Clostridium botulinum, que no está relacionada con las neurotoxinas clostridiales, cataliza la ADP ribosilación de la RhoA/B/C pero no la de otras Rho GTPasas. La glicosilación así como la ADP ribosilación inactiva al Rho disociando el citoesqueleto actínico.(Just y cols.2001).

En el caso de la toxina C_1 inyectada en un asa aislada de ratón, se une su componente II a la superficie de la células intestinales y hace que entre el componente I al interior de la célula (Ohishi 1983), haciéndo que se acumule líquido en el asa.

Al quedar inhibida la liberación de acetilcolina disminuyen los potenciales miniatura y el de placa causando parálisis muscular. La repetición del estímulo restablece el potencial de accion muscular (fenómeno de facilitación), lo que asemeja el modo de acción de la toxina al exceso de Mg o a la gran hipocalcemia o al bloqueo neuromuscular que causan algunos antibióticos o al sindrome de Lambert-Eaton. El veneno de la viuda negra aumenta la salida espontanea de calcio del músculo intoxicado por la toxina botulínica, pero no basta para restaurar la liberación normal de la acetilcolina lo que confirma que no es la concentración del calcio, sino su intervención en la exocitosis, como actúa la toxina botulínica. El estímulo repetitivo del nervio ulnar con 3 Hz no señala cambio de la amplitud, en el test de conducción nerviosa, mientras que el de 20 Hz señala un aumento de mas del 160 %.

La microinyección de toxina en los pares de neuronas del ganglio bucal del molusco marino, Aplysia californica, bloquea la neuroexocitosis, efecto que requiere zinc.

La inyección de una mínima cantidad de toxina selectivamente en un músculo, lo debilita y atrofia por irreversible bloqueo de la liberación de acetilcolina en la placa motora efecto que persiste 2 a 20 días y que se restablece al cabo de 2 a 4 meses cuando una nueva terminal axónica haya restaurado la transmisión (Alderson y cols. 1991).

Para la curación es preciso que se inactive la toxina, y una vez logrado la célula debe sintetizar nuevamente su dotación de proteinas sinápticas dañadas por la toxina.

La toxina disminuye los potenciales miniatura,atrofia por denervación al músculo; las estimulaciones repetidas pueden hacer reaparecer un potencial de acción muscular (facilitación).

El efecto depende de la especie intoxicada, de la dosis total y de su reparto temporal. Una dosis dada administrada fragmentadamente es más tóxica que si se hace de una vez y de los músculos afectados, siendo los oculares los más sensibles.

La afectacion postsináptica es secundaria y se producen lesiones de denervacion, atrofia muscular y alteraciones electricas. Debido a la mínima cantidad de toxina que normalmente entra en el organismo y que enseguida se fija sin que llegue a contactar con las células presentadoras del antígeno, de modo que como pasa con el tétanos, no se producen anticuerpos.

La toxina tetánica tambien impide la salida de acetilcolina pero lo hace en la interneurona inhibidora lo que explica que en el tétanos la parálisis sea espástica, al estar interrumpido el circuito nervioso espinal que proporciona el adecuado equilibrio de la contracción de músculos opuestos, esencial para un movimiento armónico y controlado de las articulaciones.

Clínica

El botulismo puede presentarse de diversa forma y gravedad dependiendo fundamentalmente del tipo de toxina y de la cantidad total ingresada. Puede haber intoxicaciones ligeras con afectación ocular benigna a veces con sequedad de boca y estreñimiento que desaparece pronto, que no se suelen identificar etiológicamente.

Los intoxicados graves presentan un gran alteración del estado general con rápido adelgazamiento, trastornos graves de la conciencia, parálisis flácida, insuficiencia respiratoria aguda por la parálisis de los músculos respiratorios o por la obtrucción de las vías respiratorias,colapso y la muerte.

El cuadro típico se presenta de forma aguda, consecutivo a la ingestión de una mínima cantidad de exotoxina, contenida en un alimento consumido por una o varias personas en una comida común, frecuentemente única, que suprime la neuroexocitosis de la acetilcolina en las sinapsis.

Es posible la entrada respiratoria por medio de aerosoles utilizados deliberadamente, como agresivo. La latencia depende de la cantidad de toxina ingerida; su duración puede determinarse cuando el cuadro fue debido a una sola ingesta; va de 5 horas a 7 días y en algunos casos a los 10 días; siendo la mas frecuentes 18 a 72 horas. En los 21 casos de un brote con 12 muertes,estudiado por Castedo y cols. (1958) el cuadro comenzó entre las 13 y las 48 horas.

El cuadro inicial puede ser muy discreto, confundirse con una gastroenteritis apirética o incluso no presentarse. En la mitad de los casos, hay síntomas digestivos discretos, con náuseas, vómitos,dolor abdominal de tipo cólico o epigástrico que puede ser paroxístico simulando una urgencia quirúrgica y estreñimiento intenso y a menudo persistente debido a la atonia intestinal debida a la afectación del vago, y a la ausencia de secreciones, resistente al tratamiento e incluso llegar a ileo. La rara coincidencia de ingerir la toxina botulínica con la estafilocócica puede causar diarrea ligera.

La afectación de las terminaciones nerviosas de la orofaringe, causa parálisis secretoria de las glándulas salivares que determina sequedad oral, sed, disfagia dolorosa, sensacion de quemadura, labios fuliginosos:la mucosa oral se pone roja oscuro, y se cubre enseguida de una capa amarillenta, espesa, adherente, que obstruye la faringe y que hace fétido al aliento. El cuadro se puede confundir con una amigdalitis y hasta con una intoxicación atropínica. La masticación esta dificultada e incluso no se puede efectuar; tambien lo está la fonación. Si la obstrucción oro-nasofaringea es grande repercute en la capacidad ventilatoria que obliga a intubar a estos pacientes. La afectación del vago suprime la secreción lacrimal con riesgo de conjuntivitis y queratitis, la nasal y la del sudor. Luego se afectan los músculos faríngeos deglutorios, desaparece la salivación, causando una gran sequedad de boca y nariz, que origina voz ronca, disfonia, disartria, disfagia alta dolorosa, que simula amigdalitis, sed intensa, sensación de quemadura faríngea que aparece tipicamente entre las 12 y las 72 horas de la exposición. Los labios están fuliginosos y la mucosa oral rojo oscuro seca, recubierta con restos celulares amarillentos, espesos, adherentes que obstruyen la garganta y dan fetidez del aliento; la motilidad de la lengua esta disminuida sin que se puede sacar de la boca y hay dificultad de masticar y deglutir.

El periodo de estado se caracteriza por un síndrome neurológico que añade al trastorno secretor, manifestaciones paralíticas generalmente bilaterales y simétricas en los casos de cierta gravedad, raro en el botulismo por la toxina B.

Se instaura progresivamente paresia que pasa a parálisis de los músculos estriados que afecta primero a los intrínsecos del ojo inervados por pares craneales. Existe sistemática y precozmente, inicial en los casos leves, oftalmoplejía ínterna, bilateral y simétrica con parálisis de Ia acomodación que hace dificil la visión cercana por la afectación del músculo de Rouget MuIler que es el esfinter ciliar que de modo persistente causa presbicia aguda. La parálisis de los músculos extrínsecos del ojo es más inconstante y tardía que la oftalmoplejia interna; se debe a la afectación del motor ocular común (III par) con estrabísmo externo (recto interno), ptosis (receptor del párpado superior), parálisis del V par (patético), parálisis del oblicuo mayor y del recto superior que impide la elevación del ojo. La afectación del VI par (motor ocular externo) que inerva al recto externo, determina estrabismo interno y la parálisis del recto inferior que ocasiona parálisis del descenso del ojo.

La parálisis de los nervios ciliares cortos que inervan el iris, produce midriasis paralisis pupilar bilateral, simétrica, como en la intoxicación con atropina, con abolición del reflejo fotomotor y fotofobia. Algo después, aunque menos constante se presenta oftalmoplegía externa también bilateral y simétrica con anomalías de la acomodación, diplopia, visión borrosa o confusión de los planos visuales. La parálisis del motor ocular externo, (III par) causa ptosis, estrabismo externo (recto interno), parálisis de elevación del globo ocular (recto superior), parálisis de descenso (recto inferior), de IV y del V (patético) par, que causa parálisis del gran oblicuo, y la del VI par que paraliza el ocular externo con estrabismo interno (parálisis del recto externo). Como consecuencia de esas diversas afectaciones nerviosas se produce diplopia progresiva y vision borrosa.

Puede haber paralisis del velo del paladar. Al deglutir pueden pasar alimentos a las vías respiratorias bloqueando bronquios con riesgo de neumonia aspirativa, (síndrome de Mendelsohn) por lo que no debe darse alimentación oral a estos enfermos.

Poco frecuentes son las parálisis periféricas, que son solo motoras, agudas fláccidas, (la tetánica es espártica), la mayoría simétrica, descen-

dente, siendo las mas importantes las faciales. La parálisis de los músculos deglutorios, causa atrangantamiento con el riesgo de neumonias aspirativas. La afectación de los nervios y centros bulbares respiratorios, el bloqueo de las vesículas acetilcolínicas del frénico inervador del diafragma y las de las placas nerviosas de los intercostales, causan parálisis respiratoria, que puede producir cianosis, somnolencia por aumento del CO_2, por lo que se debe aplicar la respiración asistida para evitar la muerte. En los casos graves se pueden afectar los músculos de las extremidades, predominantemente de la parte superior de los miembros inferiores, con tetraparesia y fatiga. Los reflejos tendinosos están dismuidos o ausentes. El electromiograma de la actividad muscular espontanea revela abundantes potenciales de acción de unidad motora y muy abudantes los de pequeña amplitud anomalia no específica, siendo normal la velocidad de conduccion nerviosa y la estimulación de los nervios provocan en el músculo potenciales de acción de pequeña amplitud como los del síndrome de Lambert-Eaton, o el de las intóxicaciones por manganeso o por magnesio, en la hipocalcemia aguda en la parálisis causada por venenos de serpientes o por la polimixina intraperitoneal.

El escaner cerebral es normal, y en el EEG está disminuido el ritmo alfa sin relación con la dosis.

Puede presentarse paresia y hasta parálisis de la vejiga con retención urinaria que requiere sondaje, descontrol de esfínteres, con incontinencia y disuria; Sautter y cols. (2001) estudiaron un caso de botulismo por herida con parálisis vesical, que se recupero totalmente.

No hay fiebre, salvo que se presenten infecciones debidas a la disminución de secreciones defensivas, como estomatitis, faringitis, anginas, parotiditis, bronconeumonía y neumonía o bien si hay, lo que es frecuente, deshidratación puede haber fiebre. Si se afecta el miocardio o hay hipertensión, puede haber taquicardia y colapso, teniendo en cuenta que la toxina, impide la bradicardia vagal. Puede haber hipotensión postural por la afectación del sistema autónomo.

Las funciones sensoriales y los procesos mentales entre ellos la consciencia están intactos. Van-Dijk y cols. (2001) encontraron el caso de varón de 42 años que como consecuencia de un botulismo por conservas presentó parálisis periferica entre ellas de los músculos intrínsecos y extrínsecos del ojo rapidamente progresiva que desembocó en un cuadro de muerte ce-

rebral aunque el EEG demostraba conciencia. Fue sometido a ventilación artificial y a las cuatro semanas comenzó un lento restablecimiento.

En los casos graves hay una gran astenia y un rápido adelgazamiento. Hay raras formas que dificultan el diagnóstico simulando una apendicitis o una oclusión intestinal, y coma. La debilidad muscular, la diplopía, la confusión de planos visuales, incapacitan gravemente al paciente.

La recuperación se debe a la neoformación de nuevas sinapsas neuromúsculares. Pueden quedar paresias durante muchos años. La muerte sobreviene en la mayoria de los casos por insuficiencia respiratoria, por arritmias cardiacas o por la neumonia aspirativa. Asi como en los animales el botulismo tienen una letalidad cercana a 100, en el hombre, tal vez porque la toxina ingerida suele ser muy pequeña la letalidad aun sin tratar es inferior a la del tétanos; entre 1910 y 1919, la letalidad era 70. En los años 80, bajó a 9, y en 1992 a menos de 2 gracias a las antitoxinas y a la ventilación asistida. En Estados Unidos la letalida de los casos ocurridos entre 1.899 a 1.949 superó la tasa de 60; entre 1970 a 1973 fue 23; en 1974 22 y en 1975 11. En las personas que superan el cuadro, las manifestaciones clínicas desaparecen al cabo de unas semanas a meses, aunque varía mucho de un paciente a otro.

Botulismo benigno

Más frecuente que la forma típica hay un botulismo benigno, poco conocido, que puede pasar desapercibido. Malhado y cols. (1982), describieron cuatro casos en Portugal. Laso y cols. (1986) publicaron un brote que afectó a un varón de 48 años y a su hijo de 21 que desde 15 y 8 días antes respectivamente, presentaban pirosis y disfagia, precedida durante una semana de visión borrosa, dificultad de acomodación y sequedad oral.El paciente estaba consciente, bien orientado y afebril; llamaba la atención una extremada sequedad lingual y orofaríngea, con eritema intenso; asimismo, se apreciaba un claro trastorno de la acomodación, siendo normales los parámetros bioquímicos y radiológicos y que fue diagnosticado de síndrome anticolinérgico posiblemente medicamentoso. No obstante, su médico de cabecera, que había atendido el año anterior, varios casos similares confirmados como botulismo, solicitó el análisis microbiológico de un jamón casero sospechoso, en el que se aisló toxina botulínica tipo B. La evolución posterior de ambos pacientes fue favorable.

Hay formas fustres, paucisintomáticas, más frecuentes con la toxina de tipo B, cuyo clostridium es el más frecuente en Europa (Kauf y cols. 1974, Beauvals y cols.1976), en las que solo hay sintomas digestivos o deglutorios y mas a menudo oculares con visión borrosa, diplopía o fotofobia, que impide la lectura. La enfermedad puede progresar apareciendo disartria, disfonía, etc., y hasta parálisis. Alted y cols (1982) encontraron muy pocas escasas publicaciones en la bibliografía española desde 1965. Un brote interesante es el reseñado a continuación:

El caso índice era un paciente quién el 20 de diciembre comenzó a sentirse mal con molestias gástricas, ardores, dolor ocular y al dla siguiente tuvo nauseas. vómitos amarillentos. ptosis palpebral. pérdida de visión en el ojo derecho que posteriormente en el mismo dla se extendió al izquierdo. El día 22 le apareció disfagia, acompañada de pérdida progresiva de la formación y con este cuadro ingresa en el Hospital Clínico de Santiago de Compostela: A la exploración se le aprecia ptosis palpebral bilateral, disminución de la motilidad de los rectos, parálisis del velo del paladar con la úvula desviada hacia izquierda, intensa dificultad fonatoria, lengua seca, con acúmulo de secreciones en el paladar; estaba afectado el hipogloso pués los movimientos de la lengua especialmente los protrusorios estaban limitados; en cambio eran normales a la exploración los oftálmicos, los trigéminos, faciales, auditivos y glosofarlngeos de ambos lados. Estaban normales el sistema piramidal y los reflejos superficiales y los profundos. La clínica orientaba claramente hacia una intóxicación botulínica, lo que se comprobó posteriormente al encontrarse la toxina B en la sangre. Ante ello se hizo la encuesta epidemioIógica. El enfermo era un albañil de 23 años. casado con dos hijos. vecino de la aldea de Allo, Parroquia de Puente del Puerto del Ayuntamiento coruñés de Camariña. El enferno no había tomado en los dlas anteriores mas alimentos conservados que chorizo en una taberna de Cernés el día 19, una lata de sardinas en unión de tres amigos el dla 17 y un trocito de jamón el dla 18 en unión de un amigo. Se investigó a las personas que hablan comido estos alimentos y se demostró que ninguno de los que hablan eompartido el chorizo o las sardinas estaban enfermos. ni se encontró luego toxina de tipo B en los restos de aquellos alimentos. En cuanto al jamón procedía de una matanza doméstica efectuada por una familia de Allo, compuesta por el matrimonio y una hija. El cerdo del que procedla el jamón fue sacrificado en ayunas en el mes de agosto por un matarife

profesional del lugar sobre una mesa de cemento. y se empleó toda la earne para embutidos de consumo familiar. dejando solo un jamón, el incriminado. que fue curado del modo tradicional en la región. es decir salándolo y manteniendolo luego colgado en la cocina.

El jamón se comenzó a comer el 15 de noviembre y tenía buen sabor sin que se hubieran observado manchas verdes ni otras alteraciones organolépticas cerca del hueso. De ese jamón comieron diez personas. incluido el caso índice. que fueron hopitalizadas el 27 de diciembre, no sin resistencia por parte de algunos de ellos. El resumen de las historias cllnicas de los nueve comensales restantes es el siguiente:

Caso 2 J.S.P. de 33 años. En el momento del ingreso se encuentra bien y no se halla nada en la exploración clínica pero a los dos dlas empieza con visión borrosa. pupilas algo perezosas, que obligaron a su tratamiento específico.

Caso 3 M.S.C. de 31 años, esposa del anterior. Al ingreso sufrla visión borrosa de cerca que le impedía leer y escribir, costándole trabajo hablar; ha cambiado el tono de su voz, tiene sequedad en la boca y ligera midriasis. Diecinueve dlas antes del ingreso habla tenido un síndrome digestivo con estreñimiento, vientre hinchado y al día siguiente amaneció con distagia para líquidos y sólidos, lengua blanca y seca, visión borrosa de cerca sin diplopia que fue tratada con calmantes e irrigaciones pero como no mejoró fue vista por un oftalmologo; durante todo este tiempo la enterma continuaba comiendo jamón, hecho interesante, pues si no hubieramos atendido el caso índice la intóxicación acumulativa le hubiera ocasionado la muerte.

Caso 4 J.S.S. de 7 años y 9 meses. Hija de los anteriores. Ocho dlas antes del ingreso tuvo diarrea con heces semilíquidas, oscuras, no malolientes, sin vómitos ni tiebre, y enseguida ptosis, visión borrosa y sequedad de la boca con lengua blanquecina. Al ingreso, sequedad de boca, midriasis y paresia pupilar con tendencia a la midriasis y ptosis bilateral.

Caso 5.—C.C.L. de 55 años. Solo había tomado jamón una vez. Como antecedentes solo señala nauseas. Las pupilas estaban isocóricas reaccionando bien a la luz, siendo normal toda la exploraeión.

Caso 6.—M.S.C. de 29 afios. Tomó jamón el dla 21 a las seis de la tarde y el 22 por la noche. Notaba al ingreso sequedad de boca, visión borrosa, somnolencia, dificultad deglutoria a los alimentos sólidos, dolor retroesternal, sin alteraciones - digestivas ni respiratorias. No habla diplopia y solamente se apreció respuesta perezosa de las pupilas a la luz.

Caso 7.—J.S.C. de 24 años. Había comido jamón el 27 de noviembre y el 23 y el 25 de diciembre. Al ingreso visión borrosa sin diplopia y sequedad de boca, ligera midriasis y pereza pupilar

Caso 8.—S.S.P. de 9 años. Comió del jamón el 25 de diciembre. No presentaba signos, ni slntoma. alguno.

Caso 9.—J.C.L. de 53 años. El interrogatorio era díficil pues la pariente tenía un C.I. bajo. Comió varias veces del jamón, la última, 15 dlas antes del ingreso; en ese momento tenla sequedd de boca con disfagia para los sólidos.

Caso 10.—M.C. Comió jamón el 20 de noviembre. Se encontraba bien al ingreso sin sintomatología alguna con exploración normal.

Habia pues una familia afectada Una mujer (9) y su hermano (5) un hijo varón de este el nº 3, y dos hijos de este varon 3, mujer 7 y 6. Además la esposa de 3 el hijo de ambos el 4, y el hijo del 7 (8) Además se afectaron dos vecinos el caso índice y el 10.

Se investigó la presencia de toxina, inyectando a ratones de 23 g 1 y 0,5 ml. de suero,mezclados con las diversas antitoxinas y en otros con SS. No murieron los ratones a los que se inyectó suero de los casos 1, 4, 5, y 6 mezclado con antitoxina B muriendo los ratones inyectados con mezclas de suero con otras antitoxinas y con SS. Los animales inoculados con los sueros 2,3, 7 y 9 pervivieron pese a lo cual los consideramos como afectos de botulismo, dados los cuadros clínicos y el antecedente epidemiológico. En cuanto a los casos 8 y 1O sin s!ntomas ni signos específicos ni presencia de toxina, creemos que pudieran no haber padecido la intóxicación aún cuando por ejemplo el caso 8 pudiera estar incubando el cuadro. Por ello y por el gran riesgo que podría suponer no hacerlo, se trato a todos ellos con antitoxina A + B suministrada por el Instituto Pasteur de Par!s; los enfermos mejoraron inicialmente disminuyó la sequedad de boca, luego se normalizó la visión y la disfagia con

recuperación a los 10-12 días en que se dió de alta al ú!timo de paciente sin ningun fallecimiento.

Los jamones caseros proucen con cierta fecuencia intóxicaciones botullnicas.

Se puede pensar con bastantes visos de realidad que existen mas brotes de intóxicación botulinica que los que se diagnostican, que corresponden a cuadros. ambulatorios similares a lo. descritos que evolucionan espontaneamente hacia la curación Hay que tener en cuenta que en alimentos como el jamón es muy irregular la producción de toxina en las diversas zonas, las cantidades ingeridas y el número de ingestiones. Este hecho explicaría la diferente afectación clínica de los afectados en un mismo brote.

Destaca en este brote familiar el que solo solicitó atención médica el caso índice y el número 3, que solicitó atención oftalmológica por visión borrosa.

Puede pensarse que la parte más externa del jamón no contuviera toxina como es lo habitual, y que las intóxicaciones comenzaron cuando se estaba más cerca del hueso, pero al menos el caso 3, ya tenía síntomas 19 días antes del ingreso, y el 4, ocho días, lo que indica un origen anterior de la intóxicación que iba evolucionando durante dlas sin ser diagnosticado y tratado adecuadamente, al menos en varios componentes del grupo.

En 1.973 se produjo un brote, de botulismo B, estudiado por algunos de nosotros en La Coruña, debido a un jamón casero procedente de Lugo, que causo dos casos familiares uno de los cuales falleció al cabo de siete meses como consecuencia de las secuelas y de la traqueotomía y neumonía aspirativa motivadas por la parálisis respiratoria.

Forma crónica del botulismo

Se debe a la reiteracion de la ingesta de pequeñas cantidades de toxina. En 10 cantones suizos enfermaron entre julio y agosto de 1.973 48 personas, con un cuadro benigno que evolucionó durante muchas semanas con presencia de toxina en suero en 19 casos, debida a Ia ingestión

de queso «Bris» importado, aunque en las 76 muestras de queso, recogidas no se encontró la toxina. Se ha obtenido botulismo crónico por inyeccion de cantidades mínimas de toxinas en un músculo de modo que escape solo una mínima cantidad, insuficiente para causar alteraciones fuera del lugar de la inyección. En los animales con botulismo agudo, las terminaciones nerviosas no muestran anomalías (Harris y col. 1971) y responden a la acetilcolina pero en el crónico, presentan las mismas lesiones que los nervios cortados mecánicamente y no responden a la acetilcolina. Segaert y cols (1945) comunicaron el caso de dos hermanos que desarrollaron un botulismo subagudo de origen indeterminado, cuyo suero contenía una toxina que se netralizaba con la antitoxina A + B. Los síntomas fueron moderados recuperándose a los dos meses. Curiosamente los pacientes desarrollaron rechazo a bebidas alcohólicas.

Botulismo del lactante

Arnon y cols. (1979), creen que ya en 1931 se habían presentado casos de botulismo del lactante sin haberse identificado como tales. Se conoce su existencia desde 1967 gracias a los estadounidenses Jackson Picket y Bruce. En 1976 Pickett con Berg y sus colaboradoes publicaron una magnífica descripción del cuadro. Arnon logró reunir una casuística de 26 menores de un año, que enfermaron entre los 14 y los 351 días de vida, por haber comido miel que contenía entre diez y cien esporas (Pickett y cols. 1976). Desde entonces se han notificado en USA unos 1.300 casos. Entre 2002 y 2003 se produjeron entre los 443 residentes de Staten Island, distrito de la ciudad de New York, cuatro casos, o sea una incidencia del botulismo infantil de dos casos por cada 100.000 nacidos vivos (MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 52: 21 4;2003). Su incidencia está aumentando mientras que el botulismo intestinal practicamente queda reducido a los consumidores de conservas caseras. La mayoria de los 10-20 casos anuales de botulismo que se presentan actualmente en Alemania son del lactante. Turner y cols. (1978) describieron el primer caso en Inglaterra; era una niña de 24 semanas que bruscamente presentó fiebre elevada; a los 7 dias debilidad generalizada ptosis, oftalmoplejía, paresia facial, en cuyas heces se aisló el C. botulinum.

Así como el botulismo clásico es una intoxicación, el del lactante es una toxiinfección semejante a la salmonellosis, pues no se debe a la to-

xina ingerida con los aIimentos, sino a la producida por el bacilo en el intestino. Las esporas llevadas por el viento a los panales o desde el suelo por los artejos de las abejas contaminan la miel, la cual al ser ingerida son inhibidas por la acción de las bacterias intestinales y eliminadas, pero si la actividad de la flora intestinal es baja como ocurre en los lactantes las esporas germinan y sus bacilos producen la toxina que se absorbe por el intestino causando la intoxicación. La mayoria de los casos del lactante se deben al serotipo E. seguido de los serotipos A y B, habiéndose señalado un caso por el F; Arnon y cols. (1977) tres de seis casos de botulismo en lactantes se debio al tipo A y los otros tres al B.

Suele tratarse de niños de 3 a 24 meses, disminuyendo su incidencia hasta el año, debido a conservas vegetales, aunque algunos casos se presentaron en niños lactados al pecho, como el caso de Middaugh, cuya madre desarrolló un botulismo grave. Muchos trabajos han demostrado que la ingesta de miel es factor de riesgo del botulismo infantil; por ej, la epidemia en lactantes hijos de Mormones de California cuya base alimenticia era la miel. Jung y col. (2001) informaron de un botulismo en un lactante de 5 semanas que ingresó con parada respiratoria. El niño había tomado miel durante dos semanas encontrándose la toxina en su suero y en heces asi como en la miel. El niño necesitó durante 7,5 meses ventilación asistida. Se han encontrado en USA muestras de miel con C. botulinum y con toxinas lo que ha llevado al CDC a desaconsejar la administración de miel ni siquiera como edulcorante, a los menores de 12 meses. (Tanzi y cols. 2002).

La administración de miel con diez esporas a ratones criados cell-free bastan para que se produzca el desarrollo de la bacteria en el intestino pero en ratones normales se requiere hasta un millón de esporas. (Arnon y cols. 1946) En los animales adultos el C. botulinum no coloniza en su intestino.

En esta forma clínica se encuentra el Cl. botulinum y su toxina en las heces en las que persisten al menos 70 días y toxina en el suero entre 3 y 10 días (Paton y cols. 1983). Muchas cepas de los serotipos causales, dadas por vía oral son cinco veces más tóxicas para el ratón de 8 a 10 días que para el adulto en el que no se logra la colonización. Se sabe que las toxinas B pueden ser 500 a 5000 veces más tóxicas para el lactante que para el adulto. Es posible que haya diferencias microbiológicas en cuanto a la posibilidad de producir botulismo intestinal.

El cuadro se inicia con estreñimiento. que puede pasar inadvertido. Al cabo de 1 a 30 días, aparecen los síntomas neurológicos caracterizados por disminucion de la succión de Ia mama o del biberón, llanto, cuya intensidad se va debilitando y cambiando de tono, letargia. Se desarrolla progresivamente debilidad muscular generallzada e hipotonía, que se manifiesta por pérdida del control de la cabeza, asemejandose el niño a un muñeco. El niño se va debilitando, tiene hiporeflexia, anomalías de nervios espinales y bulbares, come mal y poco y se deshidrata. Los alimentos y secreclones se acumulan en la faringe posterior y el reflejo del vómito está dismlnuido. Normalmente existe ptosis, monoplejía y expresión facial fláccida. Sin tratamiento puede progresar rápidamente hasta el fallo respiratorio. Anderson y cols (2002) revisan retrospectivamente 60 casos de botulismo del lactante tratados en hospitales, durante 1987 a 1997. El 61,7%, necesitó intubación endotraqueal una media de 21 días, sin que ninguno necesitara traqueostomía. El 13,5 % presentó complicaciones de vías aéreas como estridor,estenosis subglótica, formación de granuloma. Krishna y col. (2001) describen dos niños que tuvieron un cuadro de sepsis por lo que se les trató con ampicilina y con gentamicina; al aparecer síntomas neurológicos se demostró que tenían botulismo, pensando que la gentamicina pudiera haber potenciado el cuadro neurológico, por lo que proponen cambiar en estos casos, la gentamicina por la cefotaxima.

Suele ser benigno, posiblemente por la escasa cantidad de toxina absorbida. El botulismo pudiera ser la causa de algunos casos de muerte súbita del lactante. Arnon y cols. (1978) encontraron entre 280 casos de muerte súbita en menores de un año diez que tenían el C. botulinum en el intestino delgado y en dos la toxina. Bohnel y cols. (2001) en 75 casos de muerte súbita en menores de 12 meses recogidos durante cinco años, encontraron que 9 tenían toxina libre y seis el Clostrodium botulinum. Sonnabend y cols. (1985) encontraron la toxina en el intestino de 9 niños entre 59 que tuvieron muerte súbita; ocho de estos niños tenian toxinas y bacterias de los tipos A, B, C, E y G en yeyuno o colon y cuatro de ellos tambien en suero sin encontrar toxina ni bacterias en 29 niños que murieron súbitamente. La toxina mas encontrada en estos casos ha sido la E. Sugerimos que en los casos de muerte súbita infantil se investigue el botulismo. Debe estudiarse bien este problema pues se encuenttra a veces la toxina en el intestino de niños sin botulismo.

El tratamiento se basa en controlar la alimentación y la respiración hasta que se hayan regenerado las placas motoras.A veces quedan secuelas neurológicas especialmente hipotonía. Algunos niños necesitan tomar los alimentos por medio de sonda.

Puede haber concomitantemente con el botulismo del lactante, colitis debida a la toxina del Clostridium butyricum tipo E. En Italia se han publicado seis casos desde 1984 y seguramente en otros paises.

Botulismo por heridas o por inoculación

Es un cuadro excepcional causado por la germinación de la espora que entró en heridas en las que hay anaerobiosis. El periodo de incubación más largo que el alimenticio es de 4 a 18 días, tiempo durante el cual la espora debe germinar y permitir al bacilo producir suficiente toxina, del mismo modo que lo hace el Cl. tetani. pero es dificil de determinar ya que se ignora cuando se contaminó la herida. Suele haber fiebre pues la herida suele estar infectada por aerobios que proporcionan anaerobiosis al C. botulinum. El proceso puede aparecer sin que haya una infeccion manifiesta de las lesiones El cuadro es semejante al de la intóxicación alimenticia, pero sin síntomas gastrointestinales.

En Estados Unidos se declararon 8 casos anteriores a 1972 y 10 entre 1.973 a 1.977 de ellos 5 en 1.974 cuya cllníca es igual que la alimentaria pero sin vómitos, (2 por A; 6 por B y 2 no identificados). Esta forma clínica, debería ser mas frecuente ya que a diferencia del tetanos la población no esta vacunada fenómeno que se atribuye a que las esporas germinan poco en las heridas o a que el C.sporogenes u otras bacterias interfieran con la producción local de tóxina. Keller y cols. (1982) presentaron el caso de un niño de seis años con sordera congénita quien sufrió fractura ulnar izquierda y del radio, por lo que se le aplico cefalosporina sin que hubiera infección clínica pero el cultivo demostro numerosas bacterias entre ellas C.botulinum. El suero contenía toxina que originó botulismo del que se recuperó a los 46 días.

La herida causada por la inyección de un medicamento, fue la causa del 75% de los 20 casos estudiados por Sandrock y cols. (2001). Este tipo

de botulismo ha aumentado por la drogadicción por vía venosa, el«black tar», pero también por la muscular o subcutánea como los dos casos de Mulleague y cols. (2001) en cuyas heridas penetra el esporo.

Sawalha (2001) comunicó un caso de botulismo en un heroinómano y Chang y col. (2003) estudiaron siete casos de botulismo por heridas en 'skin poppers' que presentaron oftalmoplejía y parálisis descendendente. La administración de antitoxina antes del cuarto día permitió una rápida recuperación siendo peor en los que se tardó más de cuatro días y aun en los que se le puso pasados ocho días.Rundervoort y cols. (2003) estudiaron a una heroinomana de 38 años que se inyectaba la droga subcutaneamente que presentó vision borrosa, disartria y disfagia. Al día siguiente no podia deglutir ni hablar y tenía debilidad en las cuatro extremidades y fallo respiratorio,anomalías electromiográficas del tipo de déficit de la transmisión presináptica neuromuscula. La puerta de entrada fue probablmente un absceso cutáneo debido a las inyecciones. Se recuperó bien con la antitoxina y antibióticos. Si en un herido aparece una parálisis que desciende rapidamente con sensorio lúcido hay que pensar en botulismo. La mayoria de los casos de EE.UU. se dan en California (Mitchell y cols. 2001). En el botulismo por inyecciones de heroína son menos frecuentes los abscesos que por otros traumas.

Botulismo por inhalación

Es posible la intoxicación con la toxina botulínica a través del aire. En 1962 enfermaron tres personas que en un laboratorio alemán habian hecho la autopsia de animales muertos por botulismo de tipo A. A los tres días de la exposición presentaron obstrucción mucosa de la garganta, dificultad de tragar sólidos y sintomas catarrales sin fiebre. Al día siguiente el cuadro fue mas grave quejándose de entumecimiento, insensibilidad mental, paresia de músculos oculares, ligera midriasis, discreto nistagmus rotatorio, habla confusa, marcha insegura y gran debilidad. Se les administró antitoxina el 4º y 5º día, con la que mejoraron a partir del 6º al 19º día, quedándoles solo ligera debilidad general. En el exudado nasal, reogido con un hisopo puede encontrarse por ELISA la toxina.

Diagnóstico

La presentación de varios casos de parálisis bulbar descendente y en algunos casos la parálisis de músculos esqueléticos en pacientes afebriles debe hacer pensar en el botulismo. En general no se requiere hacer diagnóstico diferencial pues la clínica es muy evocadora de botulismo. La parálisis tetánica es espástica mientras que la botulínica es fláccida; la atropínica (ingestión de belladona, datura etc.) se acompaña de trastornos psíquicos y no hay oftalmoplegía. Ante la coincidencia de presentarse en consumidores de alimentos en común se debe hacer el diagóstico diferencial con las toxinfecciones alimentarias, de las que la separan el estreñimiento, la ausencia de fiebre y la incubación corta. También debe diferenciarse del Guillian Barré, de la miastenia gravis, de la intoxicación con monóxido de carbono: en la polineuritis diftérica hay disfagia, parálisis de los miembros con trastornos sensitivos; paralisis oculares que no modifican la acomodación, pero destacan la angina y la parálisis del velo del paladar. Las apendicitis, colecistitis y la oclusión intestinal cursan con dolor vómitos y meteorismo. En la intoxicación por Amanita phalloide hay sudoración profusa,adinamia fiebre, a menudo convulsiones y hemolisis con ictericia. La mitilotoxina causa disfagia y parálisis pero no hay signos atropínicos ni oftalmoplegias. El talio causa hiperestesias difusas especialmente en plantas e hipertensión. El metanol causa trastornos digestivos con vómitos, cólicos, alteraciones psíquicas y oculares con disminución de la agudeza visual pero no hay parálisis oculo-motora, sequedad de boca ni disfagia.

Es excepcional aislar las esporas en el jugo gástrico y en las heces de los enfermos y de los comensales; raro aislar el bacilo de la sangre. En la autopsia se debe buscar el bacilo en ganglios meséntéricos, hígado intestino y cerebro, En el botulismo por inhalación se pueden encontrar en el exudado nasal las esporas. La prueba básica es la demostración de la toxina, en el vómito, en el contenido gástrico y en las heces medios en los que es raro encontrarla pero sobre todo en el suero por la inoculación a animales de laboratorio (prueba del ratón protegido) o por ELISA, aunque a veces su escasa cantidad hace que las pruebas sean negativas. (la adición de tripsina activa en algunos casos a la toxina, y permite detectar cantidades ínfimas).

Prevención

El saneamiento del medio exige recoger los cadáveres de animales especialmente los de estanques, marismas etc. para disminuir los focos de putrefación que permiten que las bacterias que puedan contener creen un ambiente anaerobio en el que germinen las esporas de los anaerobios produciendo toxinas e incinerarlos y mantener limpias los marismas y similares.

La prevención se basa en evitar la contaminación de los alimentos con tierra o con contenido intestinal de animales eliminando las partes dañadas. Higiene de manipuladores. Consumir o conservar las frutas y las legumbres inmediatamente después de haber sido recolectadas, lavándolas abundantemente; las legumbres se deben blanquear. Los animales deben mantenerse con dieta hidrica de 24 horas antes de ser sacrificados para permitir que las defensas orgánicas hayan destruido los germenes que hayan pasado a sangre y músculos durante la digestión. Las conservas enlatadas deben tratarse por combinación de calor durante mayor tiempo que las formas vegetativas y potenciado por un pH menor de 4,5 en el que si quedaran esporas no podrían proliferar y una actividad de agua (Aw) inferior a 0,95 que impide la germinación. A ello colabora, la adición de menos de 100 ppm., de nitrito sódico bacteriostático para el C. Botulinum, mas la de cloruro sódico.

Todo lo anterior explica que, en una industria alimentaria que posea una tecnología correcta, los casos de intoxicación botulínica debidos al consumo de sus productos sean prácticamente nulos.

La industria conservera permite la vigilancia y control de su funcionamiento. Deben emplearse ténicas higiénicas, recipientes estériles, esterilización de las conservas envasadas calentándolas a una temperatura que impida la germinación de las esporas, correcto empleo de aditivos como los ácidos ascórbico, isoascórbico, acético, sórbico etc., la concentración de azúcares, la salazón, los nitritos, y en su caso la fermentación ácida. Los plásticos empleados para champiñónes y otros alimentos frescos deben tener orificios para evitar la producción de toxina. La conservación por radiaciones ionizantes evita el desarrollo de la espora botulínica. Las semiconservas deben mantenerse en ambiente fresco. La refrigeración a 4-5ºC detiene la multiplicación de los clostridios y la producción de toxina.

No deben obtenerse conservas caseras que en su caso deben introducirse en envases estériles y calentadas con vapor a presión (120ºC bastan 2,5 minutos, pero es mas seguro prolongar el calor 30 minutos).

Como precaución adicional deben desecharse las conservas en las que haya gases (abombamiento de las latas o la salida de gas a presión de ellas y de los frascos. La mayoria de las veces este gas sera hidrógeno procedente del ataque ácido de la hojadelata y hay que tener en cuenta que el C. botulinum no siempre produce gas. Las latas abombadas sospechosas de contener toxina, deben abrirse para toma de muestras, debajo de un embudo invertido para evitar proyecciones que pueden ser graves. No deben comerse las conservas que huelan a manteca rancia u otra alteración organoléptica causada por las bacterias proteolíticas. Finalmente la cocción o el escaldado (90ºC diez minutos u 80ºC. 30 minutos) de toda la masa de los alimentos antes de consumirlos, destruye a las toxinas, aunque persistan las esporas; es una precaución importante para los alimentos sospechosos.

Vacunas

Fueron los científicos de Fort Detrick, los Drs. Frederick y Maryland quienes en los años 1950 transformaron la toxina cruda en toxoide, por la técnica de Ramon.La anatoxina se puede valorar, como se hace con la toxina por ELISA y por el test de neutralización, adsorbiéndola luego en sulfato alumínico, repartiendo 0,1 ml del toxoide en 1 ml. Bastan dos dosis, separadas 10 semanas y una tercera al año; Torii y cols. (2000) protegieron a cuatro personas con tres dosis repartidas en nueve meses. La respuesta es mayor si se aumentan las dosis. La pauta habitual es semejante a la de las anatoxinas diftérica y tétanica, 0, 2, y 12 semanas con booster al año. A los tres meses el 79% de los vacunados tiene títulos superiores a las 0,25 UI por ml, nivel que se considera protector, pero al año casi ninguno tiene anticuerpos detectables; la inyección de recuerdo determina una importante respuesta secundaria en el 90% de los vacunados. La vacuna es específica de serotipo. Apenas se presentan reacciones adversas y al igual que las otras vacunas a base de toxoides se considera muy segura. Solo el 35% de los 8.000 vacunados antes de la Guerra del Golfo en febrero de 1991 señalaron dolor local seguido de hinchazo y dolor en el brazo que persistió 2 a 4 días reacción igual a la que produce el toxoide tetánico.

Además de las vacunas monovalentes contra las tóxinas A a E, las hay divalentes A+B, tetravalente obtenida primeramente en 1963 por Alexandrov de la Academia medico-militar de Leningrado y otra pentavalente con los tipos A,B.C.D y E aún no disponible. La «Investigacional New Drug» de USA con autorización de los CDC de Atlanta ensayan posibles vacunas, como las recombinantes que podrían proteger contra todos los serotipos.

Lee y cols (2001) obtuvieron una vacuna contra la toxina botulínica A (BoNT/A) usando como vector replicón el virus de la encefalitis equina venezolana, en el que se sustituyeron los genes codificadores de proteinas estructurales con un gen inmunogénico heterólogo situado mas allá del promotor subgenómico 26S, codificador del fragmento atóxico de 50 kDa carboxi terminal (H(C)) de la cadena pesada BoNT/A. La cotransfection de células BHK in vitro con el replicón H(C) y dos moléculas de ARN helper, una de las cuales codifica todas las proteinas estructurales del virus de la encefalitis equina venezolana; el resultado es la producción y liberación de partículas del VEE defectivo con el replicón. Las células infectadas con (H(C) VRP) expresan esta proteina. La vacunación subcutánea del raton con varias dosis de H(C) VRP, los protege de la inyección peritoneal de más de 100.000 DL_{50} de BoNT/A, al menos durante un año.

Se ha obtenido una vacuna a partir de fagos que contienen el dominio de unión de la neurotoxina botulínica del serotipo A. Amersdorfer y cols. (2002) estudian los anticuerpos scFv cuyos epitopos se unen al dominio HC de la BoNT/A; muy pocos epitopos de scFv conformacionales, reconocen el dominio HC de la BoNT/A; estos epitopos pueden ser del grupo I, que neutraliza a la toxina en el test del hemidiafrgma del ratón; en los otros 10 grupos los anti dominio HC de BoNT/A no neutralizan a la toxina a concentraciones biológicamente significativas. La vacuna pentavalente solo produce anticuerpos frente a unos pocos epitopos immunodominantes situados en la zona de unión el dominio HC.

Wu y cols. (2001) identificaron los anticuerpos monoclonales BT57 1 y el BT150 3, que protejen al ratón ICR contra dosis letal de BtxA, cuya actividad neutralizante es respectivamente 10^3 y 10^4 veces mayor que la DL_{50}. El inmunobloting, demuestra que BT57 1 reconoce a la cadena L y el BT150 3 a la H de BTxA.

Dada la poca frecuencia del botulismo no es necesario vacunar sistemáticamente a la población, reservándola para los expuestos profesionalmente a la toxina. Tal vez tambien en casos excepcionales de intoxicados con la toxina que siguen recibiendo toxina, repitiendo la administración a los 8 días, pues en ellos, como pasa con los enfermos de tétanos, la cantidad de toxina ingresada es insuficiente para provocar la respuesta inmune. La vacunación masiva ser plantearía en caso de amenaza terrorista o militar restringiendola a los que pudieran ser objetivos. Los americanos vacunaron a unos 8.000 militares que intervinieron en la Guerra del Golfo Pérsico. En todo caso hay que disponer de reservas vacunales. Preparan anatoxinas el Pasteur de París y el CDC. En cualquier caso esta amenaza obliga a tener reservas de vacuna, especificanente de los serotipos A, B, C, D y E.

Si se produce una exposición aérea a la toxina, se debe inyectar antitoxina, lo mas inmediatamente posible,sin esperar a realizar test de sensibilidad. Es díficil disponer de reservas de antitoxina, distribuidas convenientemente. Debe studiarse su aplicación por aerosoles.

La respuesta eficaz a una agresion deliberada con toxina depende de la rapidez al hacer el diagnóstico, en la infiormación de los casos y de la inestigación epidemiológica

El tratamiento se basa en:

1.º Evitar la fijación de la toxina. Si el alimento contaminado se ha ingerido poco antes de haber hecho el diagnóstico o si continuó la ingesta se debe hacer un lavado gástrico, o administrar un emético y enemas copiosos y un purgante aunque hayan transcurrido varias horas, salvo si el pacienle tiene un ileo paralítlco, para facilitar la eliminación del tubo digestivo de la toxina no absorbida.

2.º Neutralización de la toxina sin fijar en el SN. Aunque la unión de la toxina a sus receptores es lenta, la fijación de toda la toxina circulante, tarda semanas en la mayoria de los casos cuando el paciente es diagnósticado, casi toda la toxina está fijada sin que la pueda desalojar la antitoxina. La toxina aun no fijada, se puede neutralizar por la antitoxina que debe inyectarse lo antes posible. En el rhesus y probablemente en el hombre es de poco valor si se inyecta después de las 24 horas de

la exposición. Se debe poner antitoxina monovalente o en su defecto polivalente 1 ml subcutáneo repitiendo con 2 ml a los 8 días y otra al mes. Si no se dispone de antitoxina especifica, caso frecuente con el serotipo E, se pueden administrar los anticuerpos por seroterapia. Sandrock y cols. (2001) encontraron en veinte pacientes ingresados consecutivamente desde 1991 a 1998 con botulismo por heridas, que el 57% de los pacientes a los que se les puso antitoxina antes de transcurridas 12 horas de aparecer la clínica requirió ventilación asistida durante 11 dias, de media, proporción que fue del 85% en los que la recibieron después de las 12 horas durante 54 días de media, es decir que la administración precoz de la antitoxina disminuye la necesidad y duración de la ventilación mecánica reduciendo las traqueotomías y el tiempo de mantenimiento de estas. La administración tardía de la antitoxina es de poco valor y al aplicarla seguimos la rutina y la medicina defensiva. La antitoxina se debe tambien administrar a las personas que hayan consumido el alimento contaminado o que se hayan expuesto a aerosoles, aunque estén sin síntomas. Si no se ha identificado el tipo de toxina que produce el cuadro se utllizará antitoxina trivalente (anti-A. B y E). Se dispone de suero monovalente antl-E y bivalente anti-A y B.

La antitoxina se obtiene inyectando toxoide con adyuvante que puede ser el de Freund, al caballo (valdria otro animal), desespeciando el suero. El Pasteur y los CDC obtienen antitoxinas mono y polivalentes. La unidad antitóxica es la menor cantidad de inmunoglobulina que neutraliza 100 DL mínimas para el ratón. Al tratarse de suero de caballo se puede presentar una reacción anafiláctica de tipo I,si el paciente ya ha recibido en algun momento de su vida suero de caballo aunque sea contra otro proceso. Para evitar esta reacción de debe inyectar intradérmicamente 0,1 ml de una dilución al décimo de la antitoxina y si a los 20 minutos no ha habido reacción local se puede inyectar 10 ml de antitoxina intravenosa lentamente durante mas de 20 minutos; la inyección se puede repetir. En caso de que se hubiera producido la reacción dérmica se irán inyectando fracciones de 0,01 a 0,1 ml de antitoxina subcutáneamente aumentando la dosis cada 20 minutos hasta un máximo de 2,0 en un inyección. En cualquier caso hay que tener preparada ampollas de adrenalina y de urbasón. Menos frecuente y grave es la provocación de la enfermedad del suero,debida a hipersensibilidad de tipo III. Estas reacciones se evitan empleando inmunoglobulina humana obteni-

da del suero de voluntarios vacunados, pero es imposible obtener cantidades grandes que, en todo caso, sería un proceso largo y caro. Se está ensayando neutralizar al receptor de la toxina con anticuerpos monoclonales.

3.º Activar la salida de acetilcolina de la presinapsis. La 4 aminopiridina y la 3,4 diaminopiridina, son fármacos anticurare, que acrecientan los potenciales de acción, bloqueando la salida de potasio y aumentando la permeabilidad para el calcio favoreciendo la exocitosis de la acetilcolina especialmente en la placa. El hidroclorhidrato de guanidina, usado para la miastenia, a dosis de 10 a 50 ´mejor entre 15 y 25 mg/kg, también estimula la exocitosis sináptlca de acetilcolina; se tolera bien pero puede presentar efectos secundarios y sus resultados son dudosos e inconstantes. Ball y cols. (1979) comunicaron un éxito limitado en el tratamiento de intoxicados con la toxina A, Dock y cols (2002) comunicaron el caso de una mujer de 69 años, que a raiz de una comida presentó alteraciones digestivas seguida de parálisis de varios pares craneales,del sistema nervioso autónomo y de la ventilación que requirió ventilación mecánica e intubación traqueal a la que la administración de 3,4 diaminopiridina determinó mejoria progresiva. Estos fármacos provocan reacciones adversas y no se han hecho ensayos controlados.

Se trabaja sobre quimeras entre la secuencia de la toxina que se une al receptor unida a anticuerpos monoclonales y sobre drogas neutralizantes de las toxinas botulínicas (y de la tetánica) internalizadas en las células eficaces, in vitro, o inyectadas en células, pero no actúan si se adicionan extracelularmente pues no atraviesan la membrana plasmática.

4.º Penicilina o cloramfenicol para inhibir los bacilos que pudieran haber quedado en el intestino.

5.º Si el enfermo presenta signos neurológicos, lo que ocurre en la gran mayoría de los casos, es necesario ingresarlo en una unidad de cuidados intensivos pera vigilar las funciones respiratoria y cardiaca. Cuando exista afectación bulbar o respiratoria, se efectuará una traqueotomia e intubación y las medidas auxiliares respiratorias necesarias. Además se debe desinfectar la conjuntiva, nariz y orofaringe varias veces al día, aerosolizar la habitación con vapor de agua, sondar asepticamente la veji-

ga, suprimir los alimentos en tanto pesistan las alteraciones deglutorias. Con una buena atención la letalidad es inferior a 5.

6.º En el botulismo por heridas se desbridará e irrigará esta para disminuir la contaminación y la anaerobiosis y se administraran antibióticos para destruir al bacilo de la herida, en general penicilina o tetraciclina o cloranfenicol si hay alergia a la penicilina. Los antlbiótlcos impiden la producción de toxina in vivo en el tubo intestInal, causada por los bacilos germinados de las esporas. Sandrock y cols. (2001) encontraron en veinte pacientes ingresados consecutivamente desde 1991 a 1998 con botulismo por heridas, que los pacientes que recibieron antibióticos en las primeros doce horas requirieron ventilación mecánica durante 35 días mientras que en los que se les puso después de las 12 horas fue de 54.

7.º En el botulismo intestinal se deben administrar antibióticos.

La toxina botulínica en guerra y en el terrorismo

Nunca se ha empleado la toxina botulínica en guerra. En 1943, los servicios de inteligencia británicos informaron que los alemanes estaban considerando bombardear Londres con las V-1 conteniendo toxinas. Ante ello los profesores Fred y Baldwin de la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. bajo los auspicios del ejército, organizaron en Camp Detrick, posteriormente Fort Detrick, un laboratorio para investigar este problema, En este laboratorio Carl Lamanna obtuvo la toxina botulínica A, con una fracción tóxica de 150.000 dalton, unida a otra fracción no-tóxica de 750.000 dalton que la protegía de la digestión enzimática en el intestino Los servicios americanos de inteligencia descubrieron que los alemanes habían obtenido toxina botulinica para evitar el paso del Canal de la Mancha de los aliados. El RU solicitó a Canadá que le proporcionaran varios cientos de miles de dosis de anatoxina botulínica que se guardaron en Inglaterra para un posible uso por las fuerzas que iban a desembarcar en Normandía, sin que llegaran a ser empleadas. En 1972, Estados Unidos, una de las naciones firmantes de la Convención de Armas Biológicas y Toxinas, anunció, que ponía término a la investigación en este campo, de modo que el presidente Nixon ordenó cerrar Fort Dixon para estos fines.

En diciembre de 1990, un mes antes del inicio de la Guerra del Golfo, Irak había desplegado en aeropuertos y en bases militares unas 200 armas biológicas incluyendo misiles Scud con cabezas conteniendo esporas de carbunco, toxina botulínica y aflatoxina, y en bombas de aviación. Irak, después de años de negar que tenia un programa de agresivos biológicos reconoció en 1995, como consecuencia de la defección de Kamal, yerno de Saddam Hussein, a cuyo cargo estaban los programas de armas especiales; huido a Ammán,se dejó convencer por su suegro y regresó a Bagdad en donde fue asesinado. Iraq reveló a la ONU que había producido en Al Hakan, Daura Foot, en la ciudad de Salman Pak 13.800 litros de toxina botulínica concentrada y 8.575 litros de esporas de carbunco, 2.200 litros de aflatoxina, y una cantidad indeterminada de Clostridium perfringens.

En previsión de un agresión con estos agresivos se vacunó a unos 8.000 combatientes de la Coalición Internacional entre el 23 de enero y el 28 de febrero de 1991 contra algunos gérmenes entre ellos el B. anthracis, sin que tengamos constancia de haberse empleado la antibotulínica.

En el aeropuerto de Tel Aviv se proveyó a los viajeros de máscaras antigas ante la eventualiadad de un ataque químico o microbiológico por parte de Irak. Sadam Hussein se comprometió a la destrucción de estos agresivos (así como la de los químicos) pero Rolf Ekeus, presidente de la Comisión de NU informó al Consejo de Seguridad el 26 de agosto de 1995 sobre su gran preocupación porque «pudieran estar escondidos algunos agentes biológicos» Los arsenales iraquies fueron destruidos por UN en 1996. Después de su rendición, en la I Guerra del Golfo, Irak continuó desarrollando su programa de armas biológicas, engañando a los inspectores que en 1999 estimaban que se habían destruida parcialmente.

Aunque la toxina botulínica, es de origen biológico desde el punto de vista de su aplicación bélica es como las demás toxinas un agresivo químico y como tal la consideramos en este estudio. Sus carácterísticas son: Elevadísima toxicidad; 40 g distribuidos equitativamente podrían matar a la mitad de la humanidad, quedando el resto incapacitado. Su obtención es fácil y barataasi como su transformación en agresivo su «weaponización». Relativamente estable, en el aire, agua o alimentos. No afecta a recursos ni a las cosechas, ni a los bienes, construcciones ni a las subestructuras. Es, pues lógico, que pudiera ser empleada como agresivo químico. Es el «agente X» del argot militar.

El método más probable para el empleo de la toxina botulínica en la guerra es la dispersión en el aire de la misma toxina o la de sus complejos u agregados de diferentes tamaño, en un soporte líquido o sólido como las sales de bismuto; La exposición a una nube suficientemente densa de toxina botulínica mataria al 50-80% de los expuestos al cabo de unas horas a tres días, quedando el 18-40% muy afectados y solo el 10% mantendria disponibilidad para el trabajo o el combate y un efecto similar ocurriría en los animales.

La inhalación de la toxina ha causado algunos casos de botulismo inhalatorio. Franz y cols. (1993) expusieron a rhesus a la inhalación de cinco a diez DL_{50} de toxina A que les causó paresia de los músculos del cuello y discreta de otros músculos, ptosis intermitente, rinorrea que les obligaba a respirar por la boca, disfagia, salivación y anorexia muriendo a los dos a cuatro días pese a haberles administrado toxoide y globulina hiperinmune 12 a 18 horas antes de la muerte. En Canadá se regaron desde aviones toxina botulínica, extensas zonas en las que se habían situado numerosos animales, que absorbieron por las mucosa conjuntival, nasal, bronquial e incluso por la piel. A las 6 a 48 horas aparecieron los síntomas típicos y la muerte a los 3 a 8 días de todos ellos, salvo los vacunados. La concentración letal en el aire es de 0,02 mg-min, necesitando los supervivientes varias semanas para recuperarse.

El empleo agresivo de la toxina por vía aérea causaría un grave fallo respiratorio, asociado a aumento permeabilidad vascular, hemolisis, trombopenia y lesión hepática; si se afectan muchas personas sería dificil tratarlas adecuadamente, por la escasez de antitoxinas y de la aplicación de la respiración asistida para evitar la muerte por parálisis respiratoria. Habria que disponer de depósitos de antitoxina y asumir el riesgo de las reacciones anafilácticas y de la enfermedad del suero

Deteccción de la toxina botulínica en el aire

El diagnosticar el botulismo en un ataque es dificil salvo que se disponga de información del posible empleo. Puede alertar la aparición hacia las ocho horas de un ataque, de varios o muchos pacientes con parálisis bulbar sin convulsiones, que lo diferencia del ataque con

organofosforados. Otras toxinas pueden causar cuadros semejantes como el veneno de serpiente en la que hay el antecedente de la mordedura, aunque se puede obtener el veneno por ingeniera genética y ser empleado masivamente por diseminación aerea. La confirmación se hace facilmente por el «enzyme-linked inmunosorbent assay» del exudado nasal tomado dentro de las primneras 24 horas de la agresión.

Terrorismo

Es tambien posible el uso terrorista, mediante la introducción en el mercado de conservas contaminadas naturalmente con la espora o bien contaminando alimentos especialmente los que se consumen sin calentar con la toxina. La toxina podria distribuirse en los abastecimientos de agua de cualquier dimensión por sabotaje o por bombas. En 1975, la República Federal Alemana cedió al chantaje que les amenzaba con introducir en las canalizaciones carbunco y toxina botulínica. No hay datos sobre posible inactivación de la toxina A en el agua, aunque algunos dicen que si está quieta y fría la toxina A resiste una semana; los contaminantes y sobre todo la oxidación y el cloro, destruyen pronto a la toxina pero parece que la potabilización habitual no la hace desaparecer. Se intentan obtener toxinas resistentes a los potabilizadores. La depuración del agua por ósmosis inversa retiene entre otras toxinas a la botulínica. Tomando como dosis letal la de 5 μg (algunos la estiman en 1μg) de toxina botulínica el agua debería tener por 100 ml (vaso de agua) esa cantidad o sea para un depósito de un millon de litros 50 g de toxina pero para asegurar que cada 100 ml tuviera los 5 μg habría que, además de sembrarla en diferentes puntos, para compensar la diferente distribución de la toxina en el agua que depende del volumen total del agua, de la forma del pantano, embalse etc., de los movimientos del agua etc. habría que multiplicar por 8 y para que quedara suficiente toxicidad después de la neutralización y descomposición de la toxina, variable según el clima, contaminantes del agua etc. se debe multiplicar por otro 8, es decir habria que diseminar 3,2 kg de toxina. Si se quiere que actúe poco despues del ataque para evitar que el conocimiento de la agresión y de su origen restrinja los efectos, advirtiendo a la población para que no beba el agua contaminada, que tire las reservas que tenga en casa, limpie los depósitos y canalizaciones etc.debe aumentarse la cantidad diseminada. El agua se distribuye en las

ciudades por conducciones, llegando a los domicilios la contaminada en distintos lapsos y bebida igualmente en momentos diferentes lo que quiere decir que habría una gran dispersión temporal de los casos, que solo causarían alarma al irse concentrando en los hospitales, de modo que cuando se llegaran a tomar medidas ya se habría extendido mucho la intoxicación, que afectaría entre el 50 y el 80% de los que se sirven del agua contaminada.

Ataques personales

Es posible que Reinhard Heydrich, jefe de la Gestapo y del Servicio de Seguridad alemán en la IIGM que tuvo un importante papel en el Holocausto, asesinado en Praga en 1942 lo fuera por la toxina botulínica. Un grupo de patriotas checos entrenados y equipados por los ingleses, pusieron una bomba artesanal,fabricada con el tercio superior de una granada de mano inglesa unida con unas cintas, a un deposito, que podría haber servido para dispersar algo que situaron en el asiento del coche de Heydrich, que al explotar le produjo heridas en el costado izquierdo, pulmón, diafragma y bazo. El tratamiento quirúrgico recibido fue excepcionalmente bueno de modo que tuvo un postoperatorio satisfactorio aunque tuvo fiebre moderada y naturalmente con drenaje; pero al séptimo día empeoró bruscamente y fallecio al siguiente día. La autopsia no reveló lesiones macro ni microscopica que explicaran la muerte; no había peritonitis, abscesos, infección de las heridas, ni cuerpos extraños; el corazón y los pulmones eran normales. El jefe de los anatomopatologos reseñó que la muerte se debió a una bacteria y posiblemente a un veneno vehiculado por fragmentos de la bomba (Cochrane 1947). Los historiadores ingleses atribuyeron la muerte de Heydrich, a una toxina. Paul Fildes, científico jefe de del programa inglés de guerra biológica que trabajaba con la toxina botulínica, comentó a colegas (Middlebrook 1993) que «Heydrich ha sido la primera muesca que he hecho en mi pistola», lo que sugiere que se había empleado una toxina, pero es poco probable que se añada toxina a una bomba que se espera que mate al traumatizado y Heydrich no tenía ninguno de los signos típicos del botulismo; la historia es interesante pero lo más probable es que muriera por shock séptico pese a lo rápido de la muerte, o por embolia pulmonar masiva.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ALEXANDROV, N. J.;(1963) Voeunmeditsinski Zurnol. Num 6.

(2) AMERSDORFER, P.; WONG, C.; SMITH, T.; CHEN, S.; (2002) *Deshpande S, Sheridan R, Marks JD. Genetic and immunological comparison of anti botulinum type A antibodies from immune and non immune human phage libraries. Vaccine. 20*: 1640-8.

(3) ALISON, K.; RICHARDSON, P. T.; ALLAWAY, D.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, T. A.; THOMPSON, D. E.; (1992) *Sequence of the gene encoding type F neurotoxin of Clostridium botulinum. FEMS Microbiol Lett. 96*:225-230.

(4) ALTED, E.; DELGADO, M.; (1982) *Botulismo: comprobación: diagnóstica mediante estudio electrofisiológico. Med Clin (Barc) 78:* 77-78.

(5) ANDERSON, T. D.; SHAH, U. K.; SCHREINER, M. S.; JACOBS, I. N.; (2002) *Airway complications of infant botulism: ten year experience with 60 cases. Otolaryngol Head Neck Surg. 126*: 234-9.

(6) ARNON, S. B. Y COLS.; (1978) *Lancet:1*;1273

(7) Arnon SB,Midura TF, Clay SA, Wood RM, Chin J. Infants botulism Epidemiological, clinical and laboratory aspects. JAMA. 237: 1946-50; 1977

(8) Arnon S S, Midura T F, Damus K y col. Honey and other environmental risk factors for infant botulism. J Pediatr 1979; 94: 331-5; 1979

(9) Arnon SS, Werner SB, Faber HK y cols. Infant botulism in 1931: discovered of a misclassified case. Am J Dis Child 133: 580-2; 1979

(10) Aureli P, Fenicia L, Pasolini B, Gionfranceschi M, McCroskey LM, Hathaway CL. Two cases of type E infant botulism in Italy caused by neurotoxigenic Clostridium butyricum. J Infect Dis. 154:201-211: 1986

(11) Ball AP, Hopkinson RB, Farrell ID, y col. Human botulism caused by Clostridium botulinum type E: the Birmingham outbreak. Q J Med. 48(191): 473-491; 1979.

(12) Binz T, Kurazono H, Wille M, Frevert J, Wernars K, Nieman H. The complete sequence of botulinum neurotoxin type A Y comparison with otros clostridial neurotoxins. J Biol Chem. 265:9153-9158; 1990

(13) Binz T, Kurazono H, Popoff MR, y col. Nucleotide sequence of the gene encoding Clostridium botulinum neurotoxin type D. Nucleic Acids Res. 18:5556-5557;1990.

(14) Black JD, Dolly O. Interacción of 125I-botulinum neurotoxins with nerve terminals: Ultrastructural autoradiographic localización and quantitación of distinct membrane acceptors for types A Y B on motor nerves. J Cell Biol. 103:521-534; 1986.

(15) Blackie JO, Lees AJ. Botulinum toxin in the treatment of spasmodic torticolis.j Neurol Neurosufg Psychiatry 53:640-643; 1990.

(16) Beauvals P, Bouveret JP, Morin M, Richardel JM., Brlssaud HE. Botullsm B. A propos d'une nouvelIe observation. Sem Hop París 52: 161-164; 1976

(17) Bohnel, H.; Behrens, S.; Loch, P.; Lube K, Gessler F. Is there a link between infant botulism and sudden infant death? Eur J Pediatr. 160: 623-8;2001

(18) BOHNEL, H.; SCHWAGERICK, B.; GESSLER, F.; (2001) *Visceral botulism a new form of bovine Clostridium botulinum tóxication. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med., 48:* 373-83.

(19) BOYER, A.; GIRAULT, C.; BAUER, F.; KORACH, J. M.; SALOMON, J.; MOIROT, E.; LEROY, J.; BONMARCHAND, G.; (2001) *Two cases of foodborne botulism type E and review of epidemiology in France. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 20:* 192.

(20) BRIN, M. F.; (1997) *Botulinum Toxin: Chemistry, Pharmacology, Toxicityand Immunology.Muscle and Nerve suppl 6: S* 146-168.

(21) CAMPBELL, K. D.; COLLINS, M. D.; EAST, A. K.; (1993) *Nucleotide sequence of the gene coding for Clostridium botulinum (Clostridium argentinese) type G neurotoxin: Genealogical comparison with otros clostridial neurotoxins. Biochim Biophys Acta. 1216*:487-491.

(22) CASTEDO, C.; HERMIDA, N.; PURICELLI, H.; (1958) Acta Neuropsiquiátrica Argentina. 4; 118.

(23) CHANG, G.; GANGULY, G.; (2003) *Early antitoxin treatment in wound botulism results in better outcome. Eur Neurol. 49*: 151-3.

(24) COBB, S. P.; HOGG, R. A.; CHALLONER, D. J.; BRETT, M. M.; LIVESEY, C. T.; SHARPE, R. T.; JONES, T. O.; (2002) *Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. Vet Rec. 150*: 5-8.

(25) COCHRANE, R. C.; (1947) Biological Warfare Research in the United States. Vol 2. In: History of the Chemical Warfare Service in World War II. Historical Sección, Plans, Training Y Intelligence Division, Office of Chief, Chemical Corps, US Department of the Army.

(26) DAVIS, R. A.; (1971) *The assassinación of Reinhard Heydrich. Surg Gynecol Obstet. August:* 304-318.

(27) DEMARCHI, J.; MOURGUES, C.; ORIO, J.; PREVOT, A.; (1958) Bull Acad nat Med 142:580.

(28) DOCK, M.; BEN ALI, A.; KARRAS, A.; MISSET, B.; GARROUSTE ORGEAS, M.; DELETIE, E.; GOLDSTEIN, F.; CARLET, J.; (2002) *Traitement d'un botulisme grave par la 3,4 diaminopyridine. Presse Med. 31*: 601-2.

(29) DOMÍNGUEZ CARMONA, M.; GESTAL OTERO, J. J.; HERNÁNDEZ COCHÓN, J. M.; SÁNCHEZ MOZO, M. T.;Estudio de un brote de botulismo de larga duración

(30) DUNANT, Y.; ISRAEL, M.; (1985) *La liberación de acetilcolina. Investigación y Ciencia 105:32.*

(31) EISEL, U.; JARAUSCH, W.; GORETZKI, K. Y COLS.; (1986) *Tetanus toxin: Primary structure, expression in E coli,and homology with botulinum toxins. EMBO J. 10*:2495-2502.

(32) EKLUND, M. W.; POYSKY, F. T.; MSEITIF, L. M.; STROM, M. S.; (1988) *Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin producción in Clostridium botulinum type G. Appl Environ Microbiol. 54*:1405-1408.

(33) EKLUND, M. W.; POYSKY, F. T.; (1971) *Reed SM, Smith CA. Bacteriophages and toxigenicity of Clostridium botulinum C. Science 172*:480-482.

(34) EKLUND, M. W.; POYSKY, F. T.; (1976) *Reed SM. Bacteriophages Y toxigenicity of Clostridium botulinum type D. Nature 235*:16-18.

(35) ELSTON, J. S.; RUSSELL, R. W. R.; (1985) *Effect of treatment with botulinum toxin on neurogenic blepharospasm. BMJ 290:*1857-1859.

(36) ELSTON, J. S.; (1986) *Botulinum toxin treatment of hemifacial spasm, j Neurol Neurosurg Psychiatry. 49*: 827-829.

(37) EULENBURG, A.; (1886) Botulismo. En: Diccionario Enciclopédico de Medicina y Cirugía prácticas editado por Agustín Jubera Madrid.

(38) FAIRWEATHER, N. F.; LYNESS, V. A.; (1986) *The complete nucleotide sequence of tetanus toxin. Nucleic Acids Res. 14*: 7809-7812.

(39) FENICIA, L.; DA DALT, L.; ANNIBALLI, F.; FRANCIOSA, G.; ZANCONATO, S.; AURELI, P.; (2002) *A case if infant botulism due to neurotoxigenic Clostridium butyricum type E associated with Clostridium difficile colitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21*: 736-8.

(40) FRANZ, D. R.; PITT, L. M.; CLAYTON, M. A.; HANES, M. A.; ROSE, K. J.; (1993) *Efficacy of prophylactic and therapeutic administración of antitoxin for inhalación botulism. In: Das Gupta B, ed. Botulinum and Tetanus Neurotoxins and Biomedical Aspects. New York, NY: Plenum Press;* 473-476.

(41) GILL, D. M.; (1982) *Bacterial toxins: A table of lethal amounts. Microbiol Rev. 46*:86-94.

(42) GOEHRING, L. S.; (2002) *Sloet van Oldruitenborgh Oosterbaan MM. Botulisme bij het paard: een reele mogelijkheid in Nederland? Tijdschr Diergeneeskd. 127*: 82.

(43) GOLDSTEIN, J. L.; YERSON, R. G. W.; BROWN, M. S.; (1979) *Coated pits, coated vesicles Y receptor-mediated endocytosis. Nature. 279*: 679-689.

(44) HABERMANN, E.;(1974) *Labeled neurotoxin from Clostridium botulinu A. Arch Pharmakol. 281*:47.

(45) HABERMANN, E.; (1989) *Clostridial neurotoxins and the central nervous system: Funcciónal studies on isolated preparations. En: Simpson LL, ed. Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin. New York, NY: Academic Press, Inc*. 53-67.

(46) HALL, J. D.; MCCROSKEY, L. M.; (1985) *Pincomb BJ, Hathaway CL. Isolación of an organism which produces type E botulinal toxin from an infant with botulism. J Clin Microbiol. 21*: 654-655.

(47) HARRIS, A. J.; MILEDI, R.; (1971*) The effect of type D botulinum toxin on frog neuromuscular junctions. J Physiol 217*: 497.

(48) Harris, R.; Paxman, J.; (1982) A Higher Form of Killing. New York, NY: Hill and Wang; Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.

(49) HARVEY, S. M.; STURGEON, J.; DASSEY, D. E.; (2002) *Botulism due to Clostridium baratii type F toxin. J Clin Microbiol. 40*: 2260-2.

(50) HAUSOR, D.; POPOFF, M. R.; KURAZONO, H. Y COLS.; (1990) *Complete sequence of botulinal C1 neurotoxin. Nucleic Acids Res.18*: 4924-4928.

(51) HEIDER, L. C.; MCCLURE, J. T.; LEGER, E. R.; (2001) *Presumptive diagnosis of Clostridium botulinum type D intóxication in a herd of feedlot cattle. Can Vet J. 42:* 210-2.

(52) HOLZER, E.; (1962) *Botulism caused by inhalación. Med Klin. 41*:1735-1740.

(53) HORNICK, R. B.; WOODWARD, T. E.; (1966) *Trans Amer Clin Climatol. Ass.* 70-76.

(54) HUTCHINSON, O. N.; (1992) *Foodborne botulism. BMJ;305*:262-265.

(55) IHARA, H.; KOHDA, T.; MORIMOTO, F.; TSUKAMOTO, K.; KARASAWA, T.; NAKAMURA, S.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S.; (2003) *Sequence of the gene for Clostridium botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C terminal half of heavy chain and its binding activity. Biochim Biophys Acta. 1625:* 19-26.

(56) INOUE, K.; LIDA, H.; (1971) *Phage convertion of toxigenicity in Clostridium botulinum, D and C, Japon J Med Sci Biol 24*: 53.

(57) JONGENEEL, C. V.; BOUVIER, J.; BAIROCH, A.; (1989) *A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. FEBS Lett. 242*:211-214.

(58) JUNG, A.; OTTOSSON, J.; (2001) Infantil botulisme forarsaget af honning. Ugeskr Laeger. 163: 169.

(59) JUST, I.; HOFMANN, F.; GENTH, H.; GERHARD, R.; (2001) *Bacterial protein toxins inhibiting low molecular mass GTP binding proteins. Int J Med Microbiol. 291*: 243-50.

(60) KAUF, C.; LORENT, J. P.; MOSIMANN, J.; SCHLATER, I.; SOMAINI, B.; VALVART, J.; (1974) *Botulism epideme vom type B. Schweiz Med Wochenschr. 104*: 677-685.

(61) KRISHNA, S.; PURI, V.; (2001) *Infant botulism: case reports and review. J Ky Med Assoc. 99:* 143-6.

(62) LASO, F. J.; NUEKSEN, A. S. M.; GÓMEZ, M. A.; ALVAREZ, S.; (1986) *Botulismo benigno. Med clin (Barc) 87*:259.

(63) LEE, J. S.; PUSHKO, P.; PARKER, M. D.; DERTZBAUGH, M. T.; SMITH, L. A.; SMITH, J. F.; (2001) *Candidate vaccine against botulinum neurotoxin serotype A derived from a Venezuelan equine encephalitis virus vector system. Infect Immun. 69*: 5709-15.

(64) MALHADO, J. A.; VIEIRA, J. M.; SOUSA, M.; PROENÇA, R. F.; (1982) *A propósito de un estu.dio de cuatro brotes de botulismo en Portugal. Rev Clln Esp 164*: 173-177.

(65) MCNALLY, R. E.; MORRISON, M. B.; BERNDT, J. E. Y COLS.; (1994) Effectiveness of Medical Defense Intervencións Against Predicted Battlefield Levels of Botulinum Toxin A. Vol 1. Joppa, Md: Science Applicacións Internaciónal Corporación- 3.

(66) MEYER, K. F.; (1956) *Botulism as a world health problem, Bull. OMS.* 15:281.

(67) MIDDLEBROOK, J. L.; (1989) *Cell surface receptors for protein toxins. In: Simpson LL, ed. Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin. New York, NY: Academic Press Inc*. 95-119.

(68) MIDDLEBROOK, J. L.;(1996) Franz. Inv y C Marzo.

(69) MIDDLEBROOK, J. L.; (1993) *Contribucións of the U.S. Army to botulinum toxin research. En Das Gupta B, ed. Botulinum and Tetanus Neurotoxins Y Biomedical Aspects. New York, NY: Plenum Press* 515-519.

(70) MITCHELL, P. A.; PONS, P. T.; (2001) *Wound botulism associated with black tar heroin and lower extremity cellulitis. J Emerg Med. 20*: 371-5.

(71) MULLEAGUE, L.; BONNER, S. M.; SAMUEL, A.; NICHOLS, P.; KHAN, M.; SHAW, S.; GRUNING, T.; (2001) *Wound botulism in drug addicts in the United Kingdom. Anaesthesia. 56*: 120-3.

(72) MÜLLER, H.; (1869) *Botulus. Deuts Klin 22*: 321-9.

(73) MÜLLER, H.; (1870) *Uber botulus. Deuts Klin 23:* 27-36.

(74) NIEMAN, H.; BLASI, J.; JAHN, R.; (1994) *Clostridial neurotoxins: New tools for dissecting exocytosis. Trends in Cell Biology. 4*:179-185.

(75) NISHIKI, T-I.; KAMATA, Y.; NEMOTO, Y. Y COLS.; (1994) *Identificación of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. J Biol Chem. 269*:10498-10503.

(76) OHISSSHI, I.; (1983) *Response of mouse intestinal loop to botulism C1 toxin. Infec and Immun*. 40:691.

(77) PATT, H. A.; FEIGIN, R. D.; (2002) *Diagnosis and management of suspected cases of bioterrorism: a pediatric perspective. Pediatrics. 109:* 685-92.

(78) PICKETT, J.; BERG, B.; CHAPLIN, E.; BRUNSTETTER-SHAFER, M. A.; (1976) *Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophyslologlc study. N Engl J Med 295:* 770-772.

(79) PREVOT, A.; SILLIOC, R.; (1959) *Annales de l´Inst Pasteur. 96:630.*

(80) PREVOT, A.; SILLIOC, R.; (1962) *Annales de l´Inst Pasteur. 103:84.*

(81) PRZYBYLSKA, A.; (2001) *Zatrucia jadem kielbasianym w 1999 roku. Zaklad Epidemiologii Panstwowego Zakladu Higieny ul. Chocimska. Przegl Epidemiol. 55:* 103-9.

(82) PRZYBYLSKA, A.; (2002) *Zatrucia jadem kielbasianym w 2000 roku. Przegl Epidemiol. 56:* 305-10.

(83) RAMSEY, W. G. ED.; (1979) *The assassinación of Reinhard Heydrich. After the Battle. 1979; 24: cover* 2-37.

(84) REY CALERO, J.; (1963) Laboratorio. 18:409.

(85) RÖMER, P. C.; (1900) *Botulinum in Hesse. Zblt Bakt I-27*: 857-67.

(86) RUNDERVOORT, R. S.; VAN DER VEN, A. J.; VERMEULEN, C.; VAN OOSTENBRUGGE, R. J.; (2003) *De klinische diagnose 'wondbotulisme' bij een drugsspuitster. Ned Tijdschr Geneeskd. 18*: 124-7.

(87) SANDROCK, C. E.; MURIN, S.; (2001) *Clinical predictors of respiratory failure and long term outcome in black tar heroin associated wound botulism. Chest. 120*: 562-6.

(88) SAUTTER, T.; HERZOG, A.; HAURI, D.; SCHURCH, B.; (2001) *Transient paralysis of the bladder due to wound botulism. Eur Urol. 39*: 610-2.

(89) SAWALHA, W.; (2001) *Botulism in a heroin addict. East Mediterr Health J. 2001 May, 7(3)*: 556- 8.

(90) SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A.; (1997) *Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. Persp Biol Med 40 (4)*: 317-27.

(91) SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A.; (1992) *Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. Microbiol Rev 56*: 80-99.

(92) SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B. Y COLS.; (1992) *Tetanus Y botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature. 359*:832-835.

(93) SCHJONSBY, H. P.; (2002) *M Botulisme i Osterdalen i 1831. Tidsskr Nor Laegeforen. 122*: 2860-2.

(94) SCOTT, A. B.; (1980) *Botulinum toxin injections into extra ocular muscles as an alternative to strabismus surgery. ophthalmology 87*:1044-1049.

(95) SEGAERT, M.; CLEMENT, H.; TYTGAT, H.; (1945) Subacuut botulismoe Ned T Genneesk 112:1968

(96) SIEGEL, L. S.; JOHNSON-WINEGAR, A. D.; SELLIN, L. C.; (1986) *Effect of 3,4-diaminopyridine on the survival of mice injected with botulinum neurotoxin type A, B, E or F. Toxicol Appl Pharmacol. 84*:255-263.

(97) SIMMONS, R.; (1962) *Costillow R. J. Bacteriol, 84*:1274.

(98) SIMPSON, L. L.; (1989) *Peripheral accións of the botulinum toxins. En Simpson LL, ed. Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin. New York, NY: Academic Press Inc* 153-178.

(99) SONNABEND, O. A. R.; SONNABEND, W. F. F.; KRECH, U. Y COLS.; (1985) *Continuous microbiological and pathological study of 70 sudden and unexpected infant deaths: Toxigenic intestinal Clostridium botulinum infection in 9 cases of sudden infant death syndrome. Lancet 1*:237-40.

(100) STELL, R.; THOMPSON, P. O.; MARSDEN, C. O.; (1988) *Botulinum toxin in spasmodic torticolis. J Neurol Neuros Psychiatry 51*:920-923.

(101) TANZI, M. G.; GABAY, M. P.; (2002) *Association between honey consumption and infant botulism. Pharmacotherapy. 22:*1479-83.

(102) THOMPSON, D. E., BREHM, J. K.; OULTRAM, J. D. Y COLS.; (1990) *The complete amino acid sequence of the Clostridium botulinum type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. Eur J Biochem. 189:*73-81.

(103) TORII, Y.; TOKUMARU, Y.; KAWAGUCHI, S.; IZUMI, N.; MARUYAMA, S.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S.; TAKAHASHI, M.; (2002) *Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid. Vaccine. 20*: 2556-61.

(104) TSUIJ, K. C.; EISEN, A.; STOESSI, A. J.; CALNE, S.; CALNE, O. B.; (1986) *Ooubleblind study ofbotulinum toxin in spasmodic torticolis. Lancet* 245-246.

(105) TURNER, H. D. Y COLS.;(1978) *Lancet. 1*.1277.

(106) VAN-DIJK, G. W.; VOS, P. E.; EURELINGS, M.; JANSEN, G. H.; VAN-GIJN, J.; (2001)*Volledig verlamd of hersendood? Ned-Tijdschr-Geneeskd. 145*: 2513-6.

(107) VAN WUIJCKHUISE, L.; BEEKHUIS, A.; BREUKERS, W. A.; VAN DIJK, P.; (2002) *Botulismevergiftiging bij runderen, een case, diagnostiek en preventie. Tijdschr Diergeneeskd. 127*: 422-4.

(108) WHELAN, S. M.; ELMORE, M. J.; BODSWORTH, N. J.; BREHM, J. K.; ATKINSON, T.; MINTON, N. P.; (1992) *Molecular cloning of the Clostridium botulinum structural gene encoding the type B neurotoxin Y determinación of its entire nucleotide sequence.Appl Environ Microbiol. 58*:2345-2354.

(109) WHELAN, S. M.; ELMORE, M. J.; BODSWORTH, N. J.; ATKINSON, T.; MINTON, N. P.; (1992) *The complete amino acid sequence of the Clostridium botulinum type-E neurotoxin, derived by nucleotide-sequence analysis of the encoding gene. Eur J Biochem. 204*:657-667.

(110) WU, H. C.; YEH, C. T.; HUANG, Y. L.; TARN, L. J.; LUNG, C. C.; (2001) *Characterization of neutralizing antibodies and identification of neutralizing epitope mimics on the Clostridium botulinum neurotoxin type A. Appl Environ Microbiol. 67*: 3201-7.

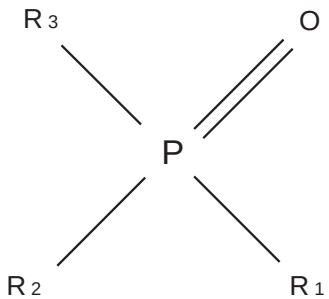
Los organofosforados

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

y LORENZO DOMÍNGUEZ DE LA CALLE
Master en Salud Pública

INTRODUCCIÓN

Los organofosforados OF, son ésteres del ácido fosfónico que inhiben a la acetilcolinesterasa, produciendo síndromes nicotínico y muscarínico. Algunos se emplean como plaguicidas, de gran importancia agrícola. Su fórmula general es:



siendo R un radical orgánico y X un halógeno o cianuro, tiocianato, fenoxi u otra estructura. Los OF tienen un átomo de fósforo quiral, es decir tienen los dos estereoisómeros Sp y Rp.

Estos agentes disponen de átomos muy reactivos de oxígeno, cuyos electrones de valencia, están muy cerca de su núcleo, más que los del áto-

mo de azufre, lo que aumenta su electronegatividad y por tanto la fuerza con la que el núcleo atrae y mantiene a los electrones a su alrededor y por ello son altos su reactividad y toxicidad. Los OF que substituyen los grupos Nitrogeno-Carbono por el más electronegativo y por tanto reactivo flúor es más tóxico. La concentración mínima eficaz en 92 h en la Hydra attenuata demuestra que la toxicidad depende de la hidrofobicidad lo que es aplicable para predecir la toxicidad de nuevos agentes nerviosos. Son líquidos incoloros si sin puros, pero los productos técnicos son pardos, algunos con lígero olor afrutado. Se hidrolizan lentamente en agua perolo hacen rápidamente en un ph alto. Aunque son muchos los compuestos organofosforados utilizables en guerra los que se consideran de mayor interés militar son los agentes «G» así llamados por haber sido obtenidos por los «germanos»; son líquidos, densos, siruposos, incoloros, insípidos y en general inodoros; desprenden vapores más densos que el aire, siendo muy volátiles el sarín y el tabún y menos el somán y el VX, que persisten mucho a temperatura ambiente. Las personas ligeramente expuestas, suelen recuperarse, pero si la exposición fue intensa tienen pocas probabilidades de sobrevivir. A diferencia de algunos pesticidas organofosforados, los agentes nerviosos no causan problemas neurológicos a partir de dos semanas de la exposición. Los que se consideran, actualmente de interés militar son:

EL TABÚN O T-83

Es el monodimetil-dimetilaminociano fosfato u Ortoetil N, N dimetilfosforamídocianuro o Etil dimetilfosforamidocianidato o Dimetilamino- cianofosfato de etilo. El tabún fue el primer OF de la serie de estos agresivos que incluyen el sarin el estándar para USA y el Somán que fue el de la URSS. Fue desarrollado hacia 1938, por los alemanes que en 1942-45 montaron una planta en Dyhernfurth, que produjo grandes cantidades de este tóxico, con los que cargaban proyectiles, pero asombrosamente no lo emplearon trormfp drgún algunos posibles represalias al sobreestimar el potencial aliado. El Ejército soviético capturó esta planta al invadir el oeste alemán

Su formula química es: (CH3)2N-P(=O)(-CN)(-OC2H5. El NATO le adscribió el código GA. Es barato, fácil de producir a partir del cloruro de fósforo y relativamente de manejar.

Es un líquido transparente, incoloro aunque el técnico es pardo, insípido, con ligero olor dulzón o a frutas aunque en grandes concentraciones huele a pescado. Es poco hidrosoluble; la saturación a 25ºC se alcanza con 9,8 g en 100 g de agua, pero se disuelve bien en la mayoría de los solventes orgánicos. Se absorbe facilmente por las gomas y por superficies pintadas. Hierve a 230ºC, cuya presión de vapor a 20ºC es 0,037 mm Hg, la mitad de la de la iperita; volatilidad de 600 mg/m3 persistiendo más en el medio que el sarín y menos que el VX. Su peso molecular es 162,1, su densidad 1.073 g/cm^3. Tiene un punto de fusión de 247ºC, el de congelación –50ºC. Diseminado como aerosol persiste en el terreno varios días, siendo su vida media 1-1,5 días: es semipersistente. Tiene un gran interés táctico. El calor producido por la explosión libera CNH, que contribuye a la acción tóxica. Su DL50 en la piel es de 1,0 g para un hombre de 70 kg y la LCt50 400 mg•min/m3. La dosis mortal está en torno a 1 mg/kg, pero a veces bastan 12-20 mg para matar a un hombre. Una dosis de 6 mg/kg mata en diez a doce minutos a la rata. Una concentración de 75 mg por m^3 de aire mata a perros o a caballos expuestos mas de treinta minutos. La LD50 por via intramuscular es 0,260 mg/kg. Los síntomas de la intoxicción aparecen casi inmediatamente. El tabún se puede sintetizar a partir del amoniaco y del metanol: se ha obtenido al reaccionar unas 100 partes de cloruro de fosforilo, con 24 de cianuro sódico, con 30 de etanol y con 13 de dimetilamina; con 500 kg de cloruro de fosforilo se obtiene suficiente tabún para cargar un MIG, un Mirage o un Sukhoi.

SARÍN o GB o T-46. (algunos lo llaman sarína)

La NATO le le adscribió el código GB Es el agente químico 140 cuya fórmula es el ortoisopropil metíl fósfono fluorhidrato o (1-metiletil metilfosfonofluoridato o Metilfluorofosfonato de isopropilo. Su formula química es: CH3-P(=O)(-F)(-OCH(CH33)2). Es el trilón más tóxico. Es un líquido practicamente inodoro e incoloro e ínsipido, que hierve a 158°C. Su presión de vapor a 20ºC es 2,1 mm Hg o 1,10 g/mL, su densidad de vapor respecto al aire es 22.000 mg/m3 a 25°C, peso molecular 140,1. densidad en g/cm3 1.089,puntos de fusión 147ºC, de congelacion -56ºC, presión de vapor 2,9 mm Hg, volatilidad 17.000 mg/m3, semejante a la del agua es decir es el órgano fosforado más volátil. Poco so-

luble en agua pero se disuelve bastante en alcohol, petroleo, acetona y en otros disolventes orgánicos. Militarmente se usa como gas y sobre todo como aerosol que persiste en el medio a 5 y 25ºC entre 2 y 24 horas; se considera militarmente como no persistente. Se absorbe por las vías respiratorias y por la piel.

Los fabricantes quedaron asombrados de su toxicidad para el personal de la fábrica y su agresividad sobre aparatos. 1,2 mg/kg puede ser letal. Su tóxicidad es el triple de la del tabún; 100 mg por m3 de aire mata rápidamente y 10 mg por m3 lo hace en unos diez minutos. La LCt50 es 100 mg•min/m3 siendo la concentración máxima aceptable, en ambientes de trabajo 0,1 µg /m3, concentración que no detecta el aparato M8A1, a partir de la cual se debe exigir protección personal.

La DL_{50} para el ratón es de 100 µg/kg como media de diversos autores y vias de entrada. La DL_{50} por via muscular es 160 µg/kg y 1,7 µg percutánea. Una gota sobre la piel o la inhalación de sus vapores, causa en unos minutos, un síndrome colinérgico grave incluso mortal; el contenido de una cucharilla pueden matar a 10.000 personas, en un minuto.

Los alemanes habían fabricado al terminar la IIGM más de 1.500 tm y Estados Unidos comenzó a fabricarlo a comienzos de los años 50.

En su síntesis quedan residuos de metilfosfonato de O,O-diisopropilo (DIMP) y de metilfosfonato de O,O-dietilo (DEMP), (Minami y cols 1997) substancias que inhiben a las células NK y a los linfocitos T (Li y cols. 2000).

La clínica aparece muy rápidamente sin latencia.Tiene efectos acumulativos porque se detoxifica lentamente, de modo que las personas repetidamente expuestas al sarín, como trabajadores, sufren más trastornos en su salud.

EL CICLOSARÍN, GF

Según la NATO, es el Metilfosfono fluoridato de O-ciclohexilo. Su peso molecular es 180,2, densidad 1.120 g/cm^3. Punto de fusión 92ºC, de congelacion inferior a -30ºC, presión de vapor 0,06 mm Hg. Fue sintetizado en 1949 pero los científicos militares de USA y del RU, considera-

ron que tenía poco interés militar, tal vez porque la IIGM había terminado o porque su fabricacion era muy cara. Es semipersistente.

El SOMÁN o Agente químico 182

Es el monopinacolil-metilfluor fosfato u Orto 1, 2, 2 trimetilpropil-metilfosfonofluorhidrato o Metilfluorofosfonato de pinacolina. La NATO le adscribió el código GD.Fue sintetizado por Richard Kuhn en 1944 en su linea de obtención de insecticidas.sin que se llegara a producir en cantidades significativas. Su fórmula química es: CH3-P (=O) (-F) (-CH(CH3)C(CH3) 3. Es un trilón. Fue descubierto por Richard Kuhn en la primavera de 1944, mientras trabajaba para el ejército alemán sobre la farmacología del tabún y del sarín. Es un líquido transparente, incoloro, insípido, con ligero olor a alcanfor o al del medicamento «Vicks VapoRub®» o a fruta podrida. Su peso molecular es 182,2 d, densidad 1.022 g/cm3, punto de fusión 167ºC, de ebullición 198ºC, de congelacion -42ºC, presión de vapor 0,40 mm Hg a 25°C, volatilidad 3,9 mg/m3 menor que la del sarín, o sea es semivolatil, siendo relativamente persistente en el ambiente. Se disuelve en el agua a 20ºC hasta el 2,1 % y se disuelbe en varios solventes. Más tóxico que el sarín. Su DL_{50} para el ratón es de 64,0 µg/kg (media de diversos autores y vias de entrada). La DL_{50} intramuscular es 0,080 mg por kg y aplicado en la piel de un hombre de 70 kg 350 mg. La LCt 50 es 50 mg•min/m3. La intoxicación se produce por inhalación y por contacto con la piel, que desprende vapores. Se absorbe por las superficies porosas y pintadas. Dado que su unión con la colinesterasa es muy enérgica y que el envejecimiento es muy rápìdo, las oximas no liberan a la colinesterasa unida al somán. USA, Francia y Rusia tenían depósitos de somán, pero este agresivo no se ha empleado nunca y solo se dispone de una descripción de Sidell (1974) de un intoxicado accidentalmente.

Los AGENTES V, de «veneno» o V gas o gas F

Un equipo científico del Instituto Sechenov de Leningrado, había predicho que los S-2-dialquilaminoetil fosfono- y fosforotiolatos serían anticolinesterásicos; los americanos, pese a las medidas de seguridad de los soviéticos consiguieron la fórmula molecular (C11H26NO2PS) y una ver-

sión de su estructura y obtuvieron el V-gas que es el S-[2-(dietilamino)etil]-O-etil isobutilfosfonotiolato, que es ligeramente diferente de la del VX que tiene la misma fórmula

El GB es el dimetilamidofosfono fluoridato de O-2-di isopropilamino etilo: hacia 1953 los ingleses obtuvieron el similar Ortoetil S-2-diisopropil aminoetilmetil fosfonotiolato (Metil tiofosfotiolato de etilo y de S dimetilaminoetilo o de diisopropilaminoetilo o S-[2-[bis(1-metiletil) amino]etil]- O -etil metilfosfonotiolato. CH3-P (=O) (-SCH2CH2CH2N [CH (CH3) 2] 2), o agente VX

Estas substancias fueron calificadas como buenos insecticidas pero al ser 2.000 veces más tóxicos que la iperita absorbidos a través de la piel, unas 3.000 veces más si lo hacen por el pulmón y 10 veces más tóxico que el sarín y mas estable que este fueron considerados como posibles agresivos químicos. Los agentes «V», son persistentes, semejantes a la gasolina, pegándose a las superficies por lo que es agresivo por contacto. Entre ellos tenemos el Tetram® o éter dietílico del ácido S-2-(dietilamino) etil fosforotioico de los que unos pocos mg matan a una persona.

El agente V más importante es el «VX. Es un líquido oleoso, incoloro o ámbar, inodoro, insoluble en agua pero soluble en los solventes orgánicos. Su punto de ebullición es de 298ºC, el de congelación –51ºC y su densidad específica a 20ºC es 1.083. Su peso molecular es 267,4 d, densidad 1.008 g/cm3, punto de ebullición 298ºC, de congelacion –39ºC, de vapor 0,0007 mm Hg y volatilidad 10 mg/m3 a 20°C es decir se evapora tan lentamente como el aceite mineral de modo que persiste horas. Poco soluble en agua pero lo hace bien en los solventes orgánicos. Aplicable en forma líquida sobre el tegumento o calentado a altas temperaturas puede convertirse en pequeñas cantidades de vapor mas pesado que el aire, tóxico por inhalación; poco hidrosoluble, pero puede emplearse para contaminar el agua, que intoxique a los que la beban o se pongan en contacto con ella o a los alimentos. Un kg de VX puede contaminar 3.500 m2, con actividad letal durante varias semanas. El VX es el más potente de todos los agentes nerviosos. Su DL_{50} va de 0,9-10 mg/min/m_3 según la vía de entrada; inhalado, es algo más tóxico que el sarín y lo es mucho, si se absorbe por la piel. La dosis letal cutánea es de 2 a 10 mg, según la zona en donde haya contactado. Es posible que cualquier contacto sobre la piel que deje VX, visible sea mortal, a zmenos que se eli-

mine inmediatamente del cuerpo. La DL_{50} del VX es 0,4 mg. I gota de 2-3 mm de diámetro,sobre la piel, causa sudoración y contracción muscular local. Los expuestos a una dosis letal media, mueren antes de haber transcurrido quince minutos. En 1969 murieron unas setenta ovejas situadas a 60 km de unos almacenes en Utah, por un escape que tenía la cisterna que lo contenia.

Al ser poco volátil, los vapores apenas intervienen en la intoxicación, pero durante los 30 minutos siguientes a la exposición las ropas pueden seguir desprendiendo vapores que pueden intoxicar a otras personas. Es el agente nervioso más persistente permaneciendo en las superficies contaminadas 2-6 días y hasta meses, en tiempo frío, constituyendo un peligro a largo plazo. Al hidrolizarse, se libera ácido S-2-(diisopropilaminoetil) metilfosfonotioico (EA 2192), muy tóxico (Munro y cols. 1999), lo que supone un problema para la descontaminación.

El VX se descompone lentamente en el cuerpo, por lo que las exposiciones repetidas al VX pueden acumularse.

La gravedad depende de la cantidad de VX a la que estuvo expuesta la persona, de la vía y duración de la exposición. Los síntomas aparecen a los pocos segundos despues de la exposición al vapor del VX y de unos pocos minutos a 18 horas si lo estuvo a la forma líquida. El VH inhibe especialmente a la colinesterasa vera, teniendo poco efecto sobre la plasmática.

Varías compañias químicas y científicos independientemente, descubrieron en 1952 y en 1953, la gran tóxicidad de unos ésteres de 2-aminoetanotioles, organofosforados análogos a los anteriores OF y en 1954 se obtuvo el Amitón (O,O-dietil-S-[2-(dietilamino)etil] fosforotiolato). Ghosh y Newman de la ICI obtuvieron en 1955 el S-[2-(dietilamino)etil]-O-etil etilfosfonotiolato y publicaron «A New Group of Organophosphate Pesticides, Chemistry and Industry» asi como el isopropil p-nitrofenil metilfosfonato análogo del sarín, el pinacolil p-nitrofenil metilfosfonato del somán y el diisopropil S- (2- diisopropilaminoetil)fosforotioato, al dietil S- (2-diisopropilaminoetil) fosforotioato, y al dietil S- (2-trimetilaminoetil) fosforotioato, que lo con del VX; la concentración minima efectiva de estos dos compuestos es 10 veces superior que el análogo del somán y 4 veces mayor que el analogo del sarín. Podrían ser empleados como agresivos muchos insecticidas anticolinesterásicos, abandonados como ta-

les por su tóxicidad el muy tóxico hexaetil-tetrafosfato (H.E.T.P.) cuya DLm para la rata es de 1,05 mg/kg oral y 2,4 por vía cutánea. El tetraetil-pirofosfato (T.E.P.P.), usado para la miastenia gravis, fue obtenido por Wurtz,sin descubrir su tóxicidad, pero unas salpicaduras sobre la piel han matado a personas. También son tóxicos, el dietil-paranitrofenil-tiofosfato (paration), el octa-metil-pirofosforarmina (O.M.P.A.) y el di-isopropil fluor fosfato (DEF) empleado en el glaucoma y en las retenciones urinarias y el dimetil y el dietil fosforofluoridato vaporizados. La fisiostigmina, la anatoxin-a(s), el onchidal y las fasciculinas son anticolinesterásicos que producen un sindrome similar al causado por los OF pero facilmente reversible. Estos productos son dificiles de obtener y solo se logra en escasa cantidad por lo que no sería factible diseminarlas como aerosoles, fáciles de ocultar y de transportar sin demasiado riesgo y de díficil identificación. Más probable es su uso por terroristas que como agresivo de guerra.

Se conocen OF cuya volatilidad es intermedia (IVA), como el dimetilamidofosfonofluoridato de O-2-dimetilaminoetilo o GV.

HISTORIA DEL EMPLEO DE LOS ORGANOFOSFORADOS EN LA GUERRA Y EN EL TERRORISMO

Ante la probable guerra contra los países aliados, para suplir la carencia de rotenona y al pelitre, importantes insecticidas sintetizados por plantas del Extremo Oriente, los alemanes a partir de 1934, en la I.G. Farbenindustrie de Leverkussen y en la empresa Hoescht intentaron obtener insecticidas sistémicos,que absorbidos por las raíces o por las hojas, o añadidos a los piensos, se difundieran por la savia o por la sangre, distribuyéndose homogéneamente sin lesiónar a la planta o al animal, pero capaces de matar a los artrópodos que picaran o tocaran a los organismos con los insecticidas. Michaelís consiguió en 1935 el ácido dimetilfosforamidofluoridico que patentó para Alemania, RU, Suiza y USA; a partir de 1939 se incorporó Gherard Schraeder quién obtuvo alquilfosfatos, luego fluorfosfatos, acilfluoruros, sulfonil fluoruros, derivados del fluoroetanol y ácido fluoroacético, substancias llamadas trillones o trilones, cuyo punto de ebullición está entre 50 y 250ºC., hidrosolubles,casi inodoros, estables, aunque fácilmente hidrolizables, capaces de emitir vapores in-

coloros, muy tóxicos para el hombre. La dosis mortal está en torno a 1 mg/kg, pero a veces se muere sólo con 0,2 mg/kg. La investigación sistemática de las dimetilfosforamidas, llevó a Schrader a obtener el 23 de diciembre de 1936, el tabún, del que bastaba una concentración de 5 ppm en sangre para matar sistémicamente a los piojos, según encontró el entomólogo Kükenthal en enero de 1937.

La acción tóxica del tabún era enorme y tanto Schrader como un ayudante se intoxicaron con sus vapores de tabún; por lo que Schraeder, pensó que podía ser utilizado como agresivo químico y en cumplimiento de la orden nazi de comunicar todos los inventos capaces de tener una utilidad militar al Ministerio de la Guerra, informó de sus hallazgos a las autoridades alemanas. Se envió una muestra de tabún a la sección de Guerra Química de la Oficina de armamento en Berlin-Spandau en mayo de 1937, y Schrader hizo una demostración en Berlin, y por tanto se declaró secreta la la patente. En consecuencia se construyeron nuevos laboratorios en Wuppertal-Elberfeld en el valle del Ruhr, en 1939, una planta piloto y en 1940 una planta subterrámea de 1 km2 llamada Hochwerk, en Dyernfurth-am-Oder (hoy Brzeg Dolny en Polonia), a 1 km del Oder a 40 km de Breslau (hoy Wroclaw) en Silesia, estando la fabricación de los neurotóxicos y de intermedios, a cargo de la Anorgana GmbH, subsidiaria de la IG Farbenindustrie.

La planta solo llegó a ser operativa en junio de 1942, por la dificultad intrinseca de la síntesis y porque la actividad corrosiva de algunas substancias obligaba a utilizar recipientes de doble pared, entre las cuales había aire a presión, revestidos de plata, cristal o cuarzo. Las instalaciones se descontaminaban periódicamente con amoniaco y vapor. Los trabajadores llevaban respiratores y trajes de goma-textil-goma, que solo se usaban diez veces. Pese a esas precauciones se produjeron más de 300 accidentes antes de que empezara la producción y al menos 10 trabajadores murieron durante los dos años y medio de trabajo; cuatro que habían recibido chorros de tabún de una conducción, murieron antes de que se les pudiera quitar los trajes de goma; a otro le entraron 2 litros tabún por el cuello de su traje de goma y falleció a los dos minutos; otros siete trabajadores recibieron en la cara un chorro de tabún con tanta fuerza que atravesó el filtro de la máscara matando a cinco pese a los enérgicas medidas de resucitación que les fueron aplicadas. Al terminar la IGM los

alemanes habían obtenido 2.000 tm de tabún diluído para llenar proyectiles, o misiles con un 22% de monoclorobenceno y 10.000 tm en bomas de aviación almacenadas en Krappitz (Krapowice) en la Silesia Superior y en minas abandonadas en Lausitz y en Sajonia.

En 1937 Schrader con Ambros, Rudriger, y van der Linde. Sintetizaron el «sarín» así llamados por las iniciales de los tres primeros científicos y con las letras «in» de Van Linde. En Junio de 1939, se pasó la fórmula y una muestra a la Sección de guerra quimica de la Oficina de Armamento de Berlin-Spandau. Para su análisis se usaba el corrosivo fluorhídrico que requería recipientes revestidos de cuarzo y plata. Se construyeron plantas pilotos en Spandau, Munster Lager, Leneberg y para su fabricación el Edificio 144 de Dyernfurth con capacidad de producir 40 a 100 toneladas mensuales. En 1944 habían obtenido un poco de sarín en una pequeña planta piloto en Falkenhagen, al sudeste de Berlin en la que al parecer había almacenadas 10 toneladas, y parece que hacia el fin de la guerra podría fabricar 500 tm mensuales.

Prisioneros, capturados en IIGM informaron a los americanos, que los alemanes habían obtenido un derivado alquílico del ácido fluorfosfórico.

Los anticolinesterásicos como agresivos militares se emplean dispersándolos en el aire, mediante proyectiles, bombas, misiles, minas de tierra, cohetes etc. que contienen un explosivo que abra la carcasa y que al explotar dispersa y voalitiliza el líquido; también se pueden dispersar por aparatos productores de aerosoles Los organofosforados se pueden usar en proyectiles binarlos en dos compartimentos que reaccionan en el blanco. Un ataque aéreo en un frente de unos dos kilómetros a una altura adecuada, mataría a todos los hombres y animales que estuvieran a 20 Km en la dirección del viento. Un ataque aéreo con sarín contra poblaciones podria ser tan letal como la bomba atómica de Hiroshima. La zona afectada permanecería contaminada unos 30 minutos si fue por sarín, 4-5 horas por el somán y de 13 a 15 días para el VX pero en tiempo frio pueden permaneces hasta 30 días. Los agentes como el tabún, o el sarín, cuyos vapores, son mas pesados que el aire se concentran en las zonas más bajas. A suficiente concentración actúan en segundos, con las consecuencias que esto supone.

También se pueden usar para contaminar alimentos; los alimentos que contienen agua, pueden absorber los vapores de estos agresivos, y por

ello deben desecharse en caso de agresiones los que no estuvieran en recipientes herméticos. El tratamiento térmico de los alimentos descompone los organofosforados.

Es posible el empleo intencionado de los OF para contaminar el agua, a la cual puede llegar secundariante a un ataque aereo, pero en este caso, aunque persisten bastante en el agua, en la que se hidroliza, no resulta práctico contaminar grandes caudales, pues la dilución les quitaría efecto.

Algunos stocks de estos agresivos, fueron transportados a Baviera para preparar la última acción defensiva de los nazis en agosto de 1944. Al final de la guerra cayó esta fábrica en manos de los soviéticos, quienes con todo el personal que pudieron hallar la trasladaron a la URSS. En un bosque cercano a Hamburgo, se descubrieron varios miles de cajas conteniendo cada una de ellas una bomba de gas, similar al diisopropilfluorfosfato. El 11 de mayo de 1943, los ingleses capturaron a un químico alemán que había trabajado en el principal laboratorio de agresivos químicos, quién les comunicó el código secreto del tabún (Trilón 83), la técnicas para obtenerlo, sus efectos y los métodos de uso y defensa. Estos datos fueron recogidos en el informe MI9 del servicio de inteligencia del 3 de julio de 1943; en abril de 1945 encontraron un depósito de municiones, uno de cuyos proyectiles fue enviado por barco al RU para ser analizado. El General Hugh W. Rowan, Jefe de los Servicios químicos del Ejército norteamericano en Europa, se hizo cargo de un depósito de fosforados en Ossa (cerca de Leipzig) que contenía 66.000 bombas, algunas de 250 kg con agresivos químicos, de las que 16.000 temían sarín.

Al acercarse el Ejército rojo a Silesia y los aliados a la frontera occidental alemana, los Nazis destruyeron sistemáticamente la documentación relacionada con la investigación y fabricación del tabún y del sarín. A comienzos de 1945, Dyernfurth fue abandonada y toneladas de agentes neurotóxicos se vertieron al Oder. Se intentó demoler la fábrica, pero los rusos la rodearan antes de que pudieran hacerlo y luego la Luftwaffe intentó bombardearla pero falló en su intento: se cree que lo soviéticos capturaron la planta de producción de tabún y la piloto intactas y luego cogieron la planta de producción de sarín de Falkenhagen y grandes cantidades de sarín, de metilfósforo fluorhidrato, de pinacólico y de di-isopropilaminoetil metil fosforotiolato. La factoría de Dyernfurth continuó funcionando en 1946 bajo la dirección soviética.

Los documentos que detallaban el descubrimiento de somán, fueron enterrados en una mina 10 milllas al este de Berlin, donde los encontraron los soviéticos. La URSS estuvo produciendo y almacenando somán durante la guerra fria.

Los científicos alemanes Meyerhoff y Nachman, que habían emigrado a USA al llegar Hitler al poder, habían sintetizado antes de la IIGM, el diisopropilfluorfosfato o diisopropilfosfofluoridato (DFP), que se desestimaron como agresivos; despues sintetizaron el TEPP, el Paration y el OMPA. El laboratorio inglés de armas químicas de Porton Down, investigó estos compuestos y obtuvo el VX hacia 1951 comunicando sus datos, al laboratorio de armas quimicas de Edgewood en USA que investigó sistemáticamente todos estos compuestos y los americanos construyeron en 1959 una fábrica y entre 1961 a 1968 estuvieron produciendo secretamente VX. Schraeder, que en esas fechas trabajaba en la Farbenfabriken Bayer AG, preparó el S-[2-(dietilamino)etil]-O-isopropil metilfosfonotioato. Tammelin obtuvo en el Laboratorio de defensa química sueco el S-[2-(dietilamino)etil]-O-etil metilfosfonotiolato y el S-[2-(dimetilamino)etil]-O-isopropil metilfosfonotiolato.

El 16 de julio de 1998 la sala del juzgado del distrito de Tel Aviv presidida por el magistrado Amnon Strashnov, condenó al empresario Najum Manbar de 52 años, por traición «por ayudar a un país enemigo —Irán—» por vender material para producir iperita y un agresivo nervioso, así como equipos para construir plantas a fin de fabricar cabezas químicas, venta con la que se enriqueció. Por cierto que el diputado laborista Nisim Zvili y el abogado defensor de Manbar Amnon Zijroni, plantearon la posible intromisión de primer ministro israelí, Benjamín Netanyahu, en el juicio por supuestas presiones al juez Strashnov para que la sentencia fuera particularmente dura y ejemplar, para destacar su integridad respecto a los anteriores primeros ministros laboristas Isaac Rabin (asesinado en 1995) y Simón Peres, que no llegaron a detener a Manbar, porque el empresario había donado dinero a su partido.

Es díficil conocer la verdad de los hechos cuya responsabilidad trasladamos a la fuente. USA había negado en repetidas ocasiones que no había efectuado cacerías de desertores en Vietnam de los que solo contabilizaba a dos y menos de haber utilizado gas nervioso. La CNN presentó el 7 de junio de 1998 un documentado reportaje realizado por Peter Ar-

nett, veterano corresponsal de guerra en Vietnam y posteriormente en Bagdad durante la Guerra del Golfo La Operación «Tailwind» es decir «Viento de Cola» fue llevada a cabo en Laos por el Grupo de Estudios y Observación, una unidad secreta autorizada para emplear cualquier medio excepto armas nucleares. El teniente Robert Van Burskirk narró el ataque a un poblado y el modo en que dio muerte a dos desertores americanos con una granada de fósforo mientras el resto del comando mataba a la población. Según el capitan Eugene McCarl, «la mayor parte de la gente no eran combatientes. Al final había quizás más de cien muertos» entre los que se contaban probablemente una veintena de desertores, que eran el objetivo del ataque. En numerosas ocasiones la «Operación Tailwind» incluyó bombardeos de gas nervioso «sarín», el mismo que fue utilizado por una secta en el metro de Tokio. Según el soldado Michael Hagen, no olía y apenas se veía. La gente devolvía y se retorcía en el suelo. No creo que pudieran escapar». Solamente los comandos, provistos de máscaras, sobrevivían. En una ocasión el gas nervioso mató también a sesenta «montagnards» sudvietnamitas que acompañaban como apoyo en la jungla de Laos al comando americano en la cacería de desertores. Estos hechos fueron confirmados por el almirante Thomas Moorer, a la sazón jefe del Estado Mayor conjunto, «por respeto a la Historia».

Los egipcios debieron temer ser atacados con OF en la guerra del Yom Kippur de 1973, pues algunos carros de combate capturados por los israelies llevaban equipos de descontaminación personal,e inyectables de TAB soviéticos, preparados para proteger del somán. egipcios, (Harris y cols.1982)

Es posible que se tratara de un organofosforado el «blue-X» empleado por el ejército soviético en los años 80 contra los sublevados anticomunistas en Afghanistán que inmovilizaba inmediatamente a los afectados varias horas.

Guerra Irán-Irak.A mediados de marzo de 1983 algunos informes de Irán, denunciaron el empleo desde 1980, por los iraquies de agresivos nerviosos, al menos en diez ocasiones. Los OF así como la iperita, ampliamente empleada, procedían de una planta química construida por técnicos de la empresa «Karl Kolb» de Alemania Federal. En octubre de 1983 se produjo un ataque en el frente Norte sin que hubiera respuesta internacional, lo que estimuló a Iraq a proseguir con estas agresiones. En febrero de 1986 Irak ata-

có al-Faw, con iperita y con tabún causando más de 10.000 bajas a los iraníes. El Secretario General de la ONU, el peruano Pérez de Cuellar seleccionó un grupo de expertos La ONU constituyó un grupo de expertos formado por un médico español, un coronel de artilleria suizo, un químico sueco y otro australiano coordinados por el funcionario de NU Sr. Rhiza. La misión, que realizo ocho informes en diferentes agresiones, llegó por primera vez a Irán en marzo de 1984 elaborando varios informes, siendo el primero el S/16433,en 1984, el s/16443-s/17911-s/ 18852 en 1986 y el s/16443-s/17911- s/ 18852 en 1987 basados en las inspecciones efectuadas en los frentes, en los examenes clínicos de los afectados y de los cadáveres estudiados en el frente y en los atendidos en Hospitales de Campaña situados cerca del frente y en la retarguardia, confirmando el empleo de agentes nerviosos en guerra. Los análisis del contenido de las municiones esecialmente las que no llegaron a explotar lanzadas por aviones iraquies, tomando muestras de los mismos y de la tierra cercano a las zonas de impacto, que analizadas in situ y enviadas para confirmación a varios laboratorios que confirmaron el empleo de bombas de aviación, conteniendo iperita y otras tabún arrojadas sobre el ejército irani, contenían tabún mas monoclorobenceno a una concentración semejante a la utilizada por Schrader y cols. Lo que sugería que podría proceder del tabún alemán u obtenido por el mismo método.

Además, unos 100 soldados iraníes fueron enviados sin intervención estatal, a Hospitales del RU, Alemania, Bélgica y luego a España en los que se corroboró el empleo de agresivos químicos.Como consecuencia quedó probado el uso masivo por Irak de agresivos químicos entre ellos la iperita y el tabún. Heyndricks catedrático de tóxicología de Gante, confirmó el empleo de agresivos químicos en la masacre de Halabja y los químicos de Porton Down hallaron OF en muestras de suelo. Médicos de la organización de médicos para los derechos humanos de USA visitaron en junio de 1992 Birjinni a unos treinta km de la frontera turca y encontraron sarín en muestras de tierra en donde habían caido proyectiles. Los informes de los expertos de UN fueron difundidos por los medios internacionales sobre todo cuando llegaron a USA un varón, una mujer y tres niños no emparentados, afectados por la iperita, para ser tratados por un médico iraqui residente en ese país.

Irak empleó agresivos químicos reiteradamente contra los kurdos, et repartida en los territorios turco, sirio, iraní e iraquí, lo que fue denunciado por el «Mullah» Mustafa Barzani a la ONU ataques que siguieron efectuando

contra poblaciones no militarizadas y contra unidades de los Peshmerga que culminaron con el ataque a Halabja, ciudad iraquí, de unos 17.000 habitantes Halabja fue bombardeada la tarde del 18 de marzo de 1988, cinco meses antes de terminar la guerra, por 20-25 aviones iraquies, que transportaban bombas conteniendo iperita o sarín, como represalia a la alianza entre los kurdos iraquies con Irán, para vengar la derrota en la regíón en la que fueron hechos prisioneros varios generales, para detener el avance irani en territorio iraqui, impedir la ocupacion de Halabja y como advertencia de las consecuencias si seguían avanzando. Esta masacre, el Auschwitz kurdo, como fue llamado este genocidio contra los kurdos,causó unas 5.500 muertes inmediatas, llenándose las calles de cadáveres cuyos rostros estaban distorsionados por la asfixia; impresionanten los testimonios gráficos como la fotografía del cadáver de un hombre en los umbrales de su casa abrazado al cuerpo de su hijo en un inútil gesto protector. Emocionante el testimonio de Mohamad Azizi, de 25 añosm en el periódico «Le Monde» del 8 de abril de 1988 «Mis ojos se hacen pesados, me duela cada inspiración que hago; he vomitado 8 o 9 veces... «Cada vez que abro la puerta de una casa hay niños, mujeres y hombres muertos o agonizando» Otros 6.000 haitantes de Halabja fueron intoxicados con sintomas de asfixia; las decenas de miles que quedaron indemnes y los que estaban poco afectados huyeron al cercano Irán en donde algunos fueron atendidos, por el equipo de UN. El ataque aniquiló la vida vegetal y animal. En la guerra Irán-Iraq de 1980-1988, se elaboraron numerosos informes, declaraciones y denuncias de que Iraq estaba empleando agresivos químicos con escasa respuesta internacional.

Nuevamente en agosto de 1988, Hussein atacó varios pueblos del norte del país habitado por kurdos mediante iperita y tal vez sarín e iperita causando 8.000 a 24.000 muertes según las diversas estimaciones.
En lo 12 meses siguientes los iraquies atacaron con AQ pueblos, personal civil y unidades aisladas de Peshmerga. No creemos que Sadan Hussein usara Scud-B soviéticos cuyas cabezas contuvieran VX para atacar Teheran, como cree posible Findlay (1991). El Gobierno irani estimó que fueron afectados por iperita, tabún y sarín 60.000 soldados.

Desde el 18 de enero al 28 de febrero alcanzaron Israel 39 Scuds modificados procedentes de Irak, algunos en o en los alrededores de Tel Aviv, que solo mataron a dos personas e hirieron a 336,aunque fueron asistidas en Hospitales a 544 pacientes con crisis de ansiedad, y a 230 por sobre-

dosis de atropina. Si hubieran contenido agresivos químicos los efectos habrian sido mucho mayores. (Karsenty y cols. 1991).

Probablemente grupos iraquies en lucha contra las fuerzas de la coalición que invadió Irak en 2003 encontraron restos de los arsenales de proyectiles conteniendo iperita o sarín que quisieron emplear contra las fuerzas de ocupación. El general Kimmitt, portavoz de la Coalición reveló el 17 de mayo de 2004 en Bagdad que tres días antes se había encontrado cerca del aeropuerto de Bagdad, en una bolsa, un proyectil de artilleria de 155 milímetros, conteniendo sarín que afectó a dos soldados del equipo de desactívaclon de explosivos cuando manipulaban el proyectil, temiendo que hayan podido apoderarse de reservas importantes de agresivos químicos. El 7 de mayo se habia encontrado un proyectil con iperita

Al haber demostrado el tabún y el sarín en la guerra Iran-Irak, que pueden detener ataques masivos de infanteria y neutralizar posiciones estáticas, más eficazmente que la iperita como arma de desgaste hizo pensar que se usarían en la Guerra del Golfo, substituyendo el tabún por los más agresivos sarín, VX y por somán. Irak con Siria disponían de suficientes armas químicas para neutralizar las bases militares israelíes. En 1990 USA tenia 6 almacenes en su territorio (CONUS) otro en la isla Johnston en el Pacífico y otras fuera del país, de agresivos OF en cohetes M55,en minas terrestres y en proyectiles y bombas de diverso calibre y peso; wet-eye bombs tanques para diseminarlos en forma de aerosoles y en camiones cisterna. Según los Servicios de Inteligencia, muchos países tienen la tecnología necesaria para fabricar agresivos organofosforados.

En abril de 2003 soldados norteamericanos encontraron en las afueras de Tikrit 14 bidones de 200 litros cada uno en los que los detectores físicos dieron positivo para el sarín y la iperita, que fueron enterrados. El 17 de mayo de 2004 el Administrador Americano de Irak comunicó que habían sido encontradas carcasas con Sarín.

LOS AGENTES NERVIOSOS Y EL TERRORISMO

El 27 de junio de 1994, se diseminaron 12 Iitros de sarín que se repitieron otros días, en la ciudad japonesa de Matsumoto por miembros de la secta Aum Shinrikyo, en la que se intoxicaron unas 600 personas con

efectos nicotínicos y muscarínicos, (taquicardia seguida de bradicardia, señaladas por Suzuki y cols. (1997), mientras que Nakajima y cols. (1998) predominio de los muscarínicos. Los mas afectados tenían a los 20 días, discreta hipertermia y alteraciones electrográficas y en los que tenían disminuida la colinesterasa plasmática presentaron arritmia y polineuropatía sensorial, que persistió siete meses Entre los afectados hubo 18 socorristas que no estaban protegidos, y se produjeron siete muertos: esta agresión, se repitió varias veces.

El 20 de Marzo de 1995, se produjo un atentado terrorista con sarín en 5 vagones de 3 de las 10 líneas de metro que afectó a 15 estaciones del metro de Tokio que transporta diariamente varios millones de viajeros en esta ciudad de 12 millones de habitantes. Hubo que atender a 5.510 personas, de las que murieron 9 en el lugar del accidente y 3 posteriormente, hubo 984 intoxicados moderadamente, 37 con intoxicación grave y 17 intoxicados (Woodall 1997).

El rescate fué complicado; 530 fueron evacuados por ambulancias y los demás por taxis, coches furgonetas y andando. Kulling y cols. (1995) relatan así el episodio: A las 08,16 horas el Servicio de Bomberos de Tokio fue avisado de que se habia producido una «explosión de gas». A las 8,28 horas llegó a pie el primer paciente al Hospital St. Lukes en el que fueron atendidas 1.410 personas. A las 8,43 horas llegó la primera ambulancia. El flujo llegó a ser de mas de 500 pacientes por hora. A las 9,20 horas se puso en marcha el protocolo para desastres. Los pacientes se fueron acomodando en la capilla del hospital. El 45% eran mujeres, cuatro embarazadas y 13 niños. El 83% de los ingresados fue cñasifciado como leve,de los que 37% fueron de alta a kas pocas horas, 7,6% moderadamente afectados, y 17 graves, de los cuales uno falleció en la sala de urgencias, tres tuvieron parada cardiorespiratoria, recuperarandose, dos aunque uno de estos quedó con una lesión cerebral grave. Los síntomas fueron los típicos de la intoxicción por OF: irritación ocular, miosis, visión borrosa, sudoración, oleadas de calor, sensación de malestar general, vómitos, calambres abdominales, molestias torácicas, insuficiencia respiratoria, cianosis, fasciculaciones, debilidad muscular y parálisis flácida. En resumen tuvieron cuadros oculares el 99%, disnea el 6l%, naúseas el 64%, y cefalea el 64%. y solo el 9 % tuvo bradicardia. La colinesterasa estaba disminuida en el 74%, el 11% tenía aumentada la CPK, el 60 % leucocito-

sis, el 67 % alcalosis respiratoria y elevación de la CP el 11%. El ECG estaba alterado en el 37 % de los pacientes, mostrando el 7 % alargamiento del espacio QT. Este atentado del metro de Tokio y los efectuados con fosgeno el 5 de marzo y el 19 de abril de 1995 y con cianhídrico el 5 de julio de 1995, fue atribuido por la Policia a la Secta Aum Shiri Kyo «La Verdad Suprema» La policia encontró una planta química dentro del gigantesco recinto que la secta poseía cerca del monte Fuji en la que había grandes cantidades de productos químicos incluidos los necesarios para sintetizar sarín. Se detuvo al alba del martes 16 de marzo de 1995, al «guru» de la secta Shoko Asahara, cuyo nombre real era Chizuo Matsumoto y a sus cómplices entre ellos el «ministro» del servicio de informacion Yoshiro Inoue quien dirigió personalmente la masacre del metro, al abogado de la secta que difamó a un fabricante de fertilizantes al que acusó de haber atacado a componentes de la secta con gas. Formaban parte de la secta varios miles de personas embaucadas por su guru, a las que habia hecho creer en el proóximo fin del mundo, del que solo se salvarían el y sus fieles. Disponian de empreesas, entre ellas algunas dedicadas a la compra de armas en el mercado negro procedentes de la descomposición de la URSS. Tenían progaramas para obtener agresivos químicos y microbiológicos. La detención de Shoko Asahara se produjo, en el edificio Satyan del amplio complejo de sus instalaciones de Kamikuishiki, en la falda del monte Fuji, a unos 100 kilómetros al oeste de Tokio. En la espectacular operación participaron 2.000 agentes que desde la madrugada cercaron la nave de tres pisos donde Asahara había fijado el recóndito escondite para el y su familia. Los telespectadores madrugadores pudieron ver las unidades antidisturbios, salir en plena noche de sus cuarteles provistas de motosierras eléctricas, palancas y soldadores para abrirse camino a través de los tres pisos, compartimentados en numerosa cubículos, que servían de alojamiento a otros altos dirígentes de la secta. Al ser trasladado a media mañana a la comisaría central de Tokio, el público se agolpaba para ver el paso de la comitiva. La detención y la explosión de un paquete bomba unas horas despues en el Ayuntamiento de Tokio,que hirió a un funcionario municipal, causó alarma en Japón ante la posibilidad de nuevos atentados que obligó a movilizar a más de 20.000 policías en Tokio. La secta disponía de planos de armamento muy sofisticado y potente proporcionado por militares miembros de la secta. Adeptos de la secta confesaron haber destruido documentos de cientos de páginas que de-

tallaban como liberar sarín en el centro de Tokio con un vehículo frigorifico remodelado y que se habia ordenado ya la fabricacion de sarín y de otros agresivos. El 13 de abril de 1995, la Policía japonesa detuvo a Kiyohide Nakada, de 47. años, identificado como militante de la secta Aum Shiri Kyo por extorsIonar a oficiales de de la prefectura de Aichl y sospechoso de haber colocado en el Metro de Tokio una bolsa con el sarín. Para añadir ambiente mafioso ha trascendido que el «ministro de asuntos internos de la secta» utilizó VX, para matar a un hombre que conocia el tráfico de drogas que efectuaba esa secta.

El primer ministro, Tomiichi Muraywm, tras reunirse con el Gabinete de crisis, convocó una rueda de prensa en la que elogió la labor investigadora y policial y trató de tranquilizar a la población, asegurando que la vigilancia se mantendrá ante la posibilidad de que quedara sarín almacenado. Si el sarín hubiese sido más concentrado se habrían producido miles de muertes. Acusado de haber ordenado a sus secuaces la fabricación de sarín y de organizar el atentado del metro de Tokio, Asahara negó su participación en el atentado arguyendo que «¿Como pueden decir que una persona ciega como yo ha participado en un ataque semejante?. Posteriormente el fiscal solicitó para el guru la pena de muerte, siendo condenado a morir en la horca, el 27 de febrero de 2004, al cabo de ocho años por 13 crímenes entre ellos el ataque en el metro de Tokio con sarin en 1995. Fueron ejecutados 11 de los dirigentes de la secta.

Los terroristas de «La Verdad Suprema» detenidos declararon que habían efectuado cuatro atentados, dos de ellos contra la misma persona, el 28 de noviembre, el 12 de diciembre de 1994 y el 4 de enero de 1995, uno de los xuales falleció, por medio de VX, (Nozaki y cols. 1995, Kaplan y cols. 2000)

El corresponsal Nic Robertson de la CNN obtuvo en Afganistán 250 cintas de videos procedentes de Al Qaeda, de las que seleccionó 64 que fueron presentadas en sus programas en agosto de 2002; alguna contenía imágenes del atentado de las Torres Gemelas aunque la mayoriá son anteriores; en algunas se ve a Bin Laden, rodeado por varios miembros de Al Qaeda con uniformes de combate, visitando un campo de entrenamiento en 1998. Otras explican como fabricar explosivos, secuestrar a mano armada o volar un puente. En una de las cintas, puede verse a un perro labrador blanco, con una correa verde al cuello; un hombre con el típico ropaje afgano, sin nin-

guna protección en el rostro, vierte en el suelo un líquido del que empieza a emanar un vapor; el hombre sale del recinto, el perro sufre terribles convulsiones, y el perro babea, humilla su cabeza, ceden las patas traseras, no puede levantarse pese a sus intentos, hasta que al cabo de unos minutos, solo puede mover la cola; otrp video mostraba las imágenes de tres perros agonizantes tras inhalar vapores de un líquido servido en una bandeja. Algunos expertos pensaron que el agresivo sería cianuro o sarín. Más importante es el testimonio de Julio Fuentes, enviado de Mundo, a Afganistán escrita el 18 de noviembre de 2001, un día antes de ser asesinado

En una visita a Farrn Hada, 20 kilómetros al sur de Jalalabad, el mayor acuartelamiento de «Al Qaeda» en Afganistán, observó a su alrededor, que el terreno estaba cubierto de granadas, minas sin instalar, proyectiles de artillería y anticarro, cohetes apilados y misiles enfundados en desgarradas fundas -todo de fabrícación rusa o china- y la que me pareció identificar como una moderna trampa explosiva sin activar. Lo más inquietante de la base Farm Hada eran unos 40 grandes contenedores cerrados con candados de fabrícación china. Algunos contenedores inspeccionados exhibían pegatinas de compañías estadounidenses».

Junto al único contenedor que tenía la puerta entreabierta, aunque enganchada con una cadena había unas 30 cajas, conteniendo cada una 10 ampollas, más 300 delgadas ampollas de finísimo cristal, tiradas bajo el sol en el pedregoso suelo. Las ampollas de unos siete centímetros contenían líquido casi transparente, aunque tirando a amarillo. Aún ignoraba lo que tenía entre las manos, pero tras deletrear varias veces las cinco letras en cirilico empecé a temblar; figuraba la inscripción SOMAN/SARlN/V-GAS. Las etiquetas advertian que si se iba a manipular el contenido se deberian leer las instruccione y que el único antídoto para evitar la muerte es una inyección de Antropina.

PATOGENIA DE LA INTOXICACIÓN POR AGRESIVOS ANTICOLINESTERÁSICOS

La toxicidad de los OF depende básicamente de la hiperestimulación de los receptores muscarínico y nicotínico de los sistemas nervioso central y periférico, por la acetilcolina en exceso al estar inhibida la colinesterasa sináptica

El paratión, el sistox (Rider y cols. 1969) y el malatión, inhiben preferentemente a la colinesterasa plasmática, mientras que otros como el dimefox y el mevinphos, (Rider y cols. 1975) lo hacen a la de los hematíes aunque dosis elevadas inhiben a ambas. Tambien influye la especie y así el paratión en la rata inhibe más a la colinesterasa plasmática mientras que en el perro lo hace fundamentalmente sobre la de los globulos rojos. Una dosis bajas de VX disminuye al menos un 79% a la colinesterasa eritrocítica, (Sidell y cols. 1974, Sim 1962), mientras que lo hace en un 20% a la plasmática. Grob y cols. (1958) con el sarín vieron inhibición de un 90% y del 40% respectivamente.

Los OF que no se gastan al unirse a proteinas lo hacen con la colinesterasa plasmática que protegen a la tisular de modo que solo se empieza a inhibir esta cuando las otras, especialmente la de los glóbulos rojos se han inactivado en una gran proporción. (Ketchum y cols. 1973, Grob y cols. 1947), Una dosis baja de DFP en el hombre que llega a inhibir el 90% de la colinesterasa plasmática solo inhibe el 15-20% de la de los hematíes. La disminución de la actividad colinesterásica, en los expuestos a organofosforados, no es un efecto adverso sino un biomarcador de la posible afectación de la enzima en la sinapsis. (Carlock 1999, Brimijoin 1999, Bigbee y cols. 1999, Oliveira-Silva, 2000,Weiss 2000) En los estudios de exposición ambiental existe bastante dificultad para documentar el grado de exposición a los plaguicidas inhibidores de colinesterasas. Las vías de ingreso en general son respiratoria y piel, la absorción que se produce es variable. El contacto con el plaguicida puede ser distinto, de acuerdo con la protección personal que se utilice, la forma de aplicación de la sustancia y sus características particulares. El resultado final sobre el sistema colinérgico no siempre puede documentarse, bien porque el efecto sucede tardiamente y no puede aclararse la exposición, o bien porque los síntomas y signos son muy inespecíficos.

Luego y menos activamente, se inhibe la colinesterasa vera. Solo cuando la colinesterasa plásmática ha disminuido un 35% aparecen síntomas sin que exista correlación entre el grado de inhibición de la colinesterasa en suero y la gravedad de las manifestaciones salvo al inicio de la intoxicación aguda. La inhibición también se ejerce sobre la colinesterasa de las sinapsis colinérgicas del cerebro pues casi todos los OF atraviesan la barrera hemato-encefálica debido a su solubilidad (el ecotiopato no es liposoluble).

El efecto depende del agente, de su capacidad para atravesar las membranas celulares de las mucosas y de su metabolización, de la puerte de entrada, de la dosis absorbida (Moore 1998) influida por la temperatura y humedad ambientales.

La entrada digestíva tiene poca importancia. La ingesta de una dosis baja de VX causa síntomas a las 2-3 horas (inyectada tardan una la hora (Loewenstein y cols. 1995). El grado de dispersión y volatilización del agresivo, influyen en la absorción respiratoria. Un máximo del 10% sarín se elimina con el aire expirado. (Oberst y cols. 1961, 1968)

Los vapores o los aerosoles de los organofosforados pueden penetrar por la mucosa ocular, nasal, oral y sobre todo por la broncoalveolar, causando efectos en las piertas de entrada como conjuntivitis, escozor ocular, miosis que si un ojo está protegido es unilateral y rinorrea, que no se deben a la inhibición de la colinesterasa.

(Harvey 1952, Craig y cols. 1959) si no a una acción local. Johns en 1952, vió correlación entre el grado de exposición al sarín y la miosis, pero otros autores no encuentran asociación con la disminución de la colinesterasa vera. Los efectos de la exposición por vía aerea dependen del producto de la concentración media «C» en el aire, expresada en mg/m3 y del tiempo «t» generalmente en minutos, de exposición es decir mg•min/m3. Puede establecerse una Ct50 en la que el tiempo es el necesario para que a la concentración «C» aparezca el síntoma o signo considerado en la mitad de los expuestos. El producto Ct representa la exposición sin que signifique que la concentración y el tiempo sean intercambiables con tal que el producto se mantenga (ley de Haber) aunque es válida para intervalos pequeños. La Ct50 para los vapores de tabún es de 400, para los del sarín 100 para los del somán 50 y para los del VX 10. (la del cianhídrico es 2.500 a 5.000 mg•min/m. Unos pocos mg de VX, sobre la piel pueden causar la intoxicación. Una Ct de 2 mg•min/m^3 puede causar miosis y rinorrea. (Johns 1952, Sidell 1974. Exposiciones intensas pueden causar pérdida de la consciencia, a veces poco despues de la exposición, convulsiones, parálisis respiratoria y cardiaca y la muerte Los efectos aparecen a los pocos minutos de una exposición a una Ct de 10-200 mg•min/m3 pudiendo llegar la muerte a los 10 a 15 minutos.

La DL50 percutánea aplicada entre 0 a 37ºC, es para el tabún, 140 mg/kg, para el sarín 250, para el somán 50 mg y para el VX, 0,085 a 0,15 mg/kg, ya que por su escasa volatilidad permanece mucho sobre la piel.

La piel permite la entrada más díficilmente, que la vía respiratoria y por ello, la latencia puede llegar a treinta minutos; la absorción es mas rápida en cabeza y cuello, seguida de las extemidades y luego de la del tronco. La transpiración y la vasodilatación debidas al calor favorecen la entrada cutánea. Craig y cols (1977) vieron que el VX aplicado sobre la piel, disminuía tanto mas a la colinesterasa cuanto mayor fuera la temperatura ambiente; la máxima inhibición tenía lugar a las 5,6 horas a 100°C, y a las 8,5 horas si era 68°C, de 10,4 horas, si era 51°C, y 12,2 horas a 31°C.

Una vez entrado en el organismo el organofosforado se une a proteínas plasmáticas y tisulares compitiendo con otros OF; así el triortocresilfosfato impide la fijación de los ésteres organofosforados, como el paraxon (Lauwerys y cols. 1979) o el sarín (Plak y cols.1969). La unión a las proteínas resta actividad anticolinesterásica y tóxica. Los hepatocitos, (Little y cols. 1989), las neuronas (Ray y cols. 1988) y el plasma tienen enzimas que hidrolizan a los agresivos organofosforados. La carboxilesterasa se une e inactiva al somán, a los agentes G, pero no al VX. La diferente concentración plásmatica de esta enzima explica la diferente sensibilidad a estas substancias de las especies animales. La mayoria de los OF utilizables como agresivos se metabolizan más rápidamente que los que se usan como plaguicidas (el somán desaparece de la sangre, al cabo de 1 a 2 horas, aunque según Benschop y cols. (1999), los «G» persisten 6 a 12 horas; esta diferencia explica que las crisis colinérgicas producidas por los plaguicidas duren días a semanas. Los procesos catabólicos de los OF, varian según la especie animal (Benschop y cols. 1991); uno de ellos lo constituye su unión a la egasina, proteína que forma complejo en los microsomas hepáticos con la glucuronidasa a la que libera. Chen y cols. (2003) vieron que la paraoxonasa-1 (PON1) detoxifica al organofosfato paraoxón, separando sus oxonas activas antes de que inhiban a las colinesterasas. Los alelos del gen PON1 determinan cinco genotipos de paraoxonasa-1, debidos al polimorfismo del promotor (-909, -162, -108) y de la región codificadora (L55M, Q192R), genotipos que influyen en la actividad de la paraoxonasa-1 y a lo que se debe la diferente actividad en la sangre materna y en la cordonal. Por ejemplo, las actividades PON1 para la posición -108CC, CT, y TT de una serie de mujeres fueron 146, 128 y 109 U/mL de arilesterasa ($p< 0,0001$), mayores que las de la sangre cordonal de sus hijos 49,0, 32,4 y 23,2 U/mL ($p < 0.0001$), es decir tenían menor capacidad para detoxificar OF que sus madres.

Las fosforilfosfatasas tisulares hidrolizan a los organofosforados, sin que se inhiban por ellos, evitando que se acúmulen, aunque si lo hacen sus efectos. Al fosforilizarse las fosforilfosfatasas se hidrolizan rápidamente con el agua. Los metabolitos de los OF se excretan casi totalmente por la orina.

El principal efecto tóxico de los OF es inactivar a las esterasas, que son carboxil-éster-hidrolasas, en cuya constitución hay serina, bien directamente, como lo hacen el TEPP, el fosdrín, o por medio de sus metabolitos, como el malaoxón, el fenitrotión, del malatión, o el paraoxon del paratión. Las esterasas más importantes bloqueadas por los OF son la que hidrolizan y cortan a los ésteres de colina como la butirilcolinesterasa o seudocolinesterasa, la benzoilcolinesterasa y sobre todo a la acetilcolinesterasa plasmáticas, a cuyo lugar esterásico se unen los OF. Los OF inhiben por fosfonilación o fosforilación de la serina de la triada catalítica (Ser 200, Glu 327, His 440) situada en el centro activo de la acetilcolinesterasa (AChE) (Bernhard y cols. 1959, Millard y cols. 1999), formando un complejo enzima-inhibidor que bloquea la acción enzimática, de forma similar a la reacción de la acetilcolina con la enzima, excepto que la colinesterasa no llega a hidrolizar o lo hace lentamente, porque el complejo es mucho más estable. Así los OF son semisubstratos de la colinesterasa mejor que sustratos de la misma. (Taylor 1996). Los aminoácidos del agujero oxianiónico, constituido por dos moléculas de glicina en los locis 118 y 119 y una, de alanina en el 201. (Silman y cols. 1999) pueden establecer enlaces de hidrógeno que aumentan la estabilidad del complejo. La lenta hidrólisis espontánea del complejo OF-colinestarasa podría deberse a que la histidina de la tríada catalítica tendría modificada su orientación respecto al átomo de fósforo, que dificulta el ataque nucleofilico por el agua (Kovach 1988). Aunque también se ha atribuido a la formación de un enlace de hidrógeno del oxígeno con el anillo imidazólico de la histidina (Kovach 1988).

PAPEL FISIOLÓGICO DE LA ACETILCOLINA

Así como el sistema simpático tiene como principal neurotransmisor a la adrenalina, (tambien interviene la acetilcolina), el vagal funciona por la acetilcolina. Las fibras nerviosas autónomas terminan en los músculos

lisos de los vasos, vísceras y glandulas en forma de retículo. La acetilcolina se sintetiza en las terminaciones axónicas de la placa neuromuscular, y en determinadas sinapsis por la unión del acetato procedente de la acetilcoenzima A con la colina procedente de la sangre; estas substancias también llegan a la presinapsis de la descomposición de la acetilcolina por la colinesterasa. La colinacetiltransferasa procedente de la soma neuronal y transportada por el axón en sentido descendente hasta la terminación cataliza la síntesis de la acetilcolina.

Todas las terminaciones emiten simultáneamente acetilcolina, que al actuar sobre las moléculas receptoras de las electroplacas abren canales en la membrana sólo por la parte ventral de la célula, es decir, por la parte de la resistencia eléctrica alta. La apertura de los canales permite la entrada rápida de cationes sódicos a través de las membranas ventrales, produciendo el movimiento de estos iones una corriente eléctrica. El efecto resultante es como el de la descarga repentina de un numeroso conjunto de pequeñas baterías conectadas en serie. Una corriente eléctrica de considerable magnitud se propaga por el agua de mar circundante, ya que el campo eléctrico impulsa los iones procedentes de las sales disueltas en el agua. En un pez Torpedo californica, de tamaño medio, la corriente producida por los dos órganos eléctricos puede ser de más de siete amperios. En el Torpedo Sussman y cols. Determinaron en 1991, por cristalografía por rayos X con resolución de 28 nm que en su centro activo o tríada catalítica situada dentro de una garganta de unos 200 nm de la que forman parte los aminoácidos Glu, His y Ser, en los locis 327, 440 y 200 respectivamente que actuarían como transportadores electrostáticos. Intervibiendo en la entrada y salida de la molécula. Carece de loci aniónico para el nitrógeno cuaternario de la acetilcolina, como postularon Wilson y Bergmann en 1950.

Las neuronas responden a un neurotransmisor cuando este cambia el potencial eléctrico de la membrana polarizada respecto al potencial que tenía en reposo, haciendo que el NT pase a la hendidura sináptica. En el caso de la placa neuromuscular y en muchas sinápsis la acetilcolina del citoplasma y la de las vesículas se difunde a través de la hendidura sináptica y parte de ella, se une momentáneamente a receptores de la membrana de la célula postsináptica en donde produce otro cambio local de la resistencia eléctrica. En las fibras musculares y en algunas neuronas el

cambio no constituye más que el primer paso de la generación de otro potencial de acción: la fibra muscular se contrae o la señal nerviosa continúa su marcha. En otras células postsinápticas la respuesta puede ser inhibidora. La respuesta de la postsinápsis puede ser una despolarización o una hiperpolarización de la membrana. Para que continue la transmisión, debe descomponerse toda la acetilcolina en acetato y colina, reacción catalizada por la acetilcolinesterasa, situada en las caras externas de las membranas celulares y en la hendidura sináptica.La colinesterasa es la enzima que actúa mas rapidamente sobre su substrato es decir que hidroliza un mayor número de moléculas por minuto. Si no se inactivara a la acetilcolina por ausencia o inactivación de la enzima se acumularia la acetilcolina que seguiría produciendo potenciales postsinápticos. La acetilcolina se encuentra además de en las neuronas en las células epiteliales, en las de las vías respiratoria, digestiva y urogenital, en las mesoteliales de pleura y pericardio, en las fibras musculares y en los macrófagos, linfocitos y granulocitos. (Brewer y cols.1999). Interviene en en la regulación de las mitosis, de la diferenciación celular, en la organización del citoesqueleto, relaciones intercelulares, secreción y absorción, regula el sistema inmune y durante el desarrollo neuronal funciones de adhesividad celular. (Wessler y cols. 1999, Weiss y cols. 2000).

La «hipótesis colinérgica» atribuye el Alzheimer al déficit colinérgico por el exceso de acetilsolina apoyada porque en el cerebro de los enfermos terminales con Alzheimer, pero no en los estados iniciales de la enfermedad, está disminuida la colin-acetil-transferasa y por tanto la síntesis del neurotransmisor; también está disminuida la acetilcolinesterasa y los receptores nicotínicos (Davies, 1999, (Davis, 1999). Esta inactividad degenera las neuronas colinérgicas de los núcleos basales subcorticales que desactivan a las neuronas corticales y límbicas que intervienen en la atención, la memoria y el comportamiento. Se ensayan por ello medicamentos inhibidores de colinesterasas; la FDA tiene aprobadas la Tacrina, el Donepezil, el Exelon, la Galantamina, la Eptastigmina, y el Rivastigmir.

Acetilcolinesterasas

Las esterasas son α/β-. hidrolasas cuyo acrónimo es ESTHER para las que Cousin y cols. (1997) elaboraron una base de datos con las se-

cuencias de aminoácidos de un grupo homogéneo de proteinas derivadas de un mismo ancestro. Su estructura de plegamiento es α/β con una lámina-β central muy retorcida, con 8 a 11 ramas, muchas de ellas paralelas, flanqueada en ambos lados por hélices ((Krejci y cols. 1991, Shrag y cols. 1991, Sussman y cols. 1991, Ollis y cols. 1992). (carboxilesterasas,lipasas y lipasas hormono-sensibles, hidrolasas, moléculas de adhesión, prehormonas). Con estas esterasas están relacionadas filogénicamente las colinesterasas. Las proteinas plegadas de modo α/β, están formadas por tres subfamilias la C, la L y la H. Las proteinas de la subfamilia C de la que forman parte las acetilcolinesterasas, tienen estas dos posibles secuencias aminoácidicas: la ps00941 que tiene la secuencia [ED]-D-C-L-[YT]-[LIV]-[DNS]-[LIV]-[LIVFYW]-x-[PQR] y la ps00122 cuya secuencia es: F-[GR]-G-x-x-x-x-[LIVM]-X-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G en la que se representan aminoácidos alternativos posibles entre corchetes y x representa cualquier aminoácido. Las colinesterasas, son mucopolisacáridos de pm es 165.000 unido enérgicamente, en un 95 % a la alfa-2-globulina, y el 5% a la albúmina, como demuestra la electrofóresis, uniones que impiden que pase a los tejidos. Las acetilcolinesterasas presentan en cada organismo mútiples formas moleculares producidas por la oligomerización y unión a otras proteinas a glicolípidos o a ambos.

El hombre tiene dos acetilcolinesterasas: La acetilcolinesterasa falsa, o pseudocolinesterasa o plasmática o butirocolinesterasa abreviadamente BUCHE, o BuChe, CHE o CHAC, presente en el plasma. La colinesterasa plasmática, es la acilhidrolasa CE, 3-1-1-8, de la clasificacion numeral de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica de 1961. (una colinestersa distinta de la BuChE tiene como substrato preferente a la butirilcolina del plasma y de algunos tejidos).

Se sintetiza en el hígado, lo que hace que esté disminuida en las hepatopatias, en las infecciones, en enfermedades crónicas y en la malnutrción y aumentada en el síndrome nefrótico. Su vida media oscila según los diversos autores entre los 10 y los 50 días.

Hay amplias variaciones interindividuales, de la concentración de las colinesterasas, pero cada persona mantiene muy constante su nivel de acetilcolinesterasa plasmática (Wetstone y cols., 1965), aunque su concentración sérica aumenta algo en el posprandio. Las mujeres tienen un 10

a 15% menos que el varón y disminuye algo en la gestación y en el recién nacido.

Wetstone y cols. (1965), Sidell y cols. (1975) encontraron que el coeficiente de variación (sigma dividido por la media de la actividad de su colinesterasa plasmática era en ambos sexos el 5 al 11,8%, llegando en un año a ser del 24 al 50%. La tasa de la colinesterasa plasmática en las mujeres no varia con la edad (Shanor y cols. 1961, Sidell y cols. 1975) hasta los 60 años, mientras que en el varón para algunos aumenta con la edad y en otros baja En estudios pareadas por la edad, la tasa era mayor en el varon y menor en las mujeres que tomaban anticonceptivos. (Robertson 1967, Whittaker y cols. 1971)

Leuzinger Baker, extrajo en 1967, la enzima, del órgano eléctrico de la gymnota, anguila gigante del Amazona, que está formado por una hilera de unas 5.000 células, cada una con una diferencia de potencial de unos 100 milivoltíos, formando una pila Volta cuya diferencia de potencial, suma de todas las células, permite al animal producir descargas de unos 600 V, que utiliza para paralizar a sus presas.

Las personas que desarrollan parálisis duradera al inyectarles succinolcolina, un relajante muscular usado en anestesia, suelen tener, pero no siempre, una baja BuChE. Neitlich (1966) publicó el caso de una persona cuya colinesterasa era el triple de la normal con número de dibucaina normal, que era relativamente sensible a la succinilcolina. Su hermana y su hija tenian tambien elevada la colinesterasa lo que podria indicar herencia dominante debida a una diferente mutación.

Para Bigbee y cols. (1999), la AChE intervendria en el desarrollo neuronal durante el desarrollo embrionario, independiente de su acción sobre la acetilcolina.

La BuChE está codificada por dos alelos autosómicos. Un gen el E1u mutado, pasa a E1a cuya frecuencia es 0,025 a 0,05 %. Los homozigotos normales (E1u E1u), el 96,2 por 100 de la población, según Goedde y cols. (1963). El número de dibucaína, es el porcentaje de inhibición de la colinesterasa producido por una solución 0,01 mol de dibucaína a pH 7,4 y a 26ºC valorado por su acción hidrolítica sobre la benzoilcolina. (Kallow y cols. 1956). Los homozigotes (E1u E1u) tienen un número de dibucaina medio de 79%. Estas personas no tienen apnea con los curári-

cos succinilcolina suxametonio pues la colinesterasa los hidroliza. A las dosis habituales la relajación comienza a los treinta segundos de la inyección y se prolonga dos a cuatro minutos.Estos homozigotes no se inactivan con concentraciones bajas de OF. Loewenstein y cols. (1995) señalan que los homozigotos tienen respuestas exageradas a los anticolinesterásicos. Los heterozígotes, (E1a E1u) tienen un índice de dibucaina entre el 30, generalmente desde el 43, al 70. El 3,6% de las personas pertenecen a este tipo; su múmero de dibucaina es 62%. Los homozigotes anormales (E1a E1a) tienen poca colinesterasa plasmática con un número de dibucaina siempre menor de 30, la mayoria de 20 siendo el mas frecuente 16% (Kalow y cols. 1957); la succinilcolina les provoca apnea persistente por la parálisis de la musculatura respiratoria, que requiere respiración asistida y transfusiones de sangre reciente.Estas personas son muy sensibles a los OF. Constituyen el 0,12 al 0,25% de las personas (Goedde y cols., 1963), aunque para otros sólo en el 0,025%, y para Kallow y cols. el 0,03% de los canadienses.

Otro alelo produce una colinesterasa con poca actividad esterásica que resiste a la dibucaína, la percaína o la nupercaína, anestésicos locales que son inhibidores esterásicos, cuya afinidad para la bencilcolina cien veces menor que la de la típica.

Linddell y cols. (1962) encontraron el primer caso de deficit de colinesterasa en los que el gen es silente y que no tienen o como máximo el 2 % de actividad colinesterásica plasmática. Una de cada 20.000 personas carecen de colinesterasa plasmática sin presentar ningún síntoma pero cuando se les administra succinilcolina se les produce apnea prolongada.

Harrs y Whittaker (1961) utilizaron de forma semejante a la dibucaina el fluoruro sódico otro inhibidor esterasico. Denominan número de fluor (FN) al porcentaje de inhibicion que causa el fluoruro sódico. La resistencia de la enzima al fluoruro es genética debida al gen (El') que es alelo de los anteriores, siendo los homozigotos El, sensibles a la succinilcolina y los heterozigotos El,-El' y los E,, moderadamente sensibles a este relajante muscular. Whittaker y cols. (1977) encontraron en enfermos mentales tratados con litio un aumento significativo de la frecuencia del gene E. La enzima que codifica es algo menos sensible que la variante dibucain resistente a la inhibición por los nitratos de sodio o de litio.

La membrana de los hematíes, tiene una acetilcolinesterasa, llamada auténtica, verdadera, vera, abreviadamente AchE o ACHE; su sigla internacional es «CE 3-1-1-7». Se desconoce las funciones fisiológicas de las colinesterasas de los hematíes ni de la plasmática pero como se determinan sencilla y rápidamente (Grob 1956). Después de la exposición a OF la colinesterasa plasmática se normaliza en 3 a 8 semanas, mientras que la de los hematíes requiere tres meses. Grob y Harvey (1958) observaron en 10 voluntarios, a los que se les administró sarín por vía oral (4.10^{-6} a $2{,}5.10^{-4}$ M), que la colinesterasa plasmática, que producen los hepatocitos, se normalizaba en unos 40 días y la de los hematíes, producidas por los eritroblastos que conservan los hematíes. La AchE, es una acetilhidrolasa, es decir es una acilhidrolasa casi específica de los ésteres acéticos de la colina y de la tiocolina, a los que hidroliza desdoblándolos en ácido acético y en colina sin que hidrolice a la succinilcolina. La acetilcolinesterasa vera se sintetiza en el hígado, pasa a los hematíes,en la eritropoyesis, especialmente al formarse los reticulocitos, por lo que se designa también como (RBC-ChE).

Los globulos rojos la reparten a los órganos. Su vida media es de 120 días. Disminuye en las anemias, especialmente en la de Biermer, y aumenta cuando lo hace la eritropoyesis.

La tasa de la colinesterasa de los hematíes es más estable que la de la plasmática. (Callaway y cols. 1951, Augustinsson 1955). Annas (1992) en un año de observación encontró que el coeficiente de variación era de 2,1% a 3,5% en el varón y de 3,1 a 4,1% en las mujeres con rangos de 7,9 a 11,4% en varones y de 12,0 a 15,9% en las mujeres, variaciones menores que las del hematocrito. Metcalf (1984) no encontró que la edad influyera, para Takade (1984) aumentaria desde los 30 a los 60 años especialmente en el varón.

Johns (1962) encontraron una tasa baja en tres miembros de una familia, que le hizo pensar que se trataba de una característica genética. Tambien se desconoce el papel fisiológico de la colinesterasa de los hematíes.

La colinesterasa de los hematíes pasa a los órganos, constituyendo la colinesterasa hística. Se encuentra en el hígado (en donde se sintetiza), en la mucosa intestinal, páncreas, cerebro y músculo, en forma inactiva pues según Gentz y cols. (1978) estaría activa sólo en la sangre. La ace-

tilcolinesterasa de los eritrocitos refleja fielmente la inhibición de la acetilcolinesterasa del tejido nervioso: su inhibición por la piridostigmina es un marcador de la inhibición de la enzima en las sinapsis periféricas.

Así, pues, mientras que la inhibición de la acetilcolinesterasa y la de la butirilcolinesterasa plasmáticas representan la absorcion de los OF, la inhibición de la colinesterasa eritrocitaria está relacionada con la cerebral, y con la existente en las sinapsas, sin que per se represente un efecto tóxico específico. (Carlock, 1999), (Wessler, 1999).

La colinesterasa vera pasa a la unión neuromuscular, y en ciertas sinapsis del sistema nervioso central y del vegetativo, y a las uniones neuroefectoras del sistema nervioso vegetativo, siendo esencial en la neurotransmisión colinérgica. Las sinapsas o sinapsis, son el «botón de apagado del cuerpo». La acetilcolinesterasa se ha encontrado en el período de crecimiento axonal, en el que no interviene en la regulación del impulso nervioso. (Rice y cols. 2000, Venters y cols. 2000)

George y cols. (2003) obtuvieron unos anticuerpos policlonales a partir de una secuencia decapeptídica de la acetilcolinesterasa de los hematíes que contiene serina activa (anti-AChE10S) que reconocen especificamente a la colinesterasa o a la recombinante del ratón, la rMoAChE, pero no a la rMoAChE fosforilada por el tabún,somán, sarín o VX. Los anticuerpos preparados contra la colinesterasa cuya serina está fosforilada (anti-AChE10SP) reconocen a la rMoAChE resultante de la reacción con el oxicloruro fosforoso ($POCl_3$) pero no con la colinesterasa sin fosforilizar ni con el conjugado OP-AChE resultante de la reacción del rMoAChE con otros OF que aportan fosfoserina neutra o monoaniónica lo que indica una gran especifidad para el substrato. El reconocimiento está muy correlacionado con la tasas de inhibición con la del envejecimiento y con la de reactivacion oxímica lo que permite usar los antisueros para quantificar la exposición asi como la extensión y el tipo de de inhibición y diferenciar entre los mecanismos de la inhibición.

Se ignora el papel fisiológico de la colinesterasa plasmática, pues no parece probable que exista para proteger de una eventual agresión por anticolinesterásicos como lo estimaron Wiesmann (1967) y Weber (1969). La normalidad de las personas con colinesterasas con índice de bucaina bajo corrobora que la colinesterasa no tiene un papel fisiológico, al menos esencial. Parece que interviene en el metabolismo de los lípidos; está

presente en los axones en crecimiento antes de que se hayan formado sinapsis por que aquí su misión no es escindir a la acetilcolina. (Bigbee y cols. 1999, Bothwell y cols. 2000, Rice y cols. 2000). La colinesterasa está en la sangre y en los tejidos teniendo papel fisiológico en la musculatura lisa de la traquea de los perros, (Adler y cols. 1990) en el sistema de conducción ventricular de los perros (Kent y cols. 1974) y en la aurícula de la rata.(Slavkov y cols. 1982).

Una fracción de la acetilcolinesterasa vera pasa a las sinapsis acetilcolínicas; la enzima dispone de dos lugares activos, uno que tiene una serina (aminoácido con un OH y lógicamente con una amina) —NH—CH-(CH-)—CH2—OH es esteárico que reaccionar con el área aniónica y con el acetilo de la acetilcolina. La acetilcolinesterasa por su Trp84 reacciona con el nitrógeno cuaternario de la acetilcolina, formando un intermediario tetraédrico inestable, que inmediatamente pasa a enzima acetilada (Froede y cols. 1984), a la cual se añade una molécula de agua formando otro intermediario formado por la la acetilcolinesterasa acetilada, que se hidroliza en milisegundos liberándo colina, desalojándose los receptores de la acetilcolina permtiendo que reciban nuevos impulsos.

El nitrógeno cuaternario de los inhibidores de la colinesterasa reaccionan con la Phe33 de la acetilcolina situado en el subsitio aniónico (Harel y cols. 1993), y con el Trp279, situado en el sitio aniónico periférico.

La serina del centro activo de la colinesterasa ataca nucleofílicamente a los organofosforados electrófilos, reacción favorecida por la formación de dos puentes de hidrógeno entre el anillo imidazólico de la histidina, presente en la tríada catalítica, con el OF y otro con el glutámico, también en la tríada catalítica. En consecuencia de forma un intermediario con carga negativa y de baja estabilidad que finalmente forma acetilcolinesterasa fosforilizada que es un complejo estable. (Millard y cols. 1999), e inactivo. Si los alquilos de la enzima fosforilizada son el metilo o el etilo, se regenera la acetilcolinesterasa al cabo de unas horas, pero si se trata de alquilos secundarios o terciarios no se libera la enzima, necesitandose para que se restablezca la normalidad, que se haya sintetizado nueva acetilcolinesterasa. Los OF no inhiben a las fosforilfosfatasas, probablemente porque al fosforilizarse, se hidrolizan rápidamente con el agua.

La inhibición ejercida por los OF sobre la colinesterasa impide que la enzima hidrolice a la acetilcolina, por lo que esta se acumula e hipe-

restimula a los receptores sinápticos, provocando una hiperestimulación colinérgica en los sistemas nervioso periférico y central, que dan lugar al síndrome colinérgico. La actividad anticolinesterásica de los OF depende mucho de la capacidad que tengan de atravesar las membranas y barrera hematoencefálica. Dada la variabilidad interindividual de los niveles de colinesterasa, los examenes en salud de las personas que pueden estar expuestas a los OF en su trabajo, deben incluir las tasas de la RBC-ChE aunque el tratamiento solo se debe guiar por los signos y síntomas, salvo que se haya producido un descenso importante de la colinesterasa de sus glóbulos rojos. La actividad anticolinesterasa del sarín, sobre los globulos rojos, el cerebro y músculos es diez veces mayor que la del TEPP, 30 veces la de la neostigmina, 100 la del diisopropilflurofosfato y 1.000 veces la del paratión. La repetición de las dosis aumenta el efecto neurotóxico ya que hay una menor reserva defensiva de colinestersas.

Además de los OF la anatoxina-a(s) y las fasciculinas 1 y 2 las dendrotoxinas, a diferencias de los OF no atraviesan la barrera hematoencefálica, y por tanto sin efecto sobre el SNC. Estas toxinas no se unen a la tríada catalítica del centro activo de las acetilcolinesterasas, haciéndolo con su sitio aniónico periférico situado en el borde de la garganta de 200 nm bloqueando la superficie de entrada a la garganta que lleva hasta el centro activo de la acetilcolinesterasa (Sussman y cols 1991, Harely cols. 1993). Es decir actúan como inhibidores no competitivos, impidiendo que llegue esta a su centro activo (Karlssony cols. 1984, Lin y cols. 1987, Puu y cols. 1990, Durán y cols. 1994, Radic y cols. 1994, Bourne y cols. 1995, Harel y cols. 1995, Rosenberry y cols. 1996). La inhibición de la acetilcolinesterasa por las fasciculinas es prolongada y tras la inyección de 150 ng de FAS-2 en el núcleo amigdalino de ratas se observó que un 74% de la inhibición persistía cinco días después de haber sido administrada (Quillfeldt y cols. 1990) y lo mismo ocurre al inyectar FAS-2 a otras zonas del encéfalo.

Enolasas

Los OF disminuyen (el plaguicida disulfoton lo hace ligeramente) la transcripción del gene codificador de la beta-enolasa (NTE) en el soleo, con nadir a las 48 horas, siguiendo bajo respecto a los controles a los 30

días. La NTE, es una enzima de 155 k Da, situada en la membrana neuronal,asi como en la de los linfocitos y de las plaquetas, mientras que aumenta la transcripción de la gamma-enolasa (NSE) en el ciático a las 2 horas; esta regulación positiva puede servir de marcador de intoxicación por OF. El ciclosarín, seguido del somán, sarín y del tabún inhiben a la NTE in vitro. con una actividad inhibitoria de 180, 830 y 2.000, mientras que el VX prácticamente no inhibe a la NSE. (Gordon 1983).

El ciclosarín, seguido del somán, sarín y del tabún disminuyen la transcripción del gene codificador de la beta-enolasa (NTE) en el soleo, con nadir a las 48 horas, siguiendo bajo respecto a los controles a los 30 días, pero además inhiben a la NTS in vitro, con una actividad inhibitoria de 180, 830 y 2.000,respectivamente, mientras que el VX prácticamente no la inhibe (Gordon 1983) y el plaguicida disulfoton lo hace ligeramente. La NTE, es una enzima de 155 k Da, de la membrana neuronal, en los linfocitos y en las plaquetas. Esos agresivos OF aumentan la transcripción de la gamma-enolasa (NSE) en el ciático a las 2 horas, aumento que se puede mantener hasta 30 días. La regulación positiva de la NSE puede servir de marcador de intoxicación por OF.

Clínica

Los síntomas más importantes se deben al estímulo excesivo del sistema colinérgico, por el aumento de acetilcolina en los espacios sinápticos. (Carlock y cols. 1999). Los sintomas solo se presentan cuando se ha inhibido mas del 20% de la colinesterasa plasmática se pueden presentarse síntomas y signos, especialmente aumento de la salivación, miosis y dificultad para respirar, pero no hay una buena correlación entre los síntomas y el grado de inhibición de la colinestersas plasmática.

La descripción clínica la basamos en el estudio que pudimos realizar en casi mil personas afectadas por el tabún en la guerra Iran-Irak; hay que tener en cuenta que en las exposiciones en ambiente bélico y en las accidentales, hay factores asociados como los climáticos, la carga psicológica de los combatientes, la medicación asociada, las impurezas de los productos empleados etc. Esta informaciión la completamos con la sintomatología publicada en los cientos intoxicados en la fabricación y en el empleo de los agresivos en los años 50 y en la de los pesticidas OF.

Hay tener en cuenta que los pesticidas OF tienen bastantes diferencias entre si y aunque todos inhiben la colinesterasas, la crisis colinérgica dura dias e incluso semanas (Chew y cols. 1971), y la causada por los agresivos nerviosos persiste solo unas horas (Sidell y cols., 1974,Ward 1962).

La excitación de los receptores muscarínicos de las glándulas exocrinas, se produce incluso con exposiciones bajas, local o sistémica. Aumentan sus secreciones y hay lagrimeo llegando a correr las lágrimas sobre la cara,sialorrea, cayendo saliva de las comisuras, sudoración profusa, que moja la cara y empapa los vestidos, rinorrea que puede ser precoz, apareciendo a veces antes que la miosis o incluso sin ella. La hipersecreción de las glándulas bronquiales,que producen un líquido espeso, mucoide, que pueden obstruir las vías respiratorias y causar edema pulmonar. Tambien se ha señalado aumento de la secreción de clorhídrico.

La clínica se debe especial, pero no exclusivamente al acúmulo de acetilcolina en las sinapsis, debido a la disminución de la colinesterasa sináptica, por debajo de una determinado nivel, valorada por la concentración de la colinesterasas de los hematíes, ya que la plasmática tiene una baja correlación. (Rider y cols. 1969 Hayes y cols. 1964. Edson 1964). Ese nivel se produce por dosis bajas de los OF muy tóxicos o con grandes o repetidas dosis de OF poco tóxicos.

Los síntomas pueden aparecer al cabo de unos segundos, pero en la mayoría de los intoxicados, lo hacen entre cinco minutos a tres horas, sin pródromos, ni síntomas locales y van aumentando en intensidad hasta llegar a su máxima expresión a los pocos minutos de haber comenzado los síntomas. La duración de la latencia es inversa al grado de toxicidad y a la cantidad absorbida, de modo que con los agresivos militares los síntomas comienzan a los pocos minutos, mientras que con los insecticidas, pueden aparecer a las cuatro horas, nunca despues de las veinticuatro horas. La latencia más frecuente es la de 15 a 20 minutos. La latencia es algo menor cuando ingresa por vía respiratoria, que por la digestiva y más larga si entró por la piel; la entrada de varias DL_{50} por la piel, determina síntomas a las cuatro horas, en razón inversa de la intensidad de la contaminación y directa del lapso transcurrido hasta la descontaminación. Sim y cols. (1960) vieron que una pequeña cantidad de VX colocada sobre la piel producia nausea, vómito y máxima disminución de la colinesterasa al cabo de una media de 10,8 horas.

La piel puede constituir una importante puerta de entrada. Los efectos dependen, lógicamente, de la cantidad absorbida, que depende de la concentración ambiental. La inhalación durante un minuto de sarín a una concentración de 3 mg/m3 ya produce síntomas, si es de 75 mg/m3 genera una intoxicción grave y la de 100 mg/m3 puede ser mortal.y la ruta de ingreso. La inhalación de aerosoles o de vapores los síntomas aparecen al cabo de segundos o minutos alcanzando enseguida su máximo efecto con colapso, pérdida de la consciencia, fllacidez y apnea a los 4 a 5 minutos.

Inicialmente se excitan los receptores nicotínicos, aunque disminuye su expresión en las placas motoras como vieron Matsuda y cols. (2003) en las de los nervios soleo y ciático, con máximo a las 48 horas, efecto que puede durar 30 días.

Esta excitación debería producir vía simpática taquicardia, disminución de secreciones, relajación de la fibra muscular lisa, pero estos efectos estan neutralizados por el estimula de los receptores muscarínicos causados por el exceso de acetilcolina (Gauthier 1999, Grisaru y cols. 1999). Los primeros síntomas son muscarínicos, colinomiméticos, acetilcolínicos o parasimpáticos, debidos al bloqueo de las sinapsis colinérgicas postganglionares que actúa en los órganos efectores; hay pues, hiperexcitabilidad vagal, de la que depende los signos iniciales y los únicos en las intoxicaciónes leves. Los síntomas pueden presentarse en diversas combinaciones. Aparecen debilidad y parestesias en las zonas distales de las extremidades,sobre todo de las inferiores, que puede progresar hasta parálisis, y en los casos graves se pueden afectar también las extremidades superiores.

En la entrada cutánea los síntomas comienzan en el lugar de la absorción, por ej la sudoración o la fasciculación de los músculos subyacentes. Los vestidos ordinarios sólo protegen unos minutos. Es pues peligroso el contacto de la piel con organofosforados, bastando I gota de ellos para causar un cuadro grave, y aun mortal, si no se descontamina rápidamente.

En las intoxicaciones leves o moderadas aparecen inicialmente los síntomas debidos al estimulo de los receptores muscarínicos, que activan al parasimpático, aumentando las secreciones; lacrimeo, salivación, diaforesis, diarrea y las de los bronquios que inundan las vías respiratorias.

Se contrae la fibra muscular lisa, aumentan la frecuencia urinaria, se presenta náusea, vómito, broncoespasmo, miosis, asi como aumento de frecuencia urinaria, y bradicardia.

La miosis puede aparecer, a los pocos segundos o minutos de la exposición por acción local. La instilación de I gota de sarín en un ojo causa miosis y disminución de la sensibilidad visual. (Stewart y cols. 1968).La miosis tarda más, incluso después de una hora en exposiciones pequeñas si no hubo contaminación local. (Sim y cols. 1960, Namba y cols. 1971). La miosis es un signo característico que permite hacer el diagnóstico en caso de intoxicaciones masivas en las que es difícil hacer un diagóstico diferencial. La miosis dificultades la percepción de distancias, tan importante en la conducción de vehículos, que requiere coordinación estereo-visual, es decir el efecto de Pulfrich. La miosis puede acompañarse de dolor ocular o periocular, por el espasmo ciliar y si la miosis es unilateral de cefalea; hay sensibilidad a la luz de modo que los síntomas se agudizan al mirar una luz intensa (signo del mechero) La atropina o la homatropina en conjuntiva alivian el dolor, pero suprimem la adaptación de la pupila a la intensidad lumínica es decir se produce, salvo en loa miopes, la parálisis midriática que causa visión borrosa debida no a la miosi, pese a que la suprime la i.m. de carbamatos o de fisostigmina (Trussov 1962), sino a que llega menos luz a la retina o a alteraciones de esta o del SNC, Moylan-Jones y cols. (1973) no encontraron en seis expuestas a 15 mg•min/m^3 de vapores de sarín modificación de la acuidad visual próxima, que empeoró al instilar el anticolinérgico, ciclopentolato, ni la remota, salvo en uno que mejoró este parámetro, tal vez por ser présbita.

La miosis desaparece al cabo de unos días aunque la pupila puede requerir más de dos meses para que se abra completamente en la oscuridad (Rengstorff 1985). Si se protegen los ojos, la inhalación de sarín aumenta el dintel luminoso (Rubin y cols. 1957). sin que apareciera miosis, normalizandose por el sulfato de atropina sistémica que pasa la barrera hematoencefálica, pero no del metil-nitrato que no la atraviesa. (Rubin y cols. 1958)

La miosis no se debe a la disminución de la acetilcolinesterosemia. Nozaki y cols. (1976) en 50 afectados por el ataque con sarín en el metro de Tokio con miosis, solo el 64% tenía descendida la enzima de los

hematíes. La miosis puede persistir 3 a 6 semanas incluso en los atropinizados, como observaron Sidell en 1974 y Rengstorff en 1985, en intoxicados accidentalmente al sarín y al somán y que encontramos nosotros en los afectados por tabún en Irán pero la observación de la miosis es útil para controlar la atropinización, aunque su presencia no sea un marcador seguro de la cantidad absorbida. La miosis diferencia rápida y de modo sencillo una intoxicación por agentes inhibidores de las colinesterasas de la de otros tóxicos como el cianhídrico. Yokoyama y cols, observaron niveles nrmales de colinestersas plasmática en un afectado qu había perdido el conocimiento, y tenía insuficiencia respiratoria.

Dosis bajas por ej de una Ct de 5 a 10 mg•min/m3 de sarín causan a los pocos segundos la contracción de las fibras musculares lisas del sistema gastrointestinal por la hiperexcitación de los receptores muscarínicos, Hay hiperperistaltismo, náuseas, vómitos, diarrea, dolores cólicos,tenesmo, incontinencia rectal (ademas de la urinaria).diarrea y calambres abdominales,

El espasmo de los músculos ciliares hace que la visión se enturbia y hasta se anula, dificulta la acomodación y que origina intensos dolores retrooculares irradiadiados a la frente y nuca. Miosis bilateral puntiforme que puede ser desigual, rara vez midriasis.

En el aparato respiratorio se produce broncoespasmo con opresión torácica, dificultad respiratoria, tos, El broncoespasmo, aumenta la resistencia de las vias aéreas y causa sibilancias, estertores, disnea con jadeos espiratorios prolongados; la intensidad de estos síntomas y signos aumenta con el grado de exposición. Si la exposición es grave la disnea es intensa llegando a presentar cianosis. La parada respiratoria se debe a las secreciones bronquiales,incluidos los tapones mucosos, a la broncoconstricción, a la parálisis neuromuscular y a la depresión de los centros respiratorios, debido (Petrali y cols. 1991), a que al menos el somán aumenta la permeabilidad de la barrera dematoencefálica.

Luego aparece la excitación nicotínica aparece en las intoxicaciones moderada y grave, despues de la fase muscarínica. El músculo esquelético se despolariza; e inicialmente, aparecen fasciculaciones, es decir contracciones fibrilares visibles de unas pocas fibras inervadas por una sola fibra motora, perceptibles como ondulaciones subcutáneas en la zona en la que contactó el OF antes de haber pasado a la sangre. La fasciculación

puede persistir bastante tiempo. En la intoxicción sistémica se contraen simultaneamente varios músculos y luego lo hacen grupos musculares causando temblor o calambres dolorosos,que sacuden a las extremidades y al tronco poniendolos rígidos o en hiperextensión y aparecen convulsiones crónicas y tónicas, semejantes a las de un acceso epiléptico. Dosis altas, incluso si se descontaminó pronto al afectado causan incoordinación motórica, contracturas, fasciculación y convulsiones. Se ha señalado trismus en una persona que pipeteó con la boca somán.

Los síntomas musculares se inician en los párpados y en la lengua, pasando luego a los músculos de la cara y del cuello, llegando a generalizarse. Las convulsiones o espasmos comienzan a los pocos segundos de haberse producido la incosciencia, duran unos minutos hasta que aparece la apnea. Los animales intoxicdos tienen convuliones durante varias horas aunque se les haya tratado

Como consecuencia de esta hiperactividad muscular se producen en los cuadros graves, algias, fatigabilidad, ataxia, arreflexia, paresias y parálisis fláccidas. La atropina no modifica la afectación neuromuscular debida a la excitación nicotínica.

Los síntomas son mas frecuentes y precoces a medida que aumenta la cantidad absorbida, la cual no se traduce en el grado de reducción de la colinesterasa de los globulos rojo, despues de la exposición a concentraciones débiles de OF, pero si en cuanto a la frecuencia de aparición de los síntomas; así la aplicacoón sobre la piel Sim (1962) de VX provocó vómito, a partir de una disminución de la colinesterasa de los hematíes. Del 60% en los 30 voluntarios en los que bajó un 40%, en el 43% de los 21 cuya colinesterasa se redujo un 70-60%,, en el 71% de 14 cuya colinesterasa disminuyó 70-80% y en el 60% de aquellos cuya RBC-ChE, bajó el 80 al 100%. Hay que tener en cuenta que la reducción de la colinesterasa se estableció sobre las concentraciones de controles y sabemos que hay amplias variaciones interindividuales de esta enzima.

La excitación de los receptores nicotínicos causa prolongada contracción muscular apareciendo náuseas, vómitos y broncoespasmo que aparecen cuando la intoxicación fue más intensa.

La afectación de las sinapsas colinérgicas del SNC origina cefalea y ansiedad. (Hunter, 1999, Grisaru, 1999). El nivel de inhibición de la ace-

tilcolinesterasa cerebral está relacionado con la aparición de signos o síntomas colinérgicos. Las dosis bajas y continuadas (situación poco probable en guerra pero si en la exposición a plaguicidas) causan síntomas inespecíficos, sin que se haya evidenciado lesión sobre el sistema nervioso.

En la intoxicación por sarín predominan los efectos nicotínicos, pero en los que lo han sido por el VX lo son los muscarínicos Nozaki y cols. publicaron en 1995, el caso de una víctima de un atentado personal por rociado con VX. El paciente empezó con dificultades para ver y, seguidamente quedó inconscienye y sufrió convulsiones, luego cianosis, salivación y sudoración excesivas. A la hora ya tenía miosis, 43 pulsacions por minuto, e hipotensión (80/44 m m Hg).

Fonseka y cols. (2003) encontraron en un hombre a los 8 días de haber ingerido voluntariamente, el insecticida dimetoato crisis colinérgica, afectación cerebelosa y síndromes intermedio y tardio.

Los efectos persisten desde minutos a semanas (la del paration es intermedia).

Contribuyen a la tóxicidad de los OF, la inhibición de otros enzimas, lo que explica que el bloqueo de la liberación de acetilcolina con toxina botulínica no elimine el efecto tóxico. El complejo estable, es decir envejecido, de loa OF con la colinesterasa, reacciona con la gamma enolasa,aumentada en la intoxucación, reacción que debe al menos contribuir a los efectos tardios de la exposición a los organofosfatos (Matsuda y cols. 2003). T

Varias dosis letales, dadas a animales atropinizados, bloquean la conducción a traves de los canales iónicos o actuan como agonistas de estos. (Albuquerque y cols. 1984). Algunos OF, como el DFP o el nipafix desmielinizan.

Los derivados de la fenotiazina, como el fosdrin, potencian los efectos de los organofosforados; ciertos compuestos cuaternarios organofosforados, como el ecotifa, usado para tratar el glaucoma, se combinan con los locus aniónico y esteárico, lo que probablemente contribuye a su alta potencia y especificidad.

Dosis bajas insuficientes para provocar síntomas repetidas antes de que se haya recuperado la colinesterasa actúan aditivamente aumentando

la inhibición de la colinesterasa causando síntomas al cabo de unos días. Este aumento de susceptibilidad puede persistir unos días. En este fenómeno interviene la dosis, la duración de la exposición y la de de los intervalos entre exposiciones. El aumento de la susceptinilidad no es específico del OF absorbido inicialmente. Esta mayor susceptibilidad desaparece cuando se normaliza la colinesterasa. Por otro lado se ha señalado que dosis bajas repetidas de OF causan tolerancia en los mamíferos, aumento su resistencia a dosis elevadas, lo que pudiera deberse a disminución de los receptores de acetilcolina (Costa y cols., 1982), a aumento de la colinesterasa, o a una mayor capacidad de liberarse la colinesterasa. No se ha señalado esta tolerancia en el hombre.

Una absorción importante de OF, incrementa la acetilcolina en las sinsapsis y uniones neuromusuculares, en las que existen receptores para la colina señalados en 1946 por Anichkov y cols. que permanecen estimulados continuamente. Estos receptores pueden ser nicotínicos (Nm y Nn) (nAChR) o de tipo II, activables por la nicotina, de la Nicotiana tabacum, presentes en los ganglios del sistema simpático y parasimpático, y en el músculo estriado. Una proteina, la «lynxl» semejante a la del veneno de serpientes, descubierta por Julie Miwa (2003), que modula la función de los receptores nicotínicos de acetilcolina de forma diferente a como lo hacen otros moduladores (Steven Sine).

Los receptores muscarínicos,(M1 a M5) o de tipo I, activables por la muscarina, de la Amanita muscaria o del Inocybe fastigiata, están en el músculo liso del pulmon y del tubo digestivo, en el corazón inervado por fibras postganglionares parasimpáticas (el vago) y en las glándulas exocrinas, como las de la boca y de las vias respiratorias y gastrointestinales, receptores que se neutralizan por la atropina (mAChR). El SNC posee ambos tipos de receptores. El acúmulo de AC estimula contínuamente a los receptores nicotínicos y posteriormente deprime o paraliza los ganglios autónomos (fibras preganglionares) y la de las sinapsis de las fibras motoras de los musculos esqueléticos

El complejo formado por un organofosforado con la colinesterasa, es bastante estable pero se va hidrolizando espontáneamente de forma lentamente a una velocidad que depende de la estructura del OF. Si la enzima fosforilada pierde uno de los radicales alcohílicos del grupo fosforilo que se había unido a la enzima se dificulta mucho la reactivación. La

disopropil fosforilacetilcolinesterasa ni las sarin o las tabún-acetilcolinesterasas fosforiladas se reactivan. A medida que transcurre el tiempo, la fosforilización de la enzima se hace más firme y no se hidroliza ni siquiera con las oximas.

La reactivación se produce, similarmente a como lo hace normalmente la acetilcolinesterasa acetilada, separándose el grupo alquílico unido al oxígeno del organofosforado y quedando unidos los radicales fosfato a los lugares con actividad esterásica, complejo este enzima-fosfato estable e inactivo,que no hidroliza o haciéndolo muy lentamente al éster fosfórico. La dealquilación impide que las oximas puedan actuar. Si el alquilo es el metilo o el etilo, la hidrólisis, tiene lugar en horas pero si es de cadena larga puede no llegar a hidrolizarse, quedando la enzima fosforilada indefinidamente, recuperándose solo la actividad colonesterásica cuando se haya síntetizado suficiente acetilcolinesterasa; también interviene en la reactivación el grupo unido al primer carbono del alquilo.

La reactivacion espontanea o por oximas difiere según el agresivo; asi el 0,5-1% de complejo colinesterasa de eritrocitos con el VX se reactiva espontanemente al cabo de una hora mientras que con el somán tarda dos minutos en envejecer la mitad del complejo (tiempo medio de envejecimiento) mientras que el 5% del sarín se reactiva espontaneamente, envejecer la mitad del complejo en unas 5 horas.

Una fracción importante del complejo colinesterasa—OF es estable y el resto se separa lentamente por hidrólisis recuperándose la actividad colinesterásica a una velocidad que depende de la estructura del grupo fosforilo unido a la enzima. Pero posteriormente se separa uno de los grupos alquilos a una velocidad que depende de la estructura del OF quedando el complejo estable e inactiva su componente esterásico.

La unión entre el agente OF y la enzima es irreversible, a menos que se utilice de forma temprana un antídoto reactivador; si se retrasa el uso del antídoto, la inhibición es irreversible.

En el caso de las intoxicación por somán, el radical que se pierde es el pinacolilo (1,2,2,-tri- metilpropilo) dejando una AChE fosforilada mucho más estable y difícil de reactivar (Millard y cols. 1999). La de-alquilación del complejo impide la separación del OF ni por la acción de las oximas. La estabilidad o sea la rapidez del envejecimiento depende

del tipo de organofosforado. Los derivados fosfato y fosfonatos envejecen fácilmente, porque se rompe espontáneamente la unión -C-O-, P, mientras que los fosfinatos no envejecen dada la estabilidad de la unión C-P. El envejecimiento de la mitad de la colinesterasa de los hematies es para el insecticida paraoxón de unos 5,5 días mientras que para el tabún es de 46 horas y para el somán de unos 4 minutos.

La unión de la enzima con los carbamatos determina compuestos que se hidrolizan rápidamente, y de ahí su empleo como insecticidas inócuos. La dímetilfosforilacetilcolinesterasa es decir la colinesterasa fosforilada por el éster dimetilfosfórico se reactiva espontáneamente 20 veces más rapidamente que si se fosforiliza con ésteres dietilfosfóricos.

Los organofosfatos además de inhibir a la acetilcolinesterasa, disminuyen su síntesis. Matsuda y cols. (2003) encontraron por la reacción cuantitativa de la transcriptasa inversa, que las ratas tratadas con una dosis de Disulfoton (O,O-dietil S-2-etiltioetil fosforoditioato) tenian disminuidos significativamente, los ARNm codificadores de la acetilcolinesterasa durante treinta días. Con máxima disminución a las 12 horas de haber administrado una dosis del plaguicida disulfotón (O,O-dietil S-2-etiltioetil fosforoditioato). La regulación negativa puede hacerse por multiples mecanismos, uno de los cuales podria ser la alteración de los niveles de la transcripción.

La reactivación de la acetilcolinesterasa de los hematíes se mide con HH lavados tres veces y restableciendo el volumen inicial con SS.Se mantienen 15 min a 4ºC.que fosforiliza el 90% de la enzima. A continunación se diluye 140 veces con la solución de la oxima (2.10-5 M) y se determina la actividad de la enzima (30 minutos) por el método de Michel. El peachímetro Beckman permite determinar simultáneamente la enzima inhibida y la reactivada para obtener el porcentaje de reactivación. La colinesterasa de los hematíes humanos (2.10-5) inhibida por el tabún no se reactiva en absoluto, mientras que la del somán lo hace el 3,78%, la del sarín el 57,5% y la del VX el 64,61%. Por ello el envejecimiento se produce a los 2 a 4 minutos, con el tabún, a los 46 minutos, con el sarín a las 5 a 12 horas y con el VX más de 12 horas. Estos resultados son concordes con la protección de BDB-14 o 15 in vivo. Los derivados deBDB con un carbonilo en la posición 4 del anillo de piridina son más eficaces que si se substituye en la posición 3. Y son casi tan eficaces como la tri-

medoxima, la obidoxima y la HI-6-bis-piridinium; esta eficacia se debe a su fácil unión y gran afinidad para la acetilcolinesterasa.

Cuando la enzima reacciona con la fisostigmina queda inhibida durante 1 hora y si lo hizo con la piridistigmina queda inactiva 4 a 6 horas.

Se denomina envejecimiento al proceso de fijación del complejo, que no se puede hidrolizar, haciéndose estable y resistente a la reactivación con agua o con oximas.el envejecimiento tiene lugar para el somán a los 2-4 minutos, 5 a 12 horas para el sarín, más de 12 horas para el VX, agresivos que tienen un radical secundario o cíclico, o el radical pinacolilo (1,2,2,-trimetilpropilo), del somán, que al salir del complejo colinesterasa- fosfonilada o fosforilada deja un éster con carga negativa, mas estable. Para Millard y cols. Piensan que para la estabilización se reqquiere que ademas se hayan formado una barrera hidrofóbica a nivel del saco acilo (Phe288, Phe290 y Trp233), enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos del agujero oxianiónico y el átomo de oxígeno, especialmente el de la histidina, que impide que la histidina intervenga en la hidrólisis. En los demás OF el envejecimiento tarda mucho más. 46 horas en el caso del el tabún, El envejecimiento por el tabún se puede producir por ruptura de los enlaces carbono-oxígeno o la fósforo-nitrógeno (Barak 2000)

El tiempo medio del envejecimiento de los complejos formados por los agresivos nerviosos unidos a la colinesterasa de los hematíes humanos es (Sidell y cols. 1974) para el VX in vivo de 48 horas, para el GF humano in vitro, 40 horas (Mager 1984) que para Hill y cols. (1969) se acorta a 7,5 para el tabún in vitro e in vivo, (Mager 1984) superior a las 14 horas o de 13,3 horas para Doctor y cols. (1993). Para el sarín in vivo es de 3 horas (Mager 1984) o de 5 horas (Sidell y cols. 1974). Para el somán 2 a 6 minutos (Mager 1974),y para el marmoset 1.0 min., para el cobaya 7,5 min. y para la rata 8,6 min. (Talbot y cols. 1988) lo cual lo que supone grave dificultad para el tratamiento.

La recuperación de la colinesterasa de los HH, de las sinapsis y la de la placa motora requiere unos tres meses, pues depende de la síntesis hepática de la enzima y de la eritropoyesis. La recuperación es completa cuando se ha eliminado el organofosforado y se ha reactivado la colinesterasa. La recuperación de la colinesterasa plasmática totalmente inhibida por el sarín tiene lugar a los 50 días, y la de los hematíes en unos 120 días (Grob y cols. 1953) es decir un 1% diario necesarios para la re-

novación do los globulos rojos; si la intoxicación se debe al VX, la recuperación se hace al ritmo del 12 al 24% diario. La recuperación de la acetilcolinesterasa cerebral es más lenta que la de la plasmática (Freedman y cols. 1948, Oberst y cols. 1956), aunque puede ser mas rápida lo que explica la observación de Sidell (1974) de una persona que despues de una intensa exposición al sarín estaba alerta y razonablemente bien varios dias mientras que su colinesterasa plasmática era ínfima.

Efectos cardiovasculares

Si en el corazón, predominaran los efectos nicotínicos sobre los muscarínicos habria taquicardia, hipertensión, palidez y aumento de catecolaminas circulantes pero el predominio muscarínico por el hiperestimulo vagal,revierte estos efectos y hay una gran bradicardia, hipotensión, aunque la presión arterial puede estar aumentada por el estímulo colinérgico ganglionar y por el estrés. Hay trastornos de la conducción cardíaca en forma de bloqueos atrio-ventriculares de diverso grado, debidos al estímulo vagal del nódulo de Hiss por el estrés, al pánico o la hipoxia, situación que puede llevar a la asistolia. Los afectados pueden sufrir diversas arritmias. Los perros expuestos a dosis letales de vapores de sarín presentan a los pocos minutos, ritmos idioventriculares y si se les administra atropina causa bloqueo cardiaco (Pazdernik y cols. 1985). El 80% de cinco perros anestesiados que recibieron una DL50 de VX tuvieron arritmias, incluyendo bloqueo de primer grado y complejos ventriculares e incluso algunos tuvieron «torsade de pointes» y lo mismo se ve en los expuestos a pesticidas. (Ludomirsky y cols. 1982). La torsade es una arritmia ventricular generalmente rápida originada en varios zonas cuyo ECG presenta con bruscamente alteraciones intermedias entre la taquicrdia ventricular y la fibrilación y que cesan tambien de forma abrupta No son raras las arritmias en trabajadores con pesticidas (Kiss y cols. 1979)

Hasslery cols. (1987) inyectaron intravenosamente a perros una DL50 de somán y pocos despues atropina y diazepam encontrando episodios frecuentes de bradicardia bloqueos ventriculares de segundo y tercer grados

En animales hipóxicos se ha visto la aparición de la grave fibrilación ventricular que puede ser precipitada por la adminitración de atropina. (Freeman y cols. 1954, Kunkel 1973). Efecto que no se ha vito en el hom-

bre. La bradicardia es un signo importante de excitación muscarínica pero solo el 7% de los expuestos moderadamente tienen menos de 60 pulsaciones y el 6% 60 a 69 e incluso el 15% tiene más de 100 pulsaciones por minuto. Un adulto normal tiene una frecuencia del pulso entre 65 a 80 por minut o. Hay que tener en cuenta la situación del afectado, el estrés por el cansancio, por el miedo etc. Ganendran en 1974 encontró en nueve de diez intoxicdos con alteración de la conciencia, que tenian más de 90 pulsaciones y el 70% superior a 100 (5 tenian una presión sistólica de al menos 140 mm Hg y/o una diastólica de al menos 90 mm Hg Willems y cols. (1971) vieron bradicardia en tres intoxicdos inconscientes (1 tuvo parada cardíaca)

Afectación del SNC

La inhibición de las sinapsis del SNC debida al paso del tóxico al sistema nervioso central causa cefaleas frontales, vértigo, ansiedad, astenia generalizada,arreflexia,incoordinación motora; disminuye y hasta se anula la percepción, labilidad emocional,dificultades en la concentración, pérdida de memoria, irritabilidad, insomnio, somnolencia, y hasta modorra, pesadillas, ausencias, labilidad emocional, inquietud, disartria, balbuceos, desorientación, confusión de ideas, desorientación, inconsciencia, depresión, apatía, que pueden seguirse de disminución del estado de conciencia, coma, convulsiones y muerte. En los niños predomina la afectación del sistema nervioso central, probablmente por la mayor permeabilidad de su barrera hematoencefálica, pasando a segundo lugar la acción nicotínica y la muscarínica. El EEG puede estar desincronizado apareciendo brotes de ondas de bajo voltaje y de alta frecuencia, especialmente en la hiperventilación probablemente debidas a estímulo del sistema reticular ascendente. Se han descrito alucinaciones con el agente VX.

Otros síntomas: Pueden presentarse neuropatía periférica e hiperglucemia, colapso, etc.

Efectos psicológicos

A las pocas horas de haber estado expuestos a OF aunque pueden tardar 24 horas puede aparecer malestar tensión fatiga y objetivamente irri-

tabilidad, desinterés, enlentecimiento en las respuestas, que pueden persistir varios días o semanas. Grob y cols. (1947) encontraron en el 81% de 60 voluntarios de los que 10 tenían miastenia gravis, a los que se inyectó intramuscularmente 1,5 a 3,0 mg diarios de diisopropilfluorfosfato, somnolencia, aumento de tensiones, cansancio, labilidad emocional. Los expuestos laboralmente al sarín presentan alteraciones conductuales. (Ward 1962); la exposicion accidental de un trabajador al somán disminuyó la capacidad de relación, y causó confusión mental, desorientación, alucinaciones.

Craig y cols. (1953) encontraron en el 26% de 49 trabajadores expuestos accidentalmente al sarín o al tabún disminución de sus colinesterasas trastornos del sueño,en el 24% cambios del humor y en el 20% fatigabilidad, sintomas más destacados a las 24 horas de la exposición. Los trabajadores que tenían muy disminuida su colinesterasa plasmática tenían inhibida el 67 % de la colinesterasa vera, lo que podria deberse a que la exposición fue discreta, sin como es habitual, hubiera correlación entre los niveles colinesterásicos y los síntomas. Brody y cols. (1954) en 72 trabajadores expuestos a concentraciones bajas de sarín, encontraron que la colinestarasa de los hematíes bajó un 91% respecto a su nivel personal, aunque algunos la tenían aumentada; de ellos 5 presentaron confusión, 5 vértigo, 4 insomnio y 2 dificultades en la concentración. Bowers y cols. (1964) vieron que la deposición de I gota de VX en la piel de voluntarios disminuía en un 60 a 90% la colinesterasa de la sangre total, en la que están las dos enzimas, respecto a la de los controles. El 57% presentó ansiedad,el 57% depresión, otro 57% alteración intelectiva y el 38% pesadillas. Los sintomas eran menos frecuentes en los que la colinesterasa disminuyó solo el 20 al 40%. Se ha señalado irritabilidad nauseas,trastornos gastrointestinales, amnesiasn incapacidad para mantener un pensamiento coherente sensacion de enlentecimiento mental

Grob y cols. (1947) vieron que la inyección intramuscular diaria de DFP, alteraba el EEG en el 77% de 23 personas de ellas 4 con miastenia gravis. Grob (1956) en un intoxicdo grave por sarín el EEG efectuado despues de haber perdido el conocimiento pero antes de las convulsiones mostró enlentecimiento de la actividad, con brotes de ondas de 5-Hz de alto voltaje en las derivaciones temporofrontales, que persisteron seis días pese a la atropinozación.

Las lesiones cerebrales causadas por los agresivos nerviosos se deben a la hipoxia causada por la afectación respiratoria pero sobre todo a las convulsiones. Lemerciery cols. (1983) dieron a 264 ratas 1 DL50 de somán; algunos animales murieron poco despues pero algunos de los que murieron con distress respiratorio o con repetidas o prolongadas convulsiones tenían lesiones del tipo de la encefalopatía hipóxica; los que sobrevivieron 39 días, no tuvieron secuelas neurologicas ni lesiones cerebrales. La degeneración neuronal y la necrosis cerebral de las ratas intoxicdas con agentes nerviosos se deben a la hipoxia semejante a la del status epiléptico, ya que solo aparecen en las que tuvieron prolongadas convulsiones como vieron McLeod y cols. (1984) con el somán, Singer y cols. (1987) con el sarín y por McDonough y cols. (1987) con las microinyecciónes en el cerebro del VX. Los animales que sobreviven a estas intoxicaciónes tienen disminuida sus capacidades psicomotoras y conductuales durante unos cuatro meses. (Raffaele y cols 1987, McDonough y cols. 1986, Modrow y cols 1989), furante unos 4 meses

Distrés respiratorio

La broncoconstricción, la ocupación broncoalveolar por la hipersecreción de las celulas caliciformes y de glandulas mucosas de las vias respiratorias, causantes de edema agudo de pulmóm, la paresia nicotínica de la fibra muscular estriada respiratoria y sobre todo las lesiones de los centros respiratorios causan asfixia la cual por la hipoxia, ademas de las convulsiones, genera lesiones cerebrales. Si la cantidad absorbida es pequeña y el sujeto esta en zona libre del agresivo, mejora y al cabo de unos 2'-30 minutos se encuentra bien, pero si la exposición fue intensa se produce colapso y muerte por asfixia. Wright (1954) encontró en el conejo intoxicdo por sarín,que la lesión de los centros respiratorias y la parálisis de los intercostales y aun más la del diafragma era mucho más importante que el broncoespasmo. Lo mismo encontraron Rickett y cols. (1986) en gatos anestesiados a los que intoxicron con los diversos agresivos nerviosos.

El distrés respiratorio a veces con ritmo de Cheyne-Stokes, causa cianosis hipoventilación o apnea que matan al intoxicdo. La muerte puede producirse también por parada cardíaca ocasionada por la depresión del

centro circulatorio. De Candole y cols. (1953) encontraron que la depresion de los centros respiratorios era el fallo mas importante en la mayoria de las nueve especies,que estudiaron aunque con diversa importancia, en cambio en el gato tenía mayor relevancia el broncoespasmo.

Efectos neuropsiquiátricos

Se han observado despues de una única o de repetidas exposiciones a insecticidas y a agentes nerviosos. Pueden aparecer poco despues de la exposición o despues del cuadro colinérgico, alteraciones de la memoria, del sueño y de la vigilancia, depresion; ansiedad e irritabilidad. Gershon y Shaw fueron los primeros que en 1961 describieron 16 pacientes con problemas psiquicos que habian estado expuestos repetidamente a insecticidas durante 1,5 a 10 años; cinco tenían esquizofrenia, 7 depresión grave, 1 estado de fuga y todos tenian disturbios de memoria y de concentración. Estos cuadros siguieron a múltiples exposiciones a pesticidas OF y los pacientes se recuperaron al cabo de 6 a 12 meses; estos autores piensan que estas secuelas deben ser mas frecuentes de lo que suele creerse. Este estudio fue criticado por no incluir las carácterísticas de la exposición ni la medición de la colinesterasa en la mayoría de los casos. Otros autores no encontraron anomalias psiquiátricas. Rowntree y cols. (1950) vieron que el diisopropil fluorofosfato agravaba las psicosis.

Metcalf y Holmes (1969) encontraron en expuestos más de un año a plaguicidas ansiedad, irritabilidad, vértigo, tensión, cansancio, lentitud del pensamiento y del cálculo trastornos del sueño como excesiva somnolencia,pesadillas, insomnio que persistieron meses. Namba y cols. (1971) señalaron despues de una exposición de días o semanas a insecticidas depresión inmediatamente despues del cuadro agudo, que solo en raros casos persistió 6 a 12 meses. Durham y cols. (1965) evaluaron a 187 espolvoreadores de OF en el campo, con síntomas psíquicos, encontrando que tenían disminuido su estado de alerta y que tanto ellos como los trabajadores asintomaticos, mejoraron este signo al cesar la exposición. Destacan que la disminucion de la alerta no se presentó en los expuestos asintomáticos. Levin y cols. (1976), en cambio, mediante una entrevista estructurada y un test de depresión, no encontraron esta en trabajadores asintomáticos con exposición crónica. Rowntree y cols. (1950) vieron que

la exposición cotidiana de un OF retardaba el pensamiento y disminuía la velocidad de la puesta a punto. Se han señalado dificultades en la concentración y en la vigilancia despues de la exposición a insecticidas (Gershon y cols. 1961, Dille y cols. 1964, Durham y cols. 1965, Metcall y cols. 1969,Namba y cols. 1971).

Tabershaw y Cooper en 87 expuestos a un insecticida OF mas de tres años encontraron que se quejaban persistentemente durante más de 6 meses de problemas visuales, que se achacaban a presbicia, gastrointestinales,a ulcus, cardiorespiratorios y neuropsiquiátricos atribuidos a causas diversas, nerviosismo y tremor a alcoholismo crónico. Rosenstock y cols. (1991) encontraron peores resultados de de 38 pacientes hospitalizados mas de un año por intoxicción profesional con OF con los test neuropsicológicos de atención acústica, memoria visual,rapidez visomotora, resolución de problemas, destreza etc. respecto a otros trabajadores con OF que no tuvieron síntomas. Grob (1956) encontró depresión aguda despues de la exposición que desapareció poco despues y disturbios del sueño. La exposición al VX disminuyó la capacidad de resolver problemas aritméticos y la de comprender textos durante varias semanas. Gaon y cols. (1979) vieron que el 20% de 297 trabajadores expuestos accidentalmente a OF tuvo cuadros neuropsiquiátricos como disturbios del sueño, de pensar con claridad, irritabilidad, nerviosismo, ausencias, fatigabilidad.

Aunque se trata de una sola persona, es interesante el caso de un bioquímico, que necesitó ventilación asistida durante 30 minutos tras haber estado expuesto al somán. A las dos semanas tenia elevadas puntuación el test «Minnesota Multiphasic Personality Inventory» para depresión e histeria, disminución de la memoria visual, de la asociación de palabras, frases y de un test de manchas de tinta; además mientras se les hacía los tests empleaba técnicas dilatorias, tenía dicultades de asociación verbal; las pruebas fueron dando mejores resultados a los 4 y 6 meses.

Grob y cols. (1947) encontraron en el EEG, en personas a las que se dio diariamente diisopropilfluorfosfato durante 2 a 7 días frecuencias más rápidas, mayores voltajes, y en ocasiones brotes de ondas lentas de alto voltaje a 3-6 Hz, estando su gravedad relacionada con la inhibición de la colinesterasa; las alteraciones persistieron 3 a 4 semanas. En 50 trabajadores expuestos el EEG practicado en las primeras 72 horas de exposición accidental

Un intoxicdo grave con sarín el EEG practicado despues de haber perdido la conciencia pero antes de haberlo hecho las convulsiones mostró retardación con brotes de ondas lentas de alto voltaje a 5 Hz en las derivaciones temporofrontales que persistieron seis días sin dejar efectos residuales. (Grob 1956)

Duffy y cols. 1980. En monos a los que se dio una alta dosis de sarín que les producía convulsiones o una serie de 10 dosis semanales que no repercutían climicamente el EEG practicado un año despues tenía aumentada la actividad beta de alta frecuencia-

El EEG de expuestas al sarín tiene aumentada la actividad beta, de la delta lenta y de la theta, con disminución de la de la alfa. Tambien hay aumento de REM (Duffy y cols. 1979,Burchfiel y cols. 1982). Perros intoxicdos con una Ct de 10 mg•min/m3 de sarín durante más de 6 meses durante 5 o 7 días a la semana no causó anomalías macro ni microscópicas.

En las intoxicaciónes graves se ha señalado fiebre que persiste varios días. Puede haber leucocitosis, ligera neutropenia con desviación a la izquierda, eosinopenia (salvo parasitación o proceso alérgico asociados). A menudo hay hiperglucemia con glucosuria y albuminuria. La autopsia revela hemorragias cerebrales, edema pulmonar, dilatación capilar, hiperemia pulmonar y de otros órganos. Estas lesiónes son semejantes a las que produce la inyección repetida de acetilcolina, sobre todo en las glándulas salivares y en páncreas exocrino.

El tabún, en presencia de ácidos, álcalis o agua, puede liberar cloruro de cianógeno y ácido cianhídrico, produciendo las manifestaciones propias de estos agresivos.

Mutagénesis

Ni el sarín ni el somán dan positivo el test de Ames ni causan mutaciones en las celulas del linfoma del ratón, ni en las del ovario del hamster chino. (Goldman y cols.1987). El tabún fue debilmente mutagénico en el test de Ames y sobre las células del linfoma del ratón (Kawakami y cols. 1989) sobre las del ovario del hamster chino (Nasr y cols. 1988). Como la colinesterasa plasmática juega papel en el dearrollo neuronal, es

posible que la exposición prenatal a organofosforados pudiera ser teratogénica. Ninguno de los hijos que tuvieron cinco embarazadas que estuvieron expuestas al sarín en el ataque en el metro de Tokio que solo tuvieron síntomas leves sin hipoxia, tuvieron malformaciones (Okumura 1997).

En los niños son menos comunes o relevantes el lagrimeo, la sudoración, la sialorrea, la miosis, la bradicardia, y las fasciculaciones, excesiva, pero las convulsiones y el coma son mas frecuentes y graves.

Síndromes a largo plazo (Llamados incorrectamente, a nuestro juicio, tardíos)

En los años 50 se descubrió una polineuropatía en personas que habían ingerido triortocresil fosfato, y lo mismo vió Metcalf en 1984 en expuestos a algunos plaguicidas OF, hoy no autorizados y en animales expuestos al tabún, tanto más frecuentes cuanto mayor hubiera sido la exposición (Aygun y cols. 2003). En algunos intoxicados graves por sarín en Matsumoto se presentó polineuropatía sensorial, sin paresias, que persistió siete 7 meses y en un caso alteración de la visión que se recuperó a los 15 meses. El cuadro se caracteriza por alteración al cabo de 1 a 3 semanas de la parte distal, no mielinizada de los nervios de los miembros inferiores y a veces también de los superiores, seguida por progresiva desmielinización y degeneración de segmentos nerviosos más proximales que determina incoordinacion, ataxia, espasticidad, calambres dolorosos, parestesias y parálisis flácida de las extremidades inferiores aunque en ocasiones se afectan las manos,seguidas de debilidad especialmente de los músculos distales de las piernas. Las lesiones revierten, a veces incompletamente, al cabo de meses o años.En los casos graves puede haber tetraplejía irreversible; el cuadro se acompaña de trastornos de la conducta, de la memoria y del estado de ánimo. Se han observado ligeras alteraciones del EEG hasta 2 años despues de haber estado expuesto a un agente nervioso (Sekijima y cols. 1997).

Las gallinas son relativamente sensibles, mientras que las ratas resisten mucho a la polineuropatía. Para provocar la polineuropatía se necesitan dosis altas que causarían la muerte, por lo que hay que proteger a los animales con atropina-oximas. (Metcalf 1984, Takade 1984). Gordon

y cols. (1983) obtuvieron la polineuropatía en gallinas con 30 a 60 DL50 de sarín pero no con 38 DL_{50} de somán ni con 82 DL_{50} de tabún. Davies y cols. (1960) la producen en pollos (animal de elección),protegidos, con 60 DL50 de sarín, sin que se produjera con 8 DL_{50} de somán ni con 45 µmol/kg de VX. Venters y cols. (2000) obtuvieron polineuropatía en algunas gallinas que sobrevivieron a 120 DL50 de somán o de tabún.

La polineuropatía se debe a la inhibición de una esterasa neurotóxica del sistema nervioso (Johnson 1975). Los inhibidores de la esterasa neurotóxica pueden ser de la clase A, (fosfatos, fosfonatos y fosforamidatos) que son neurotóxicos y de la B (fosfinatos, sulfonil fluoruros y carbamatos) que no son neurotóxicos sino protectores de los efectos de los de la clase A. Es posible que con la esterasa se produzca el envejecimiento, descrito para la colinesterasa pero otros lo atribuyen a la fosforilización de una proteina del SN. El GF es el mayor inhibidor de esta esterasa in vitro. Vranken (1982), pero Willems y cols. (1983) no, lograron producirla con dosis muy altas de GF, más tabún, somán, siendo el VX muy poco activo.

Los OF edematizan a las miofibrillas de la placa motora, que pierden sus estriaciones, quedando la lesión completamete establecida a las 12 a 24 horas. En las fibras afectadas, el sarcolema queda intacto y a partir del segundo día comienza la reparación que se completa a los 15 días, pero si la intoxicción fue intensa se provoca la necrosis de la placa motora, encontrada en expuestos a insecticidas y en los animales intoxicdos con sarín (Meshul y cols. 1985, Kawabuchi y cols. 1989) y de tabún. Hayes (1982) encontró en la rata, al cabo de dos horas de exposición a OF, interrupción de la transmisión nerviosa sin que el estímulo con corrientes de 100 y de 200 Hz produjeran contracciones tetanígenas. la lesión es mas grave en los músculos mas activos, como el diafragma y en las fibras de tipo II de la categoria «fast twitch» (temblores rápidos) (Hayes 1982).

DeReuck y cols. (1975) encontraron en el cadáver de un hombre fallecido por haber bebido paratión que solo había necrosis en el diafragma pese a que las placas motoras carecían de colinesterasa. Cada foco abarcaba 1 a 4 sarcómeros de ambos tipos de fibras y las lesiones iban desde hinchazón aguda a desintegración vacuolar de las fibras. Las terminaciones nerviosas de las zonas necroticas estan degeneradas. La necrosis circumscrita se produce por el sarín (Meshul y cols. 1985, Kawa-

buchi y cols. 1989), por el tabún (Ariens y cols. 1969) y por el somán (Wadia y cols. 1974, Dettbarn 1984) aunque Amiens y cols. (1969) no la encuentran con este agresivo. La lesión se evita o disminuye por la denervación o por la administración de atropina y oximas dadas en las primeras dos horas.

Kadar y cols (1992. 1995) no vieron en el cerebro de ratas a las que se les había inyectado intramuscularmente 50 g/kg de somán, que es media $DL_{50,}$ signos de intoxicación colinérgica, pero el 75% de las que habian recibido una DL_{50}, ya tenían a las 24 horas lesiones simétricas bilaterales, de la corteza piríforme, hipocampo, corteza frontal y núcleo talámico lateral dorsal que se fueron extendiendo; como consecuencia se producen convulsiones epileptiformes causadas por la liberación de aminoácidos excitatorios; las convulsones duran hasta 2 horas y otras anomalías que persisten al menos tres meses. Si se inyecta sarín las lesiones son las mismas pero sin apenas afectar las cortezas frontal y parietal, sin que hubiera hemorragias masivas en el tálamo. La lesión inicial se debe a la acción colinérgica y agravada por las convulsiones. La recuèración de las ratas incluye las dificultades del aprendozaje relacionado más que con la dosis con los síntomas iniciales y, esoecialmente con el grado de lesiones en el hipocampo y otras zonas del sistema límbico. Kassa y cols., obtuvieron resultados semejantes tras exponer ratas a dosis bajas de sarín. McDonough y Shih (1997) elaboran esta secuencia patogénica: «en los primeros 5 minutos de la intoxicación aguda se produce hiperactividad colinérgica, que en los siguientes 40 minutos afectaría a otros sistemas no colinérgicos, que en cierto grado apaga el cuadro colinérgico, activándose los receptores N-metil-D-aspartato, que acumula calcio intracelular que provoca la muerte neuronal, y posteriormente una fase no colinérgica. Según este modelo, inicialmente la crisis sería conscuencia de una hiperactividad colinérgica para luego altera a otros sistemas no colinérgicos, principalmente el sistema glutamatérgico, que desembocs en una fase de transición en la cual la crisis convulsiva es modulada por la hiperactividad colinérgica y sistemas no colinérgicos,

Burchfiel y cols estudiaron los efectos a largo plazo del sarín sobre el EEG de monos tras.

La inyección intravenosa a monos, de 5 (g/kg,de sarín, siendo la $DL_{50,}$ 10 (g/kg, produce intoxicación aguda con aumento del voltaje en las ban-

das de frecuencia ((de 13-50 Hz) de la derivación EEG de la corteza occipital-temporal que se mantiene incluso un año después de la exposición.el EEG. Para evitar la muerte de los monos, los autores los protegieron con galamina que eliminan las convulsiones que determinaríam episodios de apnea causantes de anoxia, destructora de neuronas que llevaría la muerte dal animal.

En 1975 1.406 voluntarios que habían estado expuestos a seis OF más otros anticolinérgicos a menos de 1,5 veces la dosis productora de miosis en la mitad de los expuestos (Diso) veinte años antes en el polígono de pruebas de Aberdeen. Concluyendose que no podían descartar la posibilidad de que algúnia produjeran efectos a largo plazo.

Sidell informó sobre 5 casos de exposición accidental a agentes neurotóxicos: uno era un bioquímico de 33 años que pipeteaba 1 ml de somán al 25%. Durante 6 meses el paciente parecía deprimido, tenía ideas antisociales, dormía mal con pesadillas. La escopolamina, disminuyó la depresión, mejoró su espontáneidad y su estado de alerta. Las pruebas psicológicas inicialmente mostraron dificultad para recordar y reproducir dibujos. y problemas para asociar palabras. En las últimas pruebas los resultados indicaban que utilizaba ya toda su capacidad intelectual y sus respuestas, en las pruebas, eran rápidas e imaginativas. Seis meses después de la exposición su estado era normal.

El segundo caso era un trabajador de 52 años que limpiaba una zona contaminada y que inhaló sarín al estar estropeada su máscara. Tuvo que hospitalizarse muchas veces observándose alteraciones en el electrocardiograma; a los cuatro meses padecía fatiga, disnea de esfuerzo, dolores en pecho y abdomen. Las pruebas realizadas no indicaron nada anormal, aunque el paciente sufría cuadros depresivos y estaba muy preocupado por su lesión cardiaca por lo que requirió ayuda psiquiátrica: al jubilarse no se pudo seguir su estado aunque se supo había muerto por infarto a los 18 meses. La autopsia reveló esclerosis de coronarias con oclusión completa de la coronaria derecha y una reducción del 30% de la luz de la coronaria izquierda.

En otros tres tres trabajadores de 27, 50 y 52 años que inhalaron sarín al producirse un escape en un contenedor, no se investigaron los posibles efectos neuropsiquiátricos. La experiencia de Sidell le indica que los efectos neuropsiquiátricos desaparecen a las pocas semanas.

En uno de tres trabajadores expuestos accidentalmente al sarín, Grob encontró que el EEG de uno de ellos de 38 años gravemente intoxicado, ondas lentas con intermitencias de alto voltaje en la zona fronto-temporal, que desaparecieron a los 6 días sin que quedaran efectos residuales. Duffy y cols. (1979) vieron en 77 trabajadores que habian tenido exposiciones accidentales al sarín que los EEG registrados durante el sueño y vigilia tenían disminuida la actividad alfa y aumento de la fase REM del sueño respecto al grupo control formado por 38 trabajadores de la misma planta sin historia de exposición. Duffy y cols, en 1980 en primates que al año de haber estado expuestos a sarín, que seguía aumentada la actividad del EEG; este efecto dicen los autores podría ser debido a un efecto a largo plazo de la exposición a sarín,o bien a medicamentos, drogas, cambios emocionales o a otros factores.

Entre los afectados en los 4 atentados con VX en el metro de Tokio, se sabe que solo uno de los supervivientes presentaba amnesia anterógrada y retrógrada a los seis meses.

Spiegelberg describió un síndrome neurológico y psiquiátrico en los trabajadores de fábricas y de centros de pruebas de armas químicas alemanas entre 1936 y 1945, que persistía 5 y hasta 10 años. Los organofosforados clorpirifós, diclorvós, isofenfós, leptofós, metamidofós, mipafós, triortocresilfosfato, triclorfón y triclornat) producen a las 1 a 4 semanas (2 a 3) una axonopatía simétrica por degeneración del extremo distal especialmente de las fibras mielinizadas largas y las mas gruesas del sistema nervioso central y periférico, simétrica sensitivomotora (Lotti 2000). La desmielinización, puede alterar el metabolismo oxidativo del hígado, pancreas, etc. y causar disturbios recurrentes neurológicos con insomnio, pesadillas y fatiga. Los síntomas eran astenia, alteración del sistema nervioso autónomo y síntomas de intolerancia a medicamentos, nicotina o alcohol.

Los estudios llevados a cabo tras los atentados de Matsumoto y Tokio con sarín, revelaron que algunas víctimas, tuvieron secuelas relacionadas con la gravedad del síndrome colinérgico, sin que quedara claro si se trataba de efectos a largo plazo o crónicos.

Nakajima y cols. enviaron a las tres semanas del ataque, un cuestionario a 2.052 habitantes de Matsumoto que vivían en el área en la que se dispersó el sarín y en un óvalo de 1.050 metros de norte a sur y 850 me-

tros de este a oeste al que respondió el 85%. El 23% de los respondientes tuvo alteraciones en su salud, de las que (30/129) señalaron disestesia en extremidades que desapareció a los 4 meses, sin que hubiera anomalías en la conducción nerviosa. Un estudio efectuado a las tres semana, a los que habian señalado síntomas reveló que los que tenian la colinesterasa eritrocítica baja padecían astenopía, que en algún caso persistió un año, pese a haberse normalizado la colinesterasa eritrocitaria. Okumura y cols. (1998) enviaron un año después a 606 personas que habían sido atendidos en el Hospital St. Luke, un cuestionario, de los que respondieron la mitad; el 46% señaló que seguía con síntomas oculares el 18,5%, fatiga el 11,9% y cefaleas el 8,6%. El 12,9% seguia sintiendo miedo al tomar el metro.Este síntoma lo hemos podido observar en situaciones semejantes; un paciente mío que tomaba habitualmente el tranvía en marcha, en una ocasión no lo consiguió por miedo o precaución, y ya no pudo cogerlo más de ese modo. Murata y cols. (1997) estudiaron la respuesta electroencefalográfica, a varios estímulos, unos siete meses después del atentado a 9 varones y a 9 mujeres, que habian presentado alteraciones. En dos pruebas la latencia de la respuesta del EEG estaba alargada en los que habían estado expuestos al sarín que en controles, es decir que la vía oftálmica desde la retina al cortex, estaba, al menos funcionalmente, alterada, asi como ocurrió con otros tests (Yokoyama y cols.(1998) como la asociación de dígitos con símbolos en 90 segundos, según un código de referencia. En las 9 mujeres, sin que se hubieran afectado los 9 varones, estaban disiminuidos los desplazamientos del centro de presión del cuerpo en el plano horizontal mediante una plataforma con transductores de presión que reflejaban el balanceo sobre una plataforma. Sin embargo, como los propios autores señalan, las 18 personas estudiadas formaban parte de un grupo de 150 elegidas inicialmente de las que 132 no participaron por falta de tiempo, ausencia de síntomas o signos clínicos, por miedo a recordar el atentado o por miedo a conocer que padecían secuelas de la intoxicación Nozaki y Aikawa (1995) y Suzuki y cols. (1995) en afectados por el sarín señalaron predominio de los efectos nicotínicos sin que hubiera aumento de secreciones y solonexcepcionalmente ni la típica bradicardia.

Himuro y cols (1998) comunicaron un caso de axonopatía dista de tipo sensorial en un paciente de 51 años que sufrió intoxicación grave por inhalación de sarín el día del atentado. Desde su ingreso no recuperó el

conocimiento y estuvo sometido a ventilación mecánica durante 15 meses hasta que murió de neumonía. En la autopsia se observó una pérdida total de fibras mielinizadas en la sustancia blanca de la médula espinal, excepto en los cordones posteriores, y una importante pérdida neuronal en la sustancia gris, excepto en el asta anterior donde persistían algunas neuronas (Fig. 9). Estas lesiones en la médula espinal son comparables a las observadas en casos de neuropatía retardada por insecticidas organofosforados en Haley y cols. establecieron una relación causa-efecto entre la exposición a agentes neurotóxicos y la neuropatía retardada debida a agentes neurotóxicos. En 249, de los 606 miembros de una unidad de reservistas del Ejército americano, desplegada en la Guerra del Golfo, que contestaron a un cuestionario detallado sobre los síntomas que padecían, encontrando que el 70% informó que tenía graves problemas de salud, Haley y cols. identificaron seis grupos de síntomas que podrían deberse a varios síndromes o variantes de una misma lesión neurológica, de los cuales uno de ellos estaba relacionado con la exposición a agentes neurotóxicos. El síndrome 1 o «trastorno cognitivo» estaba caracterizado por problemas de atención, memoria y razonamiento, más insomnio, depresión, somnolencia diurna y cefaleas.

El síndrome 2 o «confusión-ataxia» tenía alteraciones del pensamiento, desorientación, alteraciones del equilibrio, vértigo e impotencia.

El síndrome 3 o «artro-mio-neuropatía» presentaba alginas musculares y articulares, fatiga muscular, dificultad para levantar objetos y parestesias en extremidades.

En consecuencia la mayoría de los síntomas padecidos por los veteranos podrian deberse a combinaciones variables de lesiones: en encéfalo o tronco encefálico (por ejemplo: disfunción cognitiva y vestibular); en médula espinal y sistema nervioso periférico (por ejemplo: parestesias en extremidades, dolores musculares y en articulaciones); y en el sistema nervioso autónomo (por ejemplo: diarrea crónica). La neuropsicológicos y el estudio de la función audiovestibular en 23 veteranos que padecían síntomas correspondientes a los síndromes 1, 2 y 3 lesiones neurológicas generalizadas (Haley y cols. 1997) y del sistema vestibular asociadas a una neuropatía retardada inducida por organofosforados (Roland y cols. 2000). En los 249 veteranos habían estado expuestos durante la guerra a agresivos químicos, pesticidas, repelentes de insectos con

N,N-dietil-m-toluamida (DEET), bromuro de piridostigmina, ciprofloxacino, cloroquina, inmunizaciones múltiples, humos de los incendios de pozos petrolíferos, combustible de aeronaves, petróleo en agua de bebida, municiones con uranio empobrecido, vehículos con pintura resistente a agentes químicos, consumo de tabaco, alcohol o cocaína, ademas de haber estado sufrido el estrés del combate. (Haley y cols. 1997) Concluyeron que tres de los síndromes estaban asociados a la exposición a sustancias químicas, pero no a factores como los humos de pozos petrolíferos, uranio empobrecido, inmunizaciones múltiples o estrés por combate. El síndrome 1 era más común en los que habían utilizado collarines con repelentes de insectos; el síndrome 2 era más común en veteranos que decían haber sufrido efectos adversos por el pretratamiento con bromuro de piridostigmina, en aquellos que pensaban que sus unidades habían sido atacadas con agentes químicos y en los veteranos que realizaron su misión en zonas que pudieron estar sometidas a bajas concentraciones de agentes químicos una vez iniciados los bombardeos aéreos de instalaciones militares iraquíes; y el síndrome 3 era más común en personas que habían impregnado mucho su piel con repelente de insectos y en aquellos que habían padecido efectos adversos por el pretratamiento con piridostigmina; y deducen que estos tres síndromes pueden representar distintos grados de neuropatía retardada en función de los distintos niveles de exposición a agentes neurotóxicos, posibles interacciones con otros agentes químicos y diferencias de edad.

El N-acetil-aspártico (NAA) es un marcador de la masa neuronal, determinable de forma no invasiva por espectroscopía de resonancia magnética de protón (1H RMN),método no invasivo. En 22 veteranos con alguno de los tres síndromes descritos tenían disminuido los cocientes NAA/creatina en los ganglios basales y el tronco encefálico era menor que en 18 controles, es decir que aquellos tuvieron pérdida neuronal en esas zonas (Haley y cols. 2000).

Similarmente en 12 afectados con el síndrome 2 estaba disminuida la actividad dopamínica em el ganglio basal izquierdo respecto a 15 controles, (Haley y cols. 2000)

Engel y cols. (1997), Hyams y cols. (1997), Amato y cols. (1997), Gots y cols. (1997), Gray y cols. (1998) criticaron el escaso rigor del método epidemiológico empleado que en resumen son un universo limitado

a menos de trescientas personas con unas carácterísticas concretas pero a nuestro juicion esto confiere mas valor a la comparación con controles del mismo grupo; se criticó que los casos y los controles no fueron seleccionados al azar. Los estudios neuropsicológicos sólo se hicieron en 23 veteranos (4% de la unidad) que decían padecer los síntomas y por último que los síntomas los definian los veteranos.

Neuropatía retardada

Es poco probable que los agentes neurotóxicos desarrollen neuropatía retardada ya que se necesitan dosis o concentraciones muy elevadas, superiores a las letales, Experimentalmente se obtiene en animales con la administración previa o en su defecto inmediata y continuada de tratamiento farmacológico para asegurar la supervivencia del individuo. La administración OF a dosis superiores a 200 DL_{50}, a animales principalmente a gallinas, pretratados con pralidoxima u otras oximas más fisostigmina (Willems y cols., Gordon y cols.), permiten desarrollar la neuropatía.

La administración reiterada de dosis bajas de OF causa neuropatía, vista por Davies y cols. (1960) con el sarín.

Síndrome intermedio

Se trata de una miopatía retardada, de la placa neuromuscular por alteración de la transmisión nerviosa, descrito por Senanayake y Karalliedde en 1987, en 10 trabajadores que habían tenido intoxicaciones por los plaguicidas dimetoato, fentión, metamidofós y monocrotofós.como la aparición de debilidad y parálisis muscular,entre uno y cuatro días. es decir después del síndrome colinérgico. Pero antes de lo hubiera hecho de presentarse, la neuropatía retardada. Su clínica recuerda al cuadro colinérgico agudo y a la polineuropatía. Se ha descrito en intoxicados por plaguicidas orgánofosforados, con una incidencia de 2 al 27%, (18% de 200 casos consecutivos estudiados por Wadia y cols. 1974) recuperandose el 58% a los 4 días o en el 32% hallado por Nadarajah (1991) entre 90 intoxicados con OF. Los agresivos OF no han causado este síndrome en los intoxicdos ni en los estudios experimentales. Comienza entre el 1.º

al 4º y hasta el 6º día, despues de la exposición. Se caracteriza por paresia aguda y luego parálisis de los músculos respiratorios, de los proximales de las extremidades, de los flexores del cuello, de los y de los inervados por los nervios craneales, de los músculos respiratorios, signos bilaterales del tracto piramidal y arreflexia, manteniéndose normal el electromiograma de los músculos afectados, sin que mejoraran por grandes dosis de atropina ni por las oximas. Por la afectación de los músculos respiratorios hay alto riesgo de muerte. (De Bleecker y cols. 1993) indican que el origen de este síndrome está relacionado con la prolongada inhibición de la colinesterasa sináptica durante el síndrome colinérgico. Good y cols. (1993) observaron una degeneración en la placa motora terminal, con pérdida de receptores postsinápticos, en una biopsia de, músculo intercostal de un pacien. de 51 años expuesto a fosmet. La inyección venosa de 110 g/kg. de tabún, (y similarmente de somán) causaba necrosis, tanto mas acusada cuanto mas actividad tenga el músculo de la placa motora, ya a las 12 horas; la necrosis es reversible. (80-100 tg/kg S.C.) (Kawabuchi y cols. 1985) y somán (55 ¡.tg/kg S.C.) 83, aunque en este caso las lesiones eran menores. Los resultados de los estudios descritos podrían correlacionarse con el síndrome intermedio.

Senanayake y cols. 1987 describieron diez casos a los que durante la crisis colinérgica se había inyectado más de 40 mg de atropina cada 24 horas además de 1 g de 2-PAM Cl cada 12 horas, durante, uno a dos días. Los 10 pacientes desarrollaron a las 24 a 96 horas de haberse intoxicdo un síndrome de parálisis de los pares craneales III, IV, VI, VII, y X; debilidad de los músculos respiratorios que obligó a instaurar ventilación asistida a cuatro afectados, debilidad de los músculos proximales de los miembros más signos piramidales, recuperándose al cabo de 5 a 18 días. El EMG de los músculos de las extremidades y la conducción en el nevo eran normales. El estímulo sostenido del abductor pollicis brevis estaba apagado sin facilitación postetánica, con máximo entre los días 4 al 6 normalizándose la respuesta eléctrica entre los días 8 a 10.

Perron y cols. 1969, Gadoth y cols. 1978, DeBleecker y cols. 1992, describieron algunos casos en los que la paresia o la parálisis persistieron días o semanas. Benson (1992) sugirió que el cuadro podria deberse a retraso en la administración de oximas, pero se ha presentado con una correcta administración de estos antídotos (Haddad 1992).

El cuadro puede persistir desde 8 días a varias semanas y acompañarse de una importante insuficiencia ventilatoria (De Bleecker 1995) que requiere respiración asistida. (Perron y cols. 1969, Gadoth y cols. 1978, Karademir y cols. 1990, De Bleecker y cols. 1992).

Benson (1992) sugirió que podria ser debido a no haber empleado precozmente oximas pero ha habido casos en los que se empleó este antídoto correctamente (Haddad 1992); otros lo atribuyen a una reintoxicción endógena. Para algunos el síndrome del Golfo fue un síndrome intermedio o un síndrome tardío con secuelas a largo plazo.

Este cuadro se ha atribuido a que la hipractividad colinérgica inicial de la placa motora haya agotado la producción de acetilcolina en la placa motora o la de sus receptores nicotínicos.

Síndrome del golfo

El 10% de los 697.000 veteranos americanos desplazados a Arabia y Kuwait en la operación llamada «Tormenta del Desierto» (1990-1991),desarrolló a su regreso un síndrome complejo, que se ha denominó algo restrictivamente, «Síndrome de Guerra del Golfo Pérsico, caracterizado por erupciones, cefalea, fatiga crónica, dolores musculares y articulares, trastornos digestivos y respiratorios, dificultades de concentración, pérdida de memoria, irritabilidad y depresión, dificultad respiratoria, alteración del sueño, diarrea y otros síntomas gastrointestinales. Curiosamente las esposas e hijos de los veteranos señalaron síntomas semejantes despues de la guerra.

A pesar del predominio de las manifestaciones neuropsiquiátricas, dos estudios controlados han demostrado, en algunos pacientes, la afección de funciones neurológicas así como una neuropatía periférica (Haley y Kurt 1997, Jamal 1996).

Khan y cols. (2003) habian estudiado las anomalías colinérgicas periféricas de los pacientes con fatiga crónica en cuanto si podian ser debidas a disminución de la actividad de la colinesterasa expresada en el endotelio vascular, usando laser Doppler imaging para medir el flujo de la piel del brazo en respuesta a la aplicación por iontoforesis de la acetilcolina y de la metacolina (substancia que no es hidrolizada por la cholinesterasa). En los pacientes con fatiga crónica, la respuesta a la acetil-

colina era significativamente mayor en los pacientes con fatiga crónica que en controles (P = 0.029, sin que hubiera diferencias entre la acetilcolina y la metacolina.

En los afectados por el síndrome del Golfo y los que habian sufrido intoxicaciónes por plaguicidas y en controles la respuesta a la acetilcolina era normal. La respuesta a la metacolina fue mayor que la causada por la acetilcolina en los afectados por el síndrome del Golfo y en los intoxicdos por OF,

Diversos autores niegan la existencia de este síndrome como Haley y cols. (1997). Gray y cols (1999), no encontraron diferencias de morbilidad obtenida de las historias clínicas de los veteranos hospitalizados desde marzo de 1991 hasta septiembre de 1995 entre 124.487 veteranos que desde el 10 al 13 de marzo de 1991 estuvieron cerca de Khamisiyah en donde el día 10 fueron destruidos los depósitos de sarín o de ciclosarín en una zona delimitada de acuerdo con el area de dispersión, el tipo de munición existente en los arsenales, las propiedades físico-químicas y toxicológicas de los agentes y la neteorología, que pudieran haber estado expuestos a bajas concentarciones de esos agresivos respecto a otros 224.804 veteranos que estuvieron desplegados en esas fechas en el teatro de operaciones pero fuera del área de riesgo.

Entre los que lo admiten han sugerido diversas causas como el estrés, los medicamentos empleados para proteger a los soldados contra mosquitos, serpientes y roedores, a la inhalación de SO2, NO2, CO, CO2, SH2 y otros muchos componentes de los humos procedentes del incendio de los pozos de petróleo

Abou-Donia y cols. (1996) cree que se debió al bromuro de piridostigmina empleado en ambiente de guerra, como pretratamiento de una agresión por organofosforados. Schumnn y cols. (2002) basados en informes de varias naciones lo atribuyeron a una vacuna de esporas de anthracis procedente de un bacilo atenuado, que se aplicó a las tropas americanas desplazadas a la península arábica y similarmente se pensó en la vacuna anticolérica.

Bismuth y cols. (1996) consideran que es el síndrome intermedio o el tardío causado por exposición, al sarín y a la iperita, que se habrían liberado de los depósitos de estos agresivos bombardeados por los propios americanos en marzo de 1991; entre los cien búnkeres del complejo de

Khamisiyah dos contenían cohetes de 122 mm cargados con sarín y ciclosarín, (GF) que Irak habría producido al quedar embargadas las materias primas para obtener sarín, pero no se afectaron los soldados cercanos,al menos de forma aguda.

Consideramos a la luz de las publicaciones efectuadas, que describen los cuadros, que podría tratarse de una manifestación de la neurosis de renta.

Diagnóstico

La aparición en un corto tiempo, y más si ha habido un ataque con armas no convencionales de personas con miosis, hipersecreciones, debilidad muscular e insuficiencia respiratoria y cardiocirculatoria dan el diagnóstico casi seguro de una agresión por OF aunque en otro ambiente podrían ser debidos a intoxicción aguda por plaguicidas. Una colinesterasa plasmática inferior al 60% de la normal o de un 50% de la eritrocitaria apoya el diagnóstico. Hay que tener en cuenta que la Iperita inhibe a este enzima.

La colinesterasa se puede determinat por el Merckotest que consiste en tiras de papel impregnadas con acetilcolina y azul de bromotimol como indicador de pH. Se deposita I gota de suero o plasma en un pocillo de una placa de plástico sobre la que se coloca un trocito del papel reactivo se tapa con un cubre para formar una cámara húmeda y a los seis minutos se compara el color causado por el ph bajo debido al acético liberado con los colores de una escala. Con más exactitud se determina por electrofotometría, pasando los valores obtenidos a una escala que da la concentración, que tendría a la temperatura estándar de 25ºC. Tambien se puede utilizar la determinación de las enolasas y la de la glucuronidasa plasmática (Satoh y Hosokawa 2000).

Se pueden buscar los catabolitos del agresivo y asi en el caso del sarín el isopropanol o la acetona.

Atención inmediata

Si hay insuficiencia respiratoria aplicar inmediatamente la técnica de Schäfer consistente en comprimir alternativamente la parte inferior del tórax, hasta que se pueda aplicar ventilación asistida. A nivel de batallón

el ejército de USA dispone de un dispositivo llamado RDIC (resuscitation device, individual, chemical) Debe haber al menos posibilidad de intubar en pimeros puestos de socorro para aspirar secreciones y conectar a ventiladores o en su defecto practicar respiración boca a boca, ya que se expira muy poco agresivo, pero si hay riesgo si está contaminada la cara, para los socorristas. Hay que tener en cuenta que la bronconstricción dificulta la aireación

Debe alejarse a los intoxicdos por agresivos OF del área atacada llevándolos a un área alta ya que los OF son más pesados que el aire, donde haya aire fresco y altas. Si los OF se liberaron dentro de una edificio, se debe evacuar enseguida. Los que crean que han estado expuesto, deben quitarse la ropa inmediatamente sin pasarla por la cabeza e introducir la ropa en una bolsa de plástico sellada e introducida en otra que tambien debe sellarse; lavarse rápidamente todo el cuerpo con agua y jabón y buscar atención médica lo más rápido posible. Si recibe ayuda para desnudarse, quién lo haga debe evitar tocarlo. Si tienen picor ocular o la visión borrosa, debe enjuáguarsele los ojos con agua limpia unos 15 minutos. Caso de entrada oral no se deben administrar eméticos. Hay que tener en cuenta que el cuadro puede aparecer despues de haber descontaminado al paciente.

Tratamiento

Debe aplicarse inmediatamente si hay seguridad de haber estado expuesto o si hay síntomas Los síntomas causados por los OF inhalados aparecen a pocos segundos o minutos y casi siempre en la primera hora, pero los llegados a la piel, pueden tardar en aparecer hasta 18 horas, tiempo que debe durar la vigilancia. Si no hay seguridad de la exposición habrá que valorar la probabilidad de que lo haya sido y relacionarla con los posibles efectos adversos de tratarla sin haber estado intoxicada. El tratamiento debe ser tanto mas precozmente cuanto mayor haya sido la contaminación. Debe prestarse atención urgente de las funciones respiratoria y cardiocirculatoria, mediante ventilación asistida especialmente si entraron vapores, o si se va a inyectar atropina para reducir el riesgo de fibrilación ventricular. Primero se aspirarán las secreciones y especialmente los tapones mucosos bronquiales que obstruyen la vía, lo que puede re-

querir bastante tiempo, manteniendo al paciente en drenaje postural de las secreciones respiratorias, cuya fluidez podría mejorar la acetilcisteina. Aplicando luego un respitador. El espasmo bronquial requiere que se aplique a la respiración asistida presiones de 50 a 70 cm de agua o mayores para pasar a la de 40 cuando ha disminuido el broncoespasmo.

Si precisa tratamiento con atropina, monitorización cardiopulmonar o registro continuo del ECG debe ingresarse en UVI.

Bloqueantes colinérgicos

Estos compuestos compiten con la acetilcolina en los receptores muscarínicos, sin afectar a los nicotínicos, reduciendo el hiperestímulo colinérgico, sin impedir que los OF inhiban a la colinesterasa.

La reducción de los efectos en animales intoxicdos por dosis altas de inhibidores de la colinesterasa, llevó a emplear la atropina para tratar al hombre intoxicdo con OF. La atropina debe inyectarse intravenosamente salvo que siga en hipoxia y en su defecto por vía intramuscular o endotraqueal. En ocasiones puede requerirse la perfusión continua de 0’02-0’08 mg/kg/h de atropina. La atropina revierte la depresión central y el broncocoespasmo pero no la paralisis múscular, ni la miosis.

Los combatientes en un escenario de guerra química, disponen de autoinyectables con 2 mg de atropina, dosis que se considera eficaz en autoadministración sin que menoscabe la disponilidad del soldado salvo parálisis de la acomodación que causa visión borrosa y aumento de unas 35 pulsaciones por minuto, que no suele ser notada por el soldado. Esta dosis optimiza el beneficio con el menor riesgo para la persona que se inyecta sin haber estado expuesto a los OF. En la doctrina para usar estos autoinyectables, debe tenerse en cuenta la probabilidad de la agresión, tener entrenado a los mandos para ordenar el momento de inyectarse y a todo el personal para tomar la iniciativa de hacerlo si es conveniente. En exposiciones intensas se deben inyectar tres MARK I. Hay estuches individuales con 3 autoinyectables con 3 mg de atropina cada uno si por miedo o ignorancia se inyectan los tres si haber estado intoxicdos puede causar somnolencia y amnesias. La dosis superiores a los 2 mg pueden rebajar la disponibilidad.

La atropina a dosis adecuadas hace desaparecer los efectos de los OF sobre los órganos con receptores muscarínicos disminuye las secreciones, el broncoespasmo los movimientos intestinales pero no la miosis que por ello no debe ser utilizada para regular la atropinización (la atropina produce midriasis solo si se aplica venosamente). La atropina se dosifica según la necesidad que depende del tipo de OF, de la cantidad de este absorbida, de la via de entrada, del tiempo transcurrido desde el ataque y de los síntomas especialmente la bradicardia. En los casos graves, en los menores de 12 años 0,05 a 0,1 mg/kg y en los mayores 2 a 4 mg cada 15 minutos hasta lograr la atropinización siguiendo con 2 mg cada 5 a 10 minutos hasta que se haya normalizado la ventilación pulmonar, que haya más de 120 pulsaciones por minuto, que no existan trastornos de la conducción cardiaca, que haya midriasis y haya desaparecido la hipersecreción bronquial, manteniendo la atropinización con dosis repetidas durante 2-18 horas, según la gravedad del cuadro. La dosis puede ser disminuida cuando los síntomas se mantengan estables durante al menos 6 horas. En la intoxicación media con el paciente consciente seguir inyectando intramuscularmente 2 mg cada 5-10-minutos hasta que haya desaparecido la disnea y las secreciones, evaluadas por la sequedad perioral y las pulmonares por auscultación sean mínimas; hay que tener en cuenta que el moco espesado contribuye a dificultar el flujo de aire, sin que suponga aumento de secreciones. En los casos leves suelen bastar una o dos inyecciones de 2 mg. En casos graves se debe seguir tambien hasta que desaparezca la broncoconstricción. El paciente tratado recupera la conciencia entre 0,5 a 3 horas.

En las intoxicaciónes con plaguicidas se ha llegado a administrar una dosis total de 20 mg, pero esa dosis fue ineficaz en los intoxicados por tabún en y luego por sarín en los iraníes atacados por Irak, con parálisis respiratoria; en ellos se comenzaba con la inyección de 7 autoinyectables de 2 mg llegándose a poner, en algunos casos graves por tabún 1.000 mg, y en dos casos observados por nosotros hubo que inyectar dosis totales de 1.250 mg, teniendo en cuenta que es mejor pasarse que quedarse corto, pero vigilando los efectos de dosis excesivas. La atropina puede disociar transitoriamente la A-V y a seguido bradicardia, pero esa disociación no aparece en los intoxicdos por OF (Oberst y cols. 1956). La atropina causa midriasis, inhibe el reflejo fotomotor y el de la convergencia ocular y el de la acomodación; puede empeorar un glau-

coma de ángulo cerrado. Dosis bajas pueden aumentar la bradicardia. La atropinización bloquea los receptores vagales M2 del nódulo de Hiss causando taquicardia, disminuye las secreciones especialmente la del sudor y la de la saliva llegando a secar la piel y boca dificultando la disipación del calórico que en ambiente cálido y si se hace ejercicio, puede causar golpe de calor. Al hacer caminar 115 minutes a 3,3 km por hora a unos 83°F (71°F en el termómetro de bulbo húmedo,a 35 soldados a los que se les había inyectado los 2 mg de atropina mas de la mitad se derrumbaron o se les separó poque teían 103,5°F o más recorrido que completaron normalmente si no se les inyectó la atropina (Robinson y cols. 1953, Sidell y cols. 1974); la sequedas oral puede dificultar la ingesta y la deglución de comprimidos, por ej. de oximas. La vigilancia debe continuar al menos 72 horas despues de desaparecer los síntomas, al retirar la atropina, pues si reaparecen aquellos, debe restablecerse la atropina inmediatamente.

Si se atiende a un intoxicado inmediatamente o en los 30 minutos, despues de la exposición por vía aérea debe inyectarse un autoinyectable del equipo MARK I si el único signo observable es la miosis, dos si hay disnea y tres si la disnea es grave u otros signos de gravedad adicionando diazepán si se atiende despues de 20 minutos de haber estado expuesto. Si el síntoma más destacado era la disnea debe ceder antes de cinco minutos y no se debe reinyectar hasta entonces.

La sudoración local y las ondulaciones bajo la piel que pueden pasar desapercibidas; si aparecen se debe poner una inyección del equipo MARK-I y en caso negativo somterlo a observación varias horas

Los antídotos deben darse hasta que la respiración sea normal y las secreciones mínimas. En una persona consciente, con síntomas moderados con disnea se suele recuperar con 2 o 4 mg de atropina, es decir uno o dos MARK I; si esta inconsciente y apneico o casi apneico se debe comenzar con 6 a 16 mg de atropina es decir tres MARK y ventilación asistida. La atropina debe seguirse inyectando hasta que el intoxicdo respire nomalmente con pocas secreciones orales y respiratorias aunque siga con naúseas o vómitos.lo que puede requerir 2 a 3 horas, pero si hay distrés respiratorio se continuara, controlando la atropina hasta 36 horas. (si la intoxicción se debe a plaguicidas OF, la necesidad de atropinizar piede durar semanas.

La adición a la atropina antimuscarínicos como el trihexifenidilo, o el 3-quinuclidinil benzilato (BZ, QNB, benactizina) favorece la entrada de la atropina en el SNC permitiendo que actúe en este nivel y que sea eficaz en la intoxicación por el sarín y el somán, aumenta la eficacia del pretratamiento y disminuye los efectos secundarios. Este tipo de asociaciones sería más indicado si es necesario administrar pretratamiento a poblaciones en las que pueden haber personas más susceptibles ala piridostigmina, como es el caso de pacientes asmáticos. El preparado TAB, contiene atropina, la oxima TMB4, y benactizina y es un magnífico antídoto. Los soldados egipcios capturados por los israelitas en la guerra del Yom Kippur llevaban autoinyectables que contenían TAB.

El Departamento de contraterrorismo del CDC, Centro de Control de Enfermedades de USA, (CDC), preparó en 2003, en un programa que costó 56 millones de dólares, ha comenzado a distribuir en marzo de 2004 secreto cientos de paquetes con atropina a autoridades y a varios hospitales de la costa este americana sobre todo en Nueva York y Boston, en donde tendrán lugar durante el verano las Convenciones de los dos grandes partidos. En USA ha distribudos depósitos estrategidos de antídotos de modo que en menos de 12 horas puedan llegar a los puntos atacados

Oximas

Son medicamentos nucleofílicos que revierten la unión del fosforil o del fosfonilo con la serina de la colinesterasa. Algunas tienen un piridinium, pero la mayoria son bispiridinium es decir, dos anillos piridinium unidos por un éter. Casi todos (las HGG) tienen una oxima en las posiciones 2 o 4 en uno de los anillos de piridinio y en el otro anillo otra oxima, una amida, un grupo arómatico ciclohexilo o una fraccion alifática. Hay excepciones como las de las series SAD y algunos compuestos P y HP que son monoximas.

Wilson y cols (Wilson 1951) comunicaron que las oximas revertian los complejos de la colinestterasa con OF y luego que el [2-PAMI] es decir la piridina-2-aldoxima met-iodiduro era mas eficaz que la hidroxamina.

Valores ED50 de los antídotos inyectados al ratón intramuscularmente junto con 10 mg/kg de atropina al minuto de la exposición de tres DL50

para el Tabún dos para el sarín y una DL95 para el somán. Entre paréntesis LD50/ED50 (Schoene y cols).

Compuesto	*DL50*	*Tabún*	*Somán*	*Sarín*
2-PAM				

«Potencia protectora» de cuatro oximas frente a agresivos nerviosos.

Oxima	*Tabún*	*Somán*	*Sarín*	*VX*
Trimedoxima	++	-	++	++
Obidoxima	+	-	++	++
HI-6	0	+	++	+++

La protección esta relacionada con la ED50 que es mayor para las HGG-52, HGG-42,HGG-12 y menor las HS-3,HI-6, y HS-6.

El envejecimiento limita la actividad de las oximas. Las oximas no reactivan a la colinesterasa inhibida por somán ya que la dealquilación es muy rápida. Las oximas son particularmente útiles para regular la actividad colinérgica en los receptores nicotínicos, en general, y especialmente en los neuromusculares. Las oximas se unen al átomo de fósforo,separando el fosfato de la colinesterasa que regenerada puede hidrolizar a la acetilcolina. El efecto solo tiene lugar, si la unión no se ha consolidado, envejecido, por lo que su aplicación deberá hacerse lo antes posible (Berry y cols. 1966, Spencer y cols. 2000), antes de haber transcurrido 12 minutos despues de haberse unido la colinesterasa al agente nervioso, ya que en caso contrario la fosforilación es irreversible (Berryy cols. 1966, Spencer y cols. 2000, Pita y cols. 2002); sIn embargo, en los casos graves, y según algunas observaciones, se recomienda administrar aunque sea tardiamente la pralidoxima. La mayoria de las oximas, al ser amonios cuaternarios, no pasan la barrera hemato-encefálica por lo que no impiden la parálisis respiratoria central

La DL50, la dosis media efectiva (ED50) el I50, el porcentaje de reactivación y el índice de protección y el índice terapéutico (TI) sin atro-

pina se determina en ratas blancas, macho intoxicdas con 1,3 DL50 del agresivo. El índice protector en la rata macho de 18 a 26 g se determina para 30 (mol/kg administrada juntamente con 10 mg/kg de atropina. La razón protectora (FP) en inglés «protective ratio» (PR) es el aumento de la DL50 o de la LCt50 producido por un antídoto. Un FP de 1 implica la ausencia de protección; si es 2 quiere decir que se necesita una exposición doble para producir el mismo efecto que sin el antídoto; un profilactico debe tener al menos 5 FP. Las dosis a utilizar de estos antídotos están guiadas por la clínica y son equivalentes a las utilizadas en caso de intoxicaciónes por insecticidas anticolinesterásicos (Aaron 2001). Pueden administrarse 1 g por inyección intramuscular o por via oral pero puede llegarse a los 8 g. El hecho de que las oximas no reviertan completamente los efectos de los OF hace pensar que estos agentes inhiben a la colinesteresa por otros mecanismos. Las oximas son muy eficaces en los órganos con receptores nicotínicos y poco en los que tienen abundantes receptores muscarínicos. Por ej. mejoran mucho el tono muscular y suprimen la fasciculación.

Las oximas más importantes son:

El yoduro de piridin-oxima (PAM); es el primer compuesto de este grupo

El TMB-4 que es el dibromuro de 1,1´-(1,3´.1,1-propanedil)bis(4- hidroximino)metil)piridinium o bromuro de N,N'-trimetil-enebis-[piridina-4-aldoxima] es mas eficaz frente al tabún que el 2-PAM Cl.

La pralidoxima (Contrathión ®) es el cloruro de 2(hidroximino) metil)-1-metipiridinium o cloruro de 2-PAM o cloruro de metil 2-piridina aldoxima o 2-PAM Cl, o 3-pralidoxima. El Protopam Chloride, del laboratorio Wyeth-Ayerst lo presenta en viales de 1 g liofiliado. Es la oxima preferida por los americanos, aprobada por la FDA y la más empleada frente a los plaguicidas y a los agresivos. (Rosen 1960, Funckes 1960,Quinby 1961, 1964, Jacobziner y cols. 1961, Durham y cols. 1962, Quinby y cols. 1963).La pralidoxima reduce la vida media de los carbamatos desde 1.880 a 3,3 días, Eficaz para los síntomas nicotínicos; ejora mucho el tono y la fasciculación de los músculos.

Se debe administrar en los casos graves en los que la depresión respiratoria, la debilidad y los espasmos musculares sean graves. Iniciar su

administración venosa o muscular profunda, siempre tras la atropina. La dosis efectiva depende del OF, del lapso transcurrido desde la agresión. Para Sundwall (1961) 4 µg/mL en sangre revierte el efecto del sarín en el gato anestesiado, La dosis en los menores de 12 años es de 25-50 mg/kg y en los mayores 15 a 25 mg/kg (1 a 2 g), según la gravedad,sin pasar de 2,5g. Puede administrarse por vía oral, que aumenta lentamente, los niveles hemáticos lentamente o intramuscular o intravenosa al 1%, a una velocidad no superior a los 10 mg/kg/min y tardando siempre más de 30 minutos para evitar el efecto hipertensor. Al cabo de 1-2 horas puede repetirse la dosis y luego cada 6-12 horas según la gravedad del caso, pero mejor es establecer una perfusión continua despues de la primera dosis. Si aparece una crisis hipertensiva o depresión respiratoria,se infundirá más lentamente o se interrumpirá la administración.

No es eficaz frente al somán, pues el envejecimiento, se produce a los 2,5 minutos como media. No atraviesa la barrera hematoencefálica, según vieron Kewitz y cols. (1957), Loomis (1963) en animales, y Jager y cols. (1958) en el hombre, por lo que en caso de manifestaciones sobre el SNC sería más aconsejable utilizar otras oximas. Puede causar hipertensión, que revierte rapìdamente con 5 mg de fentolamina intravenosa.

Se excreta sin modificar por el túbulo renal; el 80 al 90% lo hace en las primeras tres horas (Sidell y cols. 1971). Swartz y cols. (1974) encontraron que su vida media era de unos 90 minutos. El clearance y la cantidad excretada disminuye por el calor, el ejercicio (Swartz y cols. 1973) y por la tiamina que bloque al paso tubular prolongando la eficacia de la oxima (Josselson y cols. 1977, 1978; some

La pralidoxima puede emplearse en expuestos crónicamente que tienen disminuida la colinesterasa de sus hematíes pata lograr que como mucho este un 20% inferior a su tasa habitual

La pralidoxima con el ComboPen da una concentración plasmática de 4 µg/kg a los 7 minutes con un máximo de 6.9 µg/kg a los 19 minutos. El metansulfonato de la pralidoxima (P2S) es la oxima básica en el RU.

El Pro-2-PAM es un derivado dihidro del cloruro de 2-PAM usado como pro-droga. La base libre es lipofílica permitiendo su paso por la barrrera hematoencefálica; en el cerebro se metaboliza activando el ca-

tabolito la colinesterasa cerebral aunque demasiado lentamente para proteger.

La Obidoxima (Toxogonina ®) es una oxima biscuaternaria.Su fórmula es el dicloruro de (1,1´-(oxibis(metilene))bis(4-((hidroximino)-metil)piridinium.La eficacia de la obidoxima aumenta con la dosis, pero si estas son elevadas da mas reacciones adversas.

Análogos del sulfonato de metano (P2S) Hagedorn y cols. prepararon, entre otras las series HS, HI, HGG, AD, SAP, PHH y HP.

El HS-3 tienen una oxima en la posicion 4. El HI-6, fue obtenido en Suecia en 1990. Es la bispiridinium oxima o diacetilmonoxima que es especialmente activa frente a la intoxicción por somán, que resiste a las demás oximas, protegiendo del fallo respiratorio que aparece mas tarde. También es eficaz frente al tabún (Lundy y cols. 1989) aunque para Wolthuis y cols. (1978) no parecía muy activo. La protección, como para las demás oximas, disminuye cuando se administra tardiamente; curiosamente (Lundy y cols. (1989) proteje más a las ratas hembra, que las macho, haciendo suponer que lo la acetilcolinesterasa se reactiva por un mecanismo hormono dependiente.

El BDB-27, comprende al 3- y al 4-benzoil y 3- y 4-ciclohexilcarbonil derivados del diyoduro del bis-piridinium-2-monooxima. Tiene un DL50 para el ratón macho de 179 mg/kg. Es la única oxima que protege contra el tabún, el somán, el sarín y el VX, siendo su factor de protección para el tabún 2,4, para el somán 3,3 para el sarín 7,4 y para el VX 15. Su I50,es decir el grado de inhibición de la mitad de la colinesterasa de los hematíes bovinos de 0,54.10-3M y para los humanos de 0,38.10-4. Su índice terapéutico es para el tabún 21, para el somán 46, para el sarín 40 y para el VX 30. El Índice de protección, para la colinesterasa de hematies bovinos inhibida por el somán fue 8,1 (para 1.10-4M) y de 4,01 (para 3,8.10-5M). (Maksimovic y cols.1980). Una mezcla de 25 mg/kg de HI-6 con 10 mg/kg de toxogonina con o sin diazepán más atropina cinco minutos antes o inmeditamente despues de la exposición, tiene un índice de protección para ratas y cobayas de 1,60-2,42 para el somán, de 1,9-31,7 para el tabún, de 20,7-196,3 para el sarín y de 9,9-135,1 para el VX. La misma mezcla administrada 60 minutos despues de la intoxicción reactiva la colinesterasa inactivada por el tabún, sarín o VX.

Jovanovic y cols. (1985) obtuvieron estos índices de protección en ratas intoxicadas con sarín. (Maksimovic y cols. 1989).

Antídoto	*DL50*	*Intervalo de confianza al 95%*	*Indice de protección*
Ninguno	116,4	52,3-259.2	—
Atropina + diazepan	162,5	101,8-259,6	1,4
Atropina + diazepan + 2,5 ±1,4 mcg/ml de ^PAM-2	270	223,1-326,6	2,3
Atropina + diazepán + 2,7 ± 1m3 mcg de HI-6	1462,2	1038,1-2076,4	12,6
Atropina + diazepán + 4,5 ± 1,9 mcg/ml de HI-6	1973,9	1532,1-2543,2	16,9

Dada la urgencia con la que se debe inyectar la atropina, hay diversos autoinyectables para que el propio intoxicdo pueda

Los autoinyectables para que el intoxicdo se inyecte inicialmente, incluso a través de su ropa, contienen sulfato de atropina solo o mezclada con cloruro de 2- PAM, o con P2S u obidoxima que tienen un pH de 2,0 y alta osmolaridad; si se añade benzodiacepinas se debe añadir un solvente orgánico como el propilenglicol, pero reduce la biodisponibilidad de la atropina y retrasa la inyección debido a su viscosidad. El CANA es un auto-injectable que contiene 2ml de diazepam aunque no debe ser inyectado por el paciente.

El equipo NAAK MARK 1 tiene dos autoinyectables para evitar incompatibilidades entre los medicamentos, el AtroPen con 2 mg de atropina y el ComboPen que tiene 600 mg de cloruro de pralidoxima (2-PAM Cl); inyectado intramuscularmente, logra una concentracón máxima plasmática de 6,5 La bradicardia causada por el AtroPen, tiene su máximo a los 2,5 minutes mientras que si se inyecta por la jeringa convencional se produce a los 4,3 minutos. El aumento de 10 pulsaciones tienen lugar a los 7,9 y 14,7 minutos respectivamente y el aumento máximo de la frecuencia del pulso en los que se utilizo el atroPen fue de 47 pulsaciones por minuto de media alcanzado a los 34,4 minutos, mientras que en los

inyectados convencionalmente el aumemto máximo medio fue de 36,6 pulsaciones por minuto alcanzado a los 40,7 minutos. Los autoinyectables son más eficaces y de acción más rápida. La jeringa montada con su aguja produce una masa cenagosa. Al inyectar el AtroPen, con mas fuerza se dispersa mas y por ello se absosbe más.

Si hay que repetir la administración de estos preparados, se pueden presentar reacciones debido a las diferentes vidas medias de sus componentes.

Las convulsiones deben tratarse con diazepán, que es una benzodiazepina que disminuye la frecuencia de las convulsiones en el rhesus (Lipp 1973), en las ratas y en el conejo (Rump y cols. 1972,1973), aunque se requiere atropina para dsminuir la letalidad.(Martin y cols. 1985), Administrada con el 2-PAM Cl, reduce la gravedad pero no la incidencia de las lesiones cerebrales causadas en las ratas por el somán (McDonough y cols. 1989). El ComboPen de USA tiene 10 mg de diazepam en 2 mL. Como la piridostigmina no impide las convulsiones debe utilizarse benactizina, benzodiazepinas, diazepam y midazolam que acortan la recuperación de la conciencia despues de exposición al soman (Hayward y cols. 1988), pues aunque incapacitans no actúan como tales en los afectados por OF.

En los intoxicdos por los agentes nerviosos no deben administrarse la morfina, la succinilcolina, la teofilina, las fenotiazinas, la reserpina y la fisostigmina. Las aminas adrenérgicas sólo deben administrarse si existe indicación específica, por ejemplo, hipotensión marcada.

Wills y cols. (1950) en animales cianóticos por la intoxicción con OF vieron que la administración intravenosa rápida de atropina podía producir arrimia y fibrilación ventricular. En algunos casos espacio ST y la onda T están aplanadoa,para lo que algunos proponen emplear propanolol. La taquicardia causada por los OF puede desaparecer por la taquicardia atropínica.

Si hay miosis y dolor ocular es útil la instilación de gotas de atropina o de homatropina y esteroides tópicos en gotas a los que presentaba conjuntivitis.

Otros tratamientos posibles es la infusióm de macromoléculas capaces de unirse estoiquiométricamente a los OF de la sangre que no tie-

nen apenas efectos adversos y que multiplican por 10 la DL_{50} en cavias y rhesus (Maxwell y cols. 1987). La carboxilesterasa u otras enzimas capaces de unirse e hidrolizar al somán, a los agentes G aunque no al VX, se han mostrado útiles en animales.(Broomfield 1992). Es posible administrar colinesterasa de suero fetal bovino o butiocolinesterasa humana o equina; su uso en primates, ratones o ratas intramuscular o intravenosamente proteje contra agresivos OF (Broomfield y cols. 1991, Maxwell y cols. 1992, Doctor y cols. 1993, Raveh y cols. 1993). La administración de colinesterasas humanas transgénicas o la de anticuerpos o haptenos contra cada OF (Lenz y cols 1984, 1992). Como Velan y cols. (1991), Masson y cols. (1993) han clonado y expresado los genes de las dos colinesterasas humanas se podrán utilizar para tratar a los intoxicados.

Detección ambiental

Los vapores de los cinco agresivos nerviosos se pueden detectar en el aire por el aparato de detección automática M8A1 (chemical alarm system) aunque da muchos falsos positivos que causan alarmas injustificadas y su sensibilidad es menor de 0,0001 mg/m3. Otros aparatos son el M8A1, M256A1 (detection card) y si están en estado líquido con el CAM, (chemical agent monitor) el ICAD (individual chemical agent detector) o mediante las tiras de los papeles M8 y M9.

Profilaxis

La profilaxis ideal seria aquella que con una sola administración protegiera segura y eficazmente, durante largo tiempo a los posibles expuestos, protección que debe comprender la plena disponibilidad del combatiente. Las máscaras estandard M40 y la M17A2, protejen varios días, la cara y las vías respiratorias de los OF así como frente a otros agresivos. Algunos modelos tienen un dispositivo que permite ingerir comprimidos.

En el teatro de operaciones no se puede proteger adecuadamente a un gran numero de expuestos por no disponer de los medios necesariamen-

te, no colocarlos adecuadamente, agotamiento de los discos de las máscaras etc., unido al estrés del combatiente que le dificultad protegerse.

Pretratamiento

El pretratamiento es la administración de un medicamento sin acción específica, (si la tuvieran sería quimioprofilaxis) para aumentan la eficacia de un tratamiento de una posible intoxicación o infección posterior. También se le ha llamado «medicación incrementadora de la eficacia antidotal». Las substancias empleadas como pretratamiento no deben tener efectos adversos, pues los que se benefician de ellos son una fracción de aquellos a los que se administran; su empleo, no debe omitir otras imporantes medidas.

Ante un probable próximo ataque por OF, la mayoría de los Ejércitos de la OTAN prevee el pretratamiento con tabletas con 30 mg de bromuro de piridostigmina: (bromuro de 3- dimetilaminocarboniloxi-N-metilpiridinio) (PYR, PB o NAPP), es decir un carbamato, o sea una amina terciaria producida por el haba del Calabar; su estructura química es:

La piridostigmina fue usado como elixir, por tribus del oeste africano para prácticas mágicas; se usa como modelo para provocar en animales de experimentación la clínica de la intoxicación por neurotóxicos, y actualmente la piridostigmina se emplea a dosis superiores a las empleadas en el pretratamiento para tratar el glaucoma y la miastenia grave.

La piridostigmina se ioniza en el organismo, y una pequeña proporción pasa la barrera hematoencefálica dada su estructura de amonio cuaternario, e inhibe las sinapsis colinérgicas. La carbamoilación, es decir la reacción de los carbamatos con el lugar catalítico de la enzima del SNC, no envejece, sin necesidad de emplear oximas y revierte fácilmente, y como el complejo se descarbamila lentamente, permite que desaparezca el OF antes de que haya podido unirse a la colinesterasa. La enzima carbamoilada no reacciona con los agresivos ya que su sitio activo esta ocupado por el grupo carbamato.

Así como la administración a un animal de una dosis letal de OF disminuye y puede hacer desaparecer a la colinesterasa en general rápidamente, pero si al animal se le administró previamente suficiente piridostigmina, la enzima liberada de su complejo colinesterasa-carbamato de la sinapsis basta para mantener funcionante a la sinapsis, (Solana y cols. 1991).

El pretretamiento aumenta la eficacia de la atropina y de las oximas muy especialmente en el caso del somán pero es incompatible con el cloruro de pralidoxima en soluciones acuosas.

Kluwe (1987) vió que la piridostigmina oral inhibió en un 20 a 45% la colinesterasa de los globulos rojos de rhesus machos; la rápida administración de atropina con 2-piridina aldoxima metil cloruro (2-PAM Cl) no protege satisfactoriamente del somán si no se pretrata con piridostigmina, siendo el PR 1,64. En contraste con este bajo nivel de protección, el pretratamiento con piridostigmina y terapia rápida con atropina y 2-PAM Cl da una PR superior a 40 respecto a controles, a los que se puso solo atropina y 2-PAM Cl). Koplovitz y cols. (1992) el 80% de los monos que fueron pretratados con piridostigmina y terapia postexposición con atropina y 2-PAM Cl sobrvivieron 48 horas despues de expuestos a 5 DL50 de somán o tabún, sin que influyera en la agresión con sarín p con VX. (Leadbeater 1988, Inns y cols. 1983, Koplovitz y cols. 1992). La piridostigmina, protegió a monos, a los que Kluwe y cols. (1987) administraron agresivos nerviosos, tratandolos luego con atropina y oximas.

En la Guerra del Golfo Pérsico se administró piridostigmina como pretratamiento ante un posible ataque con agentes nervioso, pues potencia mucho el efecto del tratamiento. La dosis habitual para el hombre es de 30 mg de bromuro de piridostigmina por vía oral cada 8 horas durante 3 semanas con la cual se obtiene una inhibición de la AChE sanguínea del 20-40%, nivel admitido como indicador de un buen pretratamiento, (Briggs y cols. 1986, Dunn y cols. 1989). Basta inhibir el 10% de la colinesterasa para proteger como vieron Lennox y cols (1985) en ratas y cobayas, para el somán.Marino y cols (1998) administraron 30 mg de bromuro de piridostigmina cada 8 horas a voluntarios, durante 21 días, encontrando que el 70% inhibía mas del 10% de la AChE.

RAZÓN PROTECTORA (RP)

Especie	*Atropina + Oxima*	*Atropina + Oxima + Piridostigmina*	*Fuente*
Tabún			
Conejo	2,4	3,9	Joiner y cols. 1988
Conejo	4,2	> 8,5	Koplovitz y cols. (1994)
Ratón	1,3	1,7 (2,1)	Koplovitz y cols. (1992)
Cobaya	4,4	7,8 (12,1)	Koplovitz y cols. (1992)
Sarín			
Ratón	2,1	2,2 (2,0)	Koplovitz y cols. (1992)
Cobaya	36,4	34,9 (23,8)	Koplovitz y cols. (1992)
Somán			
Ratón	1,1	2,5	Sultan y cols. (1983)
Rata	1,2	1,4	Anderson y cols. (1992)
Cobaya	1,5	6,4 (5,0)	Jones y cols. (1985)
Cobaya	2,0	2,7 (7,1)	Lennox y cols. (1985)
Cobaya	1,9	4,9	Capacio y cols (1995)
Cobaya	1,7	6,8	Inns y cols. (1983)
Conejo	1,4	1,5	Joiner y co y cols. 1988
Conejo	2,2	3,1	Sultan y cols. (1983)
Conejo	1,9	2,8	Koplovitz y cols. (1994)
Rhesus	1,6	> 40	Kluwe (1987)
GF			
Ratón	1,4	1,4	Stewart y cols. (1993)
Cobaya	2,7	3,4	Stewart y cols. (1993)
Rhesus		5	Koplovitz y cols. (1992)
VX			
Ratón	7,8	6,0 (3,9)	Koplovitz y cols. (1992)
Rata	2,5	2,1	Jones y cols. (1985)
Cobaya	58,8	47,1 (45,3)	Koplovitz y cols. (1992)

(entre paréntesis con dos dosis de piridostigmina)

Adversos

La piridostigmina podría ser tóxica cuando esté carbamoilada más del 40% de la colinesterasa de la sinapsis. Los animales tratados con atropi-

na-oximas si recibieron piridostigmina como preventivo sobreviven a la administración de dosis grandes de OF pero presentan a menudo lesiones histológicas cerebrales u convulsiones debidas a la acción cerebral de la piridostigmina. (McLeod 1985). Hudson y cols. (1985) encontraron con dosis que bajaron un 60% la AChE alteraciones de las mitocondrias pre y postsinápticas, de las terminales nerviosas y de los sarcómeros de la placa neuromuscular.Las ratas que recibieron diariamente, 90 mg/kg de piridostigmina durante 15 días, presentan cambios miopáticos reversibles, en el 1% de las miofibrillas del diafragma, y sobre todo en la porción postsináptica de la unión neuromuscular. (Bowman y cols. 1989). Los efectos secundarios del pretratamiento con bromuro de piridostigmina se deben a una extensión de la actividad colinérgica en distintos órganos e incluyen aumento de la motilidad gastrointestinal, dolores abdominales, náuseas, bradicardia, miosis y aumento de la secreción lacrimal, salivar, gastrointestinal y bronquial. A dosis terapéuticas el bromuro de piridostigmina puede aumentar la motilidad gastrointestinal, dando dolores abdominales, náuseas, bradicardia, miosis. y aumento de la secreción lacrimal, salivar, gastrointestinal y bronquial. Taylor (1996). Se ha señalad eritema en el 0,1% de los casos.

Dosis elevadas de 200-1.400 mg/día (Niesen y cols. 2000),usadas en la miastenia, aumentan la inhibición de la colinesterasa de los globulos rojos, causa miosis, sudoración, sialorrea, hiperperistaltismo que disminuyen la disponibilidad del combatiente. (Gall 1981) no observó alteraciones de la memoria, de la vigilancia de la destreza manual, ni en los tests psicométricos. No se altera la capacidad para conducir vehículos, ni aviones. (Schiflett y cols. 1987)

No se han encontrado alteraciones pulmonares ni cardiovasculares despues de tomar piridostigmina ocho días (Glickson y cols 1991), ni siquiera en montaña (Krutz y cols. 1987) aunque Graham y cols. (1984) vió ligera disminución para tareas visuales. Si la inhibición de la colinesterasa causada por la piridostigmina supera al 30% podría aumentar la acción de los OF pero no se han observado efectos aditivos de estas substancias. Levine y cols. (1991) no encontraron mutagénesis ni teratogénesis en unos pocos animales. Tampoco se han visto en hijos de mujeres con miastenia gravis a las que se siguió administrando dosis elevadas de piridostigmina durante su embarazo (Briggs y cols. 1990).

Sin embargo, durante la Guerra del Golfo estos efectos fueron mínimos teniendo en cuenta el beneficio que aporta su uso en caso de exposición a agentes neurotóxicos. Este pretratamiento parece, por tanto, bastante seguro en una población sana. Tampoco se han descrito efectos a largo plazo en las dosis empleadas en el pretratamiento. Keeler y cols (1991) estudiaron retrospectivamente a los 41.650 soldados que recibieron el pretratamiento durante la Guerra del Golfo Pérsico, («Tormenta del desierto»), en enero de 1991, durante 1 a 7 días observaron que menos del 1% había sido atendido por los servicios sanitarios por problemas que pudieran haberse debidos a la piridostigmina; el 50% tuvo alteraciones gastrointestinales incluyendo flato, heces líquidas y contracciones abdominales discretas, que fueron menos frecuentes si se tomaba la piridostigmina en las comidas. El 5 al 30% tuvo aumento de micciones y de la urgencia para orinar. En un 2 a 4% tuvo cefalea sudoración, rinorrea; dos tuvieron eritema medicamentoso uno de ellos con urticaria y edema que respondió a la difenhidramina y tres exacerbación del broncoespasmo. La mayoría de estos síntomas aparecieron a las pocas horas de haber tomado la primera tableta, que en muchos persistieron uno o dos días y en otros seguían presentándose con todas las tomas del medicamento. Solo el 0,1% había tenido efectos secundarios significativos que requirieron la supresión del pretratamiento y el agravamiento del asma de siete soldados; en 213 soldados israelíes que recibieron 30 mg de piridostigmina cada 8 horas tuvieron el 9% sudoración excesiva, el 22,1 nauseaa, el 20,4 dolor abdominal el 6,1%, diarrea el 6,1%, y el 11,3% recuentes micciones. La colinesterasa de los hematies fue similar en los que tuvieron síntomas que en los no los presentaron.

En cuanto a la posible intervención de la piridostigmina en las neuropatías y miopatías que padecen algunos veteranos de la Guerra del Golfo Pérsico en EE.UU. y en el Reino Unido (Moss 2001), Kaiser y cols. (2000) no encontraron en personal militar americano que recibieron piridostigmina durante la Guerra del Golfo, reducción de la fuerza muscular de las mediante un dinamómetro que medía la fuerza de cierre de la mano.

Se atribuyó el síndrome del Golfo, al paso de piridostigmina al cerebro a traves de la barrera HE, cuya permeabilidad estaria aumentada por el estrés o por la interacción de la piridostigmina con otros agentes neurotóxicos o por la acción de los propios agresivos nerviosos; por ello los

animales intoxicados por OF a los que se administra 2-PAM Cl, otro compuesto cuaternario, se encuentra en el cerebro, en el que no debiera haber estado. El estrés físico o psíquico aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y seria posible que lo fuera para la piridostigmina. Algunos agentes adrenérgicos y la cafeína, a dosis muy superiores a las empleadas habitualmente como bebida recreativa pueden potenciar los efectos tóxicos de la piridostígmina quizás por la alteración del equilibrio adrenérgico-colinérgico de la función cardio-respiratoria (Chaney y cols 1997. Sharabi y cols. 1991). Esto hace pensar que los efectos adversos señalados para la pìridostigmina pudieran ser debidos, al menos en parte al estrés. Shaikh y cols. (2003) provocaron estrés a ratas jóvenes macho Sprague-Dawley, haciéndolas correr 90 minutos diarios durante 14 días demostrado por el aumento de corticosterona medida inmediatamente despues de la carrera, los dias 1, 3, 7 y 14. La administración despues de cada carrera de 10 mg/kg de piridostigmina disminuía a la hora significativamente la colinesterasa de la sangre total y la del diafragma, mostrando una ligera pero significativa tóxicidad (movimientos involuntarios) los primeros seis días despues de los cuales apareció tolerancia. La repetición de las carreras reducía las colinesterasas hemática y diafragmática a la hora de la última administración de piridostigmina.

Si en lugar del estrés se administra a las ratas 0, 0,05, o 0,1 mg/kg diarios de paraoxón, y a la hora 3 mg/kg diarios de piridostigmina no se modificaba significativamente la inhibición de la colinesterasa inducida por la piridostigmina en el cerebro. Las exposiciones repetidas de paraoxón no modificaron la tóxicidad de la piridostigmina. La exposicion conjunta al estrés y al paroxón aumenta la inhibición de la colinesterasa plasmática por la piridoxina, sin que se modifique la del cerebro. Es decir que algunos agentes estresantes pueden modificar la tóxicidad causada por las exposiciones repetidas a la piridostigmina, es verosimil que esos cambios sean debidos a alteraciones de los mecanismos colinérgicos periféricos y no al pequeño paso de la piridostigmina al cerebro. Friedman y cols. (1996) observaron que ratones sometidos a natación exhaustiva a los que se les administró 0,01 mg/kg i.p. de piridostigmina (siendo la habitual la de 1,50 mg/kg) tenian reducida a la mitad la colinesterasa cerebral.con aumento del ARNm de la colinesterasa y del ARNAm, del oncogén c-fos que es un marcador indirecto del aumento de la excitabilidad neuronal. Estos resultados indican que el aumento del nivel de piridos-

tigmina en el SNC no se debía a estrés, sino al aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica por la hipertensión arterial inducida por el protocolo de natación. En cualquier caso, de ambas posturas se podría concluir que los efectos de la piridostigmina a nivel central se encuentran aumentados en una situación de ejercicio intenso. Otras experiencias con otros protocolos para provocar estrés no aumentan la actividad anticolinesterásica de la piridostigmina en el SNC (Lallement y cols 1998, Sinton y cols, Grauer y cols. 2000, Tian y cols 2002)

Loewenstein y cols. (1995) comunicaron el caso de un soldado con antecedentes de apnea por la succinolcolina administrada para anestesiarlo, que tuvo síntomas colinérgicos despues de tomar la piridostigmina porque su colinesterasa era una variente genética para la que los carbamatos, entre ellos la piridostigmina, tienen baja afinidad. No debe administrarse piridostigmona a las personas con las variantes de la colinesterasa que hemos mencionado antes, teniendo en cuenta que son muy susceptibles a los OF. Los efectos adversos de la piridostigmina, se minimizan con la administración simultanea de la colinolítica escopolamina.

Estudios in vivo en animales demostraron que la coadministración de la piridostigmina con el repelente, DEET, aumentaba la inhibición de la AChE en el sistema nervioso central. Se achacaron algunas patologías sufridas por personal militar de la Guerra del Golfo a la potenciación que el bromuro de piridostigmina al competir con las esterasas hepáticas y plasmáticas que metabolizaran al repelente de insectos DEET (N, N- dietil-mtoluamida) o con el insecticida permetrina (-cis, trans-3- (2, 2- diclorovinil)-2, 2-dimetilciclopropano-1-carboxilato de 3-fenoxibencilo), empleado sobre los uniformes que pudieron haber sido atravesados y llegar a la piel a la atraviesa y que pudiera haber potenciado los efectos tóxicos de alguna de estas sustancias.(Snodgrass 1992, Wester y cols 2000). El DEET puede causar temblores musculares, agitación, dificultad para hablar, crisis convulsivas, alteración de la función cognitiva y coma (Taplin y cols. 1987) La permetrina abre sostenidamente a los canales de sodio (Anadón y cols. 1991, Vijverberg y cols. 2000) causando temblores, hiperactividad, ataxia, convulsiones y, en algunos casos, parálisis. Abou-Donia y cols. (1996) observaron que la asociación de piridostigmina, por vía oral, y DEET y permetrina, por vía subcutánea, en gallinas producía un efecto sinérgico potenciado con respecto ala neurotoxicidad, puesto que las lesiones eran

similares a las que producen dosis elevadas de DEET o permetrina. Así, en los estu- dios histopatológicos se observaba una elevada frecuencia de axones alargados y varicosidades axonales en el sistema nervioso periférico, semejantes a las que causan dosis letales de permetrina, y degeneración axonal en médula espinal, similar a la producida por dosis letales de DEET. Hoy y cols. (2000) describieron alteraciones en el comportamiento locomotor de ratas tras la administración conjunta de estas tres sustancias. Utilizaron medidas del comportamiento locomotor ya que suelen ser más sensible a dosis bajas de las tres sustancias químicas, y así reflejarían mejor la situación real ala que pudo estar expuestas las tropas de la Guerra del Golfo. Los resultados, si bien indicaban una alteración del comportamiento locomotor, eran complejos y variaban según el sexo del animal, y en función de si se administraba una dosis única o si ésta se repetía durante 7 días. McCain y cols. (1997). Hoy y cols. (2000) vieron que la administración de pienso con bromuro de piridostigmina, permetrina y DEET aumentaba la letalidad de las ratas respecto al empleo de un solo tóxico. La combinación de piridostigmina-permetrina o piridostigmina-DEET también potenciaban la letalidad. Sugieren que se produciria aumenta de la bio- disponibilidad de la piridostigmina oral o una disminución de su metabolización. En esas experiencias se emplearon dosis muy superiores a las que pudieron verse sometidas las tropas desplegadas en la Guerra del Golfo. Buchholz y cols. 1997, piensan que el efecto no se debe a aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica sinio a que la piridostigmina cambia la distribución de la permetrina que disminuye un 30% en el sistema nervioso central, mientras que para Chaney y cols. 2000 la piridostigmina y el DEET en ratas aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica facilitando el paso de piridostigmina por lo que sin modificarse la colinesterasa periférica disminuye la del cerebro. Para Chaney y cols. DEET, se metaboliza basicamente por oxidación hepática por el sistema citocromo P-450 y no por esterasas Abou-Donia y cols. 2001en ratas expuestas a dosis bajas de DEET y permetrina durante 30 días. añadiendo durante 15 diás 1,3 mg/kg de bromuro de piridostigmina oral, alteración del comportamiento sensorial y motor sin observae efecto sinérgico en ningún tipo de asociación. El DEET y la permetrina por sí solas no inhibían la AChE plasmática o en el sistema nervioso central, pero la administración delas tres sustancias, o la del DEET con la piridostigmina, aumentaba la inhibición de la AChE en el tronco encefálico y mesencéfalo.

La piridostigmina no causa ninguna reacción adversa en cobayas vacunadas contra el tétanos, fiebre tifoidea, cólera, meningitis meningocócica, hepatitis B, peste, carbunco, tos ferina, fiebre amarilla y poliomielitis (Griffiths y cols. 2001), empleadas por las Fuerzas Armadas del Reino Unido durante la Guerra del Golfo.

Kassa y cols. (1998) vieron que la asociación del bromuro de piridostigmina con el trihexifenidilo (PANPAL), antimuscarínico de actividad central, facilitaba la recuperación de las alteraciones respiratorias y cardiovasculares en ratas a las que se les había administrado 120 (g/kg i.m. de somán, el doble de su DL_{50}.

Hacia 1985 en el RU y en 1989 en USA y luego en la NATO tomaron en consideración el empleo de carbamatos distintos de la piridostigmina, del tipo del sevín, cuyo uso básico es como insecticida, la fisiostigmina y sobre todo la piridostigminam (además de los sulfonatos y fosfinatos. Los carbamatos se unen a los sitios esterásicos y a los anionicos de la colinesterasa. Pero se separan inmediatamente dejando a la colinesterasa carbamoilada en el sitio esterático al cual no se puede unir otro inhibidor como los OF, por lo que se pueden emplear como pretratamiento ante un ataque con OF, protegiendo a los posibles afectados durante 6 a 8 horas. (Koster 1946). Como los demás carbamatos y los OF, inhibe a la colinesterasa. Se emplea oral, via por la que se absorbe mal,por lo que se debe emplear una hora antes de la que se prevee el ataque, tomando una tableta de 30 mg de bromuro de piridostigmina repetible a las 8 horas (su biodisponibilidad es para Aquilonius y cols. (1980) del 5 al 10%.

La metoclopramida (MCP) es un antagonista de los receptores de dopamina y agonista de los de la serotonina usado como antiémetico y droga proquinética gástrica. Es un inhibidor reversible de la colinesteras del SNC humano y de la de los hematíes, pudiendo proteger a esta de la inhibicion causada por los OF. Petroianu y cols (2003) confirman que proteje in vitro frente a los insecticidas organofosforados el paraoxon que no es neuropático, causante de muchos accidentes y sucidios y el mipafox neuropatico.

La pralidoxima, usada para terapia, es un posible medicamento útil para el pretratamiento para personas laboralmente expuestas a OF. El ejército ingles tuvo un tiempo en su dotación como pretratamiento en tabletas de 1 g de pralidoxima que se interrumpió porque se absorbe mal e

iregularmente, necesitándose 5 g para que la concentración plasmática sea de 4 μg/mL, que hay que repetir cada 4-5 horas y por su sabor amargo

Otro pretramiento podría hacerse con captadopres o con neutralizantes de los agentes nerviosos en la sangre

La huperzina A, alcaloide de la planta Huperzis serrata es un buen candidato para hacer el pretratamiento (Patocka y cols. 1999, Tonduli y cols. 2001), de gran y buenas propiedades farmacocinéticas; una dosis única de 0,99 mg por vía oral se absorbe rapidamente y se elimina a una moderada velocidad. Atraviesa bien la barrera HE, sin causar efectos adversos del SNC; tiene una mayor afinidad para la colinesterasa, especialmente para la de los hematíes, selectividad que no tienen la piridostigmina ni los carbamatos, inhibiéndola reversiblemente liberando a la enzima más lentamente; su semivida es mayor que la de los carbamatos (Ashaniy cols. (1992, Grunwald y cols. (1994). Hay poca experiencia en su utilización en el hombre; Lallement y cols (2001). La huperzina A mejora la función cognitiva, la memoria y el comportamiento del 58% de 103 pacientes que padecían Alzheimer (Qian y cols 1995). Otras posibilidades de hacer pretratamiento sería el empleo de anticuerpos o de hapenos que tendrían que ser específicos de cada OF (Lenz y cols 1984, 1992) que podrian proteger unos seis meses. Brimfield y cols. (1993) han preparado anticuerpos que al unirse a los OF los hidrolizan quedando libres para seguir hidrolizando otras móleculas, sin originar reacciones adversas.

Los pretratamientos no eliminan la necesidad de inyectar atropina en caso de agresión, para neutralizar el exceso de acetilcolina y con menos urgencia una oxima para reactivar la colinesterasa liberada que se haya podido unir con el OF.especialmente con el somán.

Protección. Personal descontaminación

Una medida esencial es alejar a los afectados del area contaminada poniendole máscara si no la tenía puesta. La descontaminación debe ser lo mas inmediata que se pueda, incluso en el frente. Si se hace en interiores, los locales, deben estar calientes y ventilados para mantener la homeostasis térmica y para favorecer la evaporación del OF depositado en

la piel, incluso los persistentes como el VX (o la iperuita). La ropa contaminada con aerosoles o líquidos debe quitarse enseguida sin pasarla por la cabeza, cortandola si es necesario. Se puede guardar en bolsas de plástico selladas que solo serán recogidas por personal protegido y capacitado pues pueden liberar los agresivos durante una media hora.

La descontaminación suprime la absorción del OF procedente de la piel y la contaminación de las personas cercanas y debe hacerse lo más inmediatamente posible, teniendo en cuenta que solo la efectuada a los pocos minutos de haber sufrido la agresión, reduce la gravedad de la intoxicción. Lógicamente no es necesario descontaminar la piel cuando la exposición solar tuvo lugar con vapores. El pelo debe cortarse

La piel se debe lavar profusamente insistiendo en axilas, ingles y pelo y repitiendolo ya que Craig y cols (1977) observaron que la descontaminación de la mejlla o el antebrazo a las tres horas de haber depositado VX, entre 0 a 100°C, seguía disminuyendo la colinesterasa de los hematíes. Además del arrastre físico por agua esta y otras substancias hidrolizan y rompen los enlaces del átomo de fósforo, pero tardan horas en completar la hidrólisis. La piel se puede descontaminar con el equipo M291 (decontamination kit) basándose en carbón y resinas.

El M258A1 (self-decontamination kit) contienen una toallita humedecida para descontaminar agentes G y otra para hacerlo con los VX (e iperita) para usar ambas si se ignora el agresivo. Mas sencillamente la descontaminación puede hacerse con agua jabonosa o con hipoclorito diluido, (o lejía doméstica que contiene sosa y 5% de hipoclorito sódico) que se diluye al 1/10 para evitar lesionar la piel que transforma a los OF tóxicos en ácido fosfórico atóxico. Se puede usar papeles suaves como servilletas de cocina o el llamado higiénico

Deben quítarse y descontaminarse separadamente las lentes de contacto, antes de volver a ponerselas. Las gafas deben descontaminarse con agua y jabón.

Los OF se hidrolizan lentamente, pero la velocidad de hidrolisis aumenta añadiendo álcalis, como el cloruro cálcico, agua caliente jabonosa y sobre todo el hipoclorito cálcico al 0,05% al agua o bien agua con 10% de lejía, excepto para el tabún. El personal se debe proteger de la ropa y del vómito con guantes de goma, no de vinilo ni de látex.

Los lavados deben ser profusos y repetidos. El personal que descontamina a los afectados debe estar protegido. En los casos raros en los solo se produjo exposición pulmonar no es necesario descontaminar la piel. Los ojos deben lavarse con agua tibia durante 15-20 minutis. Si hubo entrada digestiva

Se debe hacer lavado gástrico y administrara carbón activado.

Descontaminación ambiental

No suponen problema ambiental la contaminación del suelo con los OF agrícolas ni con los usados como agresivos. El suelo contiene diversas bacterias que sintetizan enzimas que dehradan a los OF como la la Pseudomonas diminuta MG que produce la enzima OPH y el Agrobacterium radiobacter P230 que produce la enzima OPDA que degrada a muchos organofosfato. Aunque ambas enzimas tienen una estructura

Similar, tienen diferentes substratos. Yang y cols. (2003) identifican en la OPDA regiones que le confieren especifidad para los OF que tienen cortas cadenas alquílicas. Se está estudiando el uso de estas enzimas para la destrucción de los OF como agresivo militar.

BIBLIOGRAFÍA

(1) AARON, C. K. (2001) *Organophosphates and carbamates- En: Ford MD, Delaney KA, Ling U, Erickson T. Clinical tóxicology. Filadelfia: WB Saunders Company* 819-828.

(2) ABOU-DONIA, M. B.; GOLDSTEIN, L. B.; JONES, K. H.; ABDEL-RAHMAN, A. A.; DAMODARAN, T. V.; DECHKOVSKAIA, A. M. Y COLS. (2001) *Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. Toxicol Sci* 60: 305-14

(3) ABOU-DONIA, M. B.; WILMARTH, K. R.; JENSEN, K. F.; OEHME, F. W.; KURT, T. L. (1996) *Neuro- tóxicity resulting from coexposure to piridostigmina bromide, deet and permethrin: implications of Gulf War chemical exposures- J Tóxicol Environ Health 48*: 35-56.

(4) ADLER, M.; FILBERT, M. G.; (1990) *Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function. FEBS Lett*. 267:107-110.

(5) ALMOG, S; WINKLER, E.; AMITAI, Y.; DANI, S.; SHEFI, M.; TIROSH, M.; SHEMER, J. I.; (1991*) Acute piridostigmina overdose: a report of nine cases. J Med Sci* 27: 659-663.

(6) AMATO, A. A.; JACKSON C, MCVEY A.; (1997) *Identification of Gulf War syndrome: methodological issues and medical illnesses [Letter]. JAMA 278*: 384-5.

(7) ALBUQUERQUE, A.; ALAIKE, A. P. S.; RICKETT, D. L.; (1984) *The interaction of anticholinesterase agents with acetylcholine receptor-ionic channel complex. Fundam Appl Tóxicols*. 4:527-533.

(8) ANDERSON, D. R.; HARRIS, L. W.; WOODARD, C. L.; LENNOX, W. J.;(1992) *The effect of piridostigmina pretreatment on oxime efficacy against intoxiction by somán or VX in rats. Drug Chem Tóxicols.* 15:285-294.

(9) ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M. R.; DÍAZ, M. J.; BRINGAS, P.; (1991) *Toxicokinetics of permethrin in the rat. Toxicol Appl Pharmacol 119*: 1-8.

(10) ANICHKOOV, S. V.; GREBENKINAM M. A.; (1946) *Pharmacological chraracteritic of cholinoreceptor of central nervous system. Bull Exp Biol Med*- 22:28-29.

(11) ANNAS, G. J.; (1992) *Changing the consent rules for Desert Storm. N Engl J Med*. 326:770-773.

(12) ANNAS, G. J.,(1992) Medicine and war. N Engl J Med. 326:1098.

(13) ANNAS, G. J.; GRODIN, M. A.;(1991) Commentary. Hastings Center Report. 1991

(14) ANÓNIMO. (1995) *Persian Gulf Veterans Coordinating Board. Unexplained illnesses among Desert Storm veterans. a search for causes, treatment and cooperation Arch Intern Med* 155: 262-268.

(15) ANÓNIMO. (1986) United Nations Security Council, Report of Specialists Appointed by the Secretary General to Investigate Allegations by the Islamic Republic of Iran Concerning the Use of Chemical Weapons. New York, NY: Report S/16433.United Nations.

(16) ANÓNIMO. (1988) Program Executive Officer-Program Manager of Chemical Demilitarization. Chemical Stockpile Disposal Program Final Programmatic Environmental Impact Statement. Aberdeen Proving Ground, Md: Program Executive Officer-Program Manager of Chemical Demilitarization B-23-B-25.

(17) AQUILONIUS, S. M.; HARTVIG, P.; (1986) *Clinical pharmacokinetics of cholinesterase inhibitors. Clin Pharmacokinet.* 11:236-249.

(18) AQUILONIUS, S. M.; ECKERNAS, S. A.; HARTVIG, P.; LINDSTROM, B.; OSTERMAN, P. O.; (1980) *Pharmacokinetics and oral bioavailabliity of piridostigmina in man. Eur J Clin Pharmacols.* 18:423-428.

(19) ARIENS, A. T.; MEETER, E.; WOLTHUIS, O. L.; VAN BENTHEM, R. M. J.; (1969) *Reversible necrosis at the end-plate region in striated muscles of the rat poisoned with cholinesterase inhibitors. Experientia*. 25:57-59.

(20) ASAN, Y.; PEGGINS, J. O., DOCTOR, B. P.; (1992) *Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A. Biochem Biophys Res Commun* 184: 719-26.

(21) AUGUSTINSSON, K.; (1955) *The normal variation of human blood cholinesterase activity. Acta Physiol Scand*. 35:40-52.

(22) AXELSEN, P. H.; HAREL, M.; SILMAN, L.; SUSSMAN, J. L.;(1994) *Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: synergistic use of molecular dynamics simu- lation and X-ray crystallography. Protein Sci 3*: 188-97.

(23) AYGUN, D.; ONAR, M. K., ALTINTOP, B. L.; (2003) *The clinical and electrophysiological features of a delayed polyneuropathy developing subsequently after acute organophosphate poisoning and it's correlation with the serum acetylcholinesterase. Electromyogr Clin Neurophysiol*. 43:421-7.

(24) BAJGAR, J.; FUSEK, J.; SKOPEC, F.; (1995) *Intoxication wíth nerve agent GV (2-dimethylamino-ethyl-/dímethylamidol-phosphonofluoridate) and its treatment. En. Proceedings of the fifth internatíonal symposium on protectíon agaínst chemical and biological warfare agents; Natíonal Defence Research Instítute*; 277-84.

(25) BARAK, D.; ORDENTLICH, A.; KAPLAN, D.; BARAK, R., MIZRAHI, D.; KRONMAN, C. Y COLS. (2000) *Evidence for P-N bond scission in phosphoroamidate nerve agent adducts of human acetyl- cholinesterase. Biochemistry* 39: 1156-61.

(26) BENSCHOP, H. P.; DE JONG, L. P.; (1991) *Toxicokinetics of soman: species variation and ste- reospecificity in elimination pathways. Neurosci Biobehav Rev* 15: 73-7.

(27) BENSCHOP, H. P.; NOORT, D.; BLACK, R. M.; (1999) Methods for retrospective detection of exposure to toxic scheduled chemicals. an overview. Meeting of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons group of experts on biomedical sampling and analysis. La Haya, Holanda.

(28) BENSON, B.; (1992) Is the intermediate syndrome in organophosphate poisoning the result of insufficient oxime therapy? Clin Tóxicols.30: 347-349.

(29) BEREZUK, G. P.; MCCARTY, G. E.; (1992) *Investigational drugs and vaccines fielded in support of Operation Desert Storm.Milit Med*. 157:404-406.

(30) BERNHARD, S. A.; ORGEL, I. E.; (1959) *Mechanism of enzyme inhibition by phosphate esters. Science* 130:625-6.

(31) BERRY, W. K.; DAVIES, D. R.; (1966) *Factors influencing the rate of «aging» of a series of alkyl methylphosphonyl-acetylcholinesterases. Biochem J 100*. 572-6.

(32) BIDSTRUP, P. L.; (1961) Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. Lancet. 2:103.

(33) BIGBEE, J. W., SHARMA, K.V.; GUPTA, J. J.; DUPREE, J. L. (1999) Morphogenic Role for Acetylcholinesterase in Axonal Outgrowth during Neural Development. Environ Health Perspect, 107(51).

(34) BISKIND, M. S.; (1972) Psychiatric manifestations from insecticide exposure. JAMA. 220:1248.

(35) BISMUTH, C.; BORRON, S. W.; (1996) *Syndrome de la guerra du Golfe. Revendication ou réalité médicale? Rean Soins Intens Med Urg 5*: 238-242.

(36) BISMUTH, C.; GUEYE, P. N.; (1998) Syndrome de la guerre du Golfe. Encycl Méd Chi' (Elsevier, Parls), Tóxicologie-Pathologie professionnelle, 16-650-A-20.

(37) BLENNOW, G.; BRIERLEY, J. B.; MELDRUM, B. S.; SIESJO, B. K.; (1978) *Epileptic brain damage: The role of systemic factors that modify cerebral energy metabolism. Brain*. 101:687-700.

(38) BOOTH, L. H.; HEPPELTHWAITE, V.; MCGLINCHY, A.; (2000) The effect of environmental parameters on growth, Cholinesterase activity and glutathione 5-transferase activity in the earthworm (Apporectodea caliginosa). Biomarkers, 2000; 5(1).

(39) BOSKOVIC, B.; KUSIC, R.; (1980) *Long-term effects of acute exposure to nerve gases upon human health. In: Chemical Weapons: Destruction and Conversion. New York, NY: Crane, Russak Co* 113-116.

(40) BOTHWELL, M.; GINIGER, E.; (2000) Alzheimers Disease: Neurodevelopment Converges with Neurodegeneration. Cell 102: 271.

(41) BOWERS, M. B., GOODMAN, E.; SIM, V. M.; (1964) *Some behavioral changes in man following anticholinesterase administration. J Nerv Ment Dis*. 138:383-389.

(42) BOWMAN, P. D.; SCHUSCHEREBA, S. T., JOHNSON, T. W.; WOO, F. J.; MCKINNEY, L.; WHEELER, C. R. Y COLS. (1989) *Myopathic changes in diaphragm of rats fed pyridostigmine bromide sub- chronically. Fundam Appl Toxicol 13*: 110-7.

(43) BREWER, S. K.; ATCHISON, G. J.; (1999) The effects of chlorpyrifos on Cholinesterase activity and foraging behavior in the dragonfly, Anaxjunius (Odonata). Hydrobiologia 394(1).

(44) BRIGGS, G. C.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J.; (1990) *Drugs in Pregnancy and Lactation. Baltimore, Md: Williams Wilkins*.543-544.

(45) BRIGGS, C. J.; SIMONS, K. J.; (1986) *Treatment of organophosphorus poisoning: pharmaceu- tical aspects of antidotes. En: Heyndrickx B, editor. Proceedings of the second world congress on new compounds in biological and chemical warfare; 1986 agosto 24-27; Gante, Bélgica. Gante (Bélgica): University Press*; 514-23.

(46) BRIMFIELD, A. A.; LENZ, D. E.; MAXWELL, D. M.; BROOMFIELD, C. A.; (1993) Catalytic antibodies ydrolysing organophosphorus esters. Chem Biol Interact.87: 95-102.

(47) BRIMIJOIN, S., KOENIGSBERGER, C.; (1999) Cholinesterases in Neural Development: New Findings and Tóxicologic Implications. Environ Health Perspect, 107: 51.

(48) BRODY, B. B.; GAMMILL, J. F.; (1954) Seventy-Five Cases of Accidental Nerve Gas Poisoning at Dugway Proving Ground. Dugway Proving Ground, Utah: Medical Investigational Branch. Medical Investigational Branch Special Report 5.

(49) BROOMFIELD, C. A. (1992) *A purified recombinant organophosphorus acid anhydrase protects mice against somán. Pharmacol Tóxicols*. 70:65-66.

(50) BROOMFIELD, C. A.; MAXWELL, D. M.; SOLANA, R. P.; CASTRO, C. A.; FINGER, A. V.; LENZ, D. E.; (1991) *Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. J Pharmacol Exp Ther*. 259:633-638.

(51) BROWN, E. C. JR.; (1948) Effects of G Agents on Man: Clinical Observations. Edgewood Arsenal, Md: Medical Laboratory.

(52) BUCCI, T. J.; PARKER, R. M.; CROWELL, J. A.; THURMAN, J. D.; GOSNELL, P. A.; (1992) Tóxicity Studies on Agent GA (Phase II): 90 Day Subchronic Study of GA (Tabún) in CD Rats. Jefferson, Ark: National Center for Tóxicological Research.

(53) BUCCI, T. J., PARKER, R. M.; GOSNELL, P. A.; (1992) Tóxicity Studies on Agents GB and GD (Phase II): 90-Day Subchronic Study of GD (Somán) in CD-Rats. Jefferson, Ark: National Center for Tóxicological Research.

(54) BUCCI, T. J.; PARKER, R. M.; COSNELL, P. A.; (1992) Tóxicity Studies on Agents GB and GD (Phase II): Delayed Neuropathy Study of Sarín, Type I, in SPF White Leghorn Chickens. Jefferson, Ark: National Center for Tóxicological Research.

(55) BUCCI, T. J.; PARKER, R. M.; GOSNELL, P. A.; (1992) Delayed Neuropathy Study of Sarín, Type II, in SPF White Leghorn Chickens.Jefferson, Ark: National Center for Tóxicological Research.

(56) BUCCI, T. J.; PARKER, R. M.; GOSNELL, P. A.; (1992) Tóxicity Studies on Agents GB and GD. Jefferson, Ark: National Center for Toxiological Research.

(57) BUCHHOLZ, B. A.; PAWLEY, N. H.; VOGEL, J. S.; MAUTHE, R. J.; (1997) *Pyrethroid decrease in central nervous system from nerve agent pretreatment. J Appl Toxicol* 17: 231-4.

(58) BURCHFIEL, J. L.; DUFFY, F. H.; (1982) *Organophosphate neurotóxicity: Chronic effects of sarín on the electroencephalogram of monkey and man. Neurobehav Tóxicol Teratol.* 4:767-778.

(59) BURCHFIEL, J. L.; DUFFY, F. H.; SIM, V.; (1976) *Persistent effect of sarín and dieldrin upon the primate electroencephalogram. Tóxicol Appl Pharmacols*. 35:365-379.

(60) CALESNICK, B.; CHRISTENSEN, J. A.; RICHTER, M.; (1967) *Human tóxicity of various oximes. Arch Environ Health.* 15:599-608.

(61) CALLAWAY, S.; DAVIES, D. R.; RUTLAND, J. P.;(1951) *Blood cholinesterase levels and range of personal variation in a healthy adult population. Br Med J.*: 812-816.

(62) CAPACIO, B. R.; KOPLOVITZ, I.; ROCKWOOD, G. A.; (1995) Drug Interaction Studies of Piridostigmina With the 5HT3 Receptor Antagonists Ondansetron and Granisetron in Guinea Pigs. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense.

(63) CARLOCK, L. L.; CHEN, W. L.; GORDON, E. B. Y COLS. (1999) *Regulating and assessing risks of Colinesterase- inhibiting pesticides: divergent approaches and interpretations. J Toxicol Environ Health Crit Rev. 15*: 28.

(64) CHANEY, L. A.; ROCKHOLD, R. W.; MOZINGO, J. R.; HUME, A. S.; MOSS, J. I.; (1997) *Potentiation of pyridostigmine bromide toxicity in mice by selected adrenergic agents and caffeine. Vet Human Toxicol* 39: 214-9.

(65) CHANEY, L. A.; WINEMAN, R. W.; ROCKHOLD, R. W.; HUME, A. S., (2000) *Acute effects of an insect repellent, N, N-diethyl-m-toluamide, on cholinesterase inhibition induced by pyri- dostigmine bromide in rats. Toxicol Appl Pharmacol* 165: 107-14.

(66) COOKSON, W. O. C. M.; (1999) Disease taxonomy -polygenic. Br Med Bull. 55:358-365.

(67) CHEN, J.; KUMAR, M.; CHAN, W.; BERKOWITZ, G.; (2003) *Wetmur JG.Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. Environ Health Perspect.* 111:1403-9.

(68) CHEW, L. S.; CHEE, K. T.; YEO, J. M.; JAYARATNAM, F. J.;(1971) *Continuous atropine infusion in the management of organophos-phorus insecticide poisoning. Singapore Med J.* 2:80-85.

(69) CLEMENTS, J. A.; MOORE, J. C.; JOHNSON, R. P.; LYNOTT, J.; (1952) Observations on Airway Resistance in Men Given Low Doses of GB by Chamber Exposure. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory. Medical Laboratory Research Report 122.

(70) COUSIN, X., HOTELIER, T.; GILES, K.; LIEVIN, P.; TOUTANT, J. P.; CHATONNET, A.; (1997) *The (/(_fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. Oxford University Press* 25:143-146.

(71) CRAIG, F. N.; CUMMINGS, E. G.; SIM, V. M.; (1977) *Environmental temperature and the percutaneous absorption of a cholinesterase inhibitor, VX. J Invest Dermatol.* 68:357-361.

(72) CRAIG, A. B. JR.; FREEMAN, G.; (1953) Clinical Observations on Workers Accidentally Exposed to «G» Agents. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory. Medical Laboratory Research Report 154.

(73) CRAIG, A. B.; WOODSON, G. S.; (1959) *Observations on the effects of exposure to nerve gas, I: Clinical observations and cholinesterase depression. Am J Med Sci*. 238:13-17.

(74) CRAIG, A. B. JR.; CORNBLATH, M.; (1953) Further Clinical Observations in Workers Accidentally Exposed to G Agents. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory. Medical Laboratory Research Report 234.

(75) DAVIES, D. R., GREEN, A. L.; WILLEY, G. L.; (1959) *2-Hydroxyiminomethyl-N-methylpyridinium methanesulphonate and atropine in the treatment of severe organophosphate poisoning. Br J Pharmacols. 14:5-8.*

(76) DAVIES, D. R.; HOLLAND, P.; (1972) *Effect of oximes and atropine upon the development of delayed neurotóxic signs in chickens following poisoning by DFP and sarín. Biochem Pharmacols.* 21:3145-3151.

(77) DAVIES, D. R.; HOLLAND, P.; RUMENS, M. J.; (1960) *The relationship between the chemical structure and neurotóxicity of alkyl organophosphorus compounds. Brit J Pharmacols.* 115:271-278.

(78) DAVIES, P.; (1999) Challenging the Cholinergic Hypotesis in Alzheimer Disease. JAMA 2(3).

(79) DAVIS, K.; MOHS, R. C.; MARIN, D.; PUROHIT, D. P.; PERL, D.; LANTZ, M.; AUSTIN, G.; HAROUTUNIAN, V.; (1999) Cholinergic Markers in Elderly Patients with early signs of Alzheimer Disease. JAMA, 2 (3).

(80) DAVIS, W.; (1985) *The Serpent and the Rainbow. New York: Warner Books Inc*. 36-37.

(81) DE BLEECKER, J.; (1995) *The intermediate syndrome in organophosphate poiso ning: an overview of experimental and clinical observations. J Tóxico, Clin TóxicoI.*33: 683-686.

(82) DEBLEECKER, J.; NEUCKER, K. V. D.; WILLEMS, J.; (1992) *The intermediate syndrome in organophosphate poisoning: Presentation of a case and review of the literature. Clin Tóxicols.*30:321-329.

(83) DEBLEECKER, J.; WILLEMS, J.; NEUCKER, K. V. D.; DEREUCK, J.; VOGELAERS, D.; (1992) *Prolonged tóxicity with intermediate syndrome after combined parathion and methyl parathion poisoning. Clin Tóxicols*. 1992; 30: 333-345.

(84) DEBLEECKER, J.; VAN DEN NEUCKER, K.; COLARDYN, F.; (1993) *Intermediate syndrome in organophosphorus poisoning: a prospective study. Crit Care Med* 21.1706-11.

(85) DENNIS, G. A.; LEE, P. N.; (1999) A Phase I Volunteer 5tudy to Establish the Degree of Absorption and Effect on Cholinesterase Activity of Four Head Lice Preparations Containing Malathion. Clin Drug, 1999; 18(2)

(86) DECANDOLE, C. A.; DOUGLAS, W. W.; LOVATT-EVANS, C.; (1953) *The failure of respiration in death by anticholinesterase poisoning. Br J Pharmacol Chemother*. 8:466-475.

(87) DEREUCK, J.; WILLEMS, J.; (1975) *Acute parathion poisoning: Myopathic changes in the diaphragm. J Neurol*. 208:309-314.

(88) DETTBARN, W.;(1984) *Pesticide induced muscle necrosis: Mechanisms and prevention. Fundam Appl Tóxicols.* 4:S18-S26.

(89) DILLE, J. R.; SMITH, P. W.; (1964) *Central nervous system effects of chronic exposure to organophosphate insecticides. Aero-space Med*.35: 475-478.

(90) DOCTOR, B. P.; BLICK, D. W.; CARANTO, G.; (1993) *Cholinesterases as scavengers for organophosphorus compounds: Protection of primate performance against somán tóxicity. Chem Biol Interact*. 87:285-293.

(91) DUFFY, F. H.; BURCHFIEL, J. L., (1980) *Long term effects of the organophosphate sarín on EEGs in monkeys and humans. Neurotóxicols*. 1:667-689.

(92) DUFFY, F. H.; BURCHFIEL, J. L.; BARTELS, P. H.; GAON, M.; SIM, V. M.; (1979) *Long-term effects of an organophosphate upon the human electroencephalogram. Tóxicol Appl Pharmacols*. 47:161-176.

(93) DUNANT, Y.; ISRAEL, M.; (1985) La liberación de acetilcolina. Inv y Ciencia 105:32.

(94) DUNN, M. A.; SIDELL, F. R.; (1989) *Progress in medical defense against nerve agents. JAMA* 262: 649-52.

(95) DURHAM, W. F.; HAYES, W. J. JR. (1962) *Organic phosphorus poisoning and its therapy. Arch Environ Health*. 5:21-47.

(96) DURHAM, W. F.; WOLFE, H. R.; QUINBY, G. E.; (1965) *Organophosphorus insecticides and mental alertness. Arch Environ Health.* 10:55-66.

(97) DESHPANDE, S. S.; VIANA, G. B.; KAUFFMAN, F. C.; RICKETT, D. L.; ALBUQUERQUE, E. X.; (1986) *Effectiveness of physostigmine as a pretreatment drug for protection of rats from organophosphate poisoning. Fundam Appl Toxicols.* 6: 566-77.

(98) EDSON, E. F.; (1964) *No-effect levels of three organophosphates in the rat, pig, and man. Food Cosmet Tóxicols*. 2:311-316.

(99) EI-FAWAL, H. A. N.; WATERMAN, S. J.; DE FEO, A.; SHAMY, M. Y.; (1999) *Neuroimmunotóxicology: Humoral Assessment of Neurotóxicity and Autoimmune Mechanisms. Environ Health Perspect* 107(55)

(100) ENGEL, C. C. JR.; JING, Z.; (1997) *Identification of Gulf War syndrome. methodological issues and medical illnesses [Letter]. JAMA* 278: 383-4.

(101) ENSERINK, M.; (2001) Gulf War illness: the battle continues. Science 291: 12.

(102) EVANS, E. S. JR.; OLDS, K. L.; WEYANDT, T. B.; (1993) *Pesticides. In: Deeter DP, Gaydos JC, eds. Occupational Health: The Soldier and the Industrial Base. In: Zajtchuk R, Bellamy RF, eds. Textbook of Military Medicine. Washington, DC: US De-parten of the Army, Office of The Surgeon General, and Borden Institute*. 532-536.

(103) FINDLAY, T.; (1991) Chemical Weapons and Missile Proliferation. Lynne Rienner Publisher, London.

(104) FIREMARK, H.; BARLOW, C. F.; ROTH, L. C.; (1964) *The penetration of 2-PAM-Cl 14 into brain and the effects of cholinesterase inhibitors on its transport. J Pharmacol Exp Ther.*145: 252-265.

(105) FONSEKA, M. M.; MEDAGODA, K.; TILLAKARATNA, Y.; GUNATILAKE, S. B.; DE SILVA, H. J.; (2003) *Self-limiting cerebellar ataxia following organophosphate poisoning. Hum Exp Toxicols*. 22:107-9.

(106) FULLERTON, C. S.; URSANO, R. J.; (1990) *Behavioral and psychological responses to chemical and biological warfare. Milit Med*. 155:54-59.

(107) FRASER, T. R.; (1963) *On the characters, actions, and therapeutic use of the ordeal bean of Calabar. Edinb Med J*. 9:124-132.

(108) FRASER, T. R.; (1970) *An experimental research on the antagonism between the actions of physostigma and atropia. Trans R Soc Edinb*. 26:259-713.

(109) FREEDMAN, A. M.; WILLIS, A.; HIMWICH, H. E.; (1948) *Correlation between signs of tóxicity and cholinesterase level of brain and blood during recovery from diisopropyl fluorophosphate (DFP) poisoning. Am J Physiol*. 157:80-87.

(110) FREDRIKSSON, T.; HANSSON, C.; HOLMSTEDT, B.; (1960) *Effects of sarín in the anaesthetized and unanaesthetized dog following inhalation, percutaneous absorption and intravenous infusion. Arch Int Pharmacodyn Ther*. 126:288-302.

(111) FREEMAN, G.; LUDEMANN, H.; CORNBLATH, M.; (1954) Cardiovascular and Respiratory Effects of Acute Parathion Poisoning in Dogs with Particular Regard to Ventricular Fibrillation. Army Chemical Center, Md: Medical Laboratories; Medical Laboratory Research Report 303.

(112) FRIEDMAN, A.; KAUFER, D.; SHEMER, J.; HENDLER, I.; SOREQ, H.; TUR-KASPA, I.; (1996) *Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early « immediate transcriptional response, Nat Med 2*: 1382-5.

(113) FROEDE, H. C.; WILSON, I. B.; (1984) *Direct determination of acetyl-enzyme intermediate in the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine. J Biol Chem* 259: 11010-3.

(114) FUNCKES, A. J.; (1960) *Treatment of severe parathion poisoning with 2-pyridine aldoxime methiodide (2-PAM). Arch Environ Health*.404-406.

(115) GADOTH, N.; FISHER, A.; (1978) *Late onset of neuromuscular block in organophosphorus poisoning. Ann Intern Med.* 88:654-655.

(116) GALEAZZI, F.; HAAPALA, E. M.; VAN ROOIJEN, N.; VALLANCE, B. A.; COLLINS, S. M.;(2000) *Inflammación-induced impairment of enteric nerve funtion in nematode-infected ratones is macrophage dependent. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:G 259-65.

(117) GALL, D.; (1981) *The use of therapeutic mixtures in the treatment of cholinesterase inhibition. Fundam Appl Tóxicols.1*: 214-216.

(118) GANENDRAN, A.; (1974) *Organophosphate insecticide poisoning and its management. Anaesth Intensive Care.* 2:361-368.

(119) GAON, M. D.; WERNE, J.; Report of a Study of Mild Exposures to GB at Rocky Mountain Arsenal. Rocky Mountain Arsenal, Colo: US Army Medical Department; n.d.

(120) GAUTHIER, S.; (1999) Background to cholinérgic enhancement in Alzheimer Disease. Arch Neurol.1; 55.

(121) GEORGE, K. M.; SCHULE, T.; SANDOVAL, L. E.; JENNINGS, L. L.; TAYLOR, P.; THOMPSON, C. M.; (2003) *Differentiation between acetylcholinesterase and the organophosphate-inhibited form using antibodies and the correlation of antibody recognition with reactivation mechanism and rate. J Biol Chem*. 14:45512-8.

(122) GERSHON, S.; SHAW, F. H.; (1961) Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. Lancet.1: 1371-1374.

(123) GIULIAN, D.; (1999) *Neurogenetics '99. Am J Hum Genet*; 65:13-18.

(124) GOLDMAN, M.; KLEIN, A. K.; KAWAKAMI, T. G.; ROSENBLATT, L. S.; (1987) Tóxicity Studies on Agents GB and GD. Davis, Calif: University of California Davis Laboratory for Energy.

(125) GILSON, M. K.; STRAATSMA, T. P.; MCCAMMON, J. A.; RIPOLL, D. R.; FAERMAN, C. H.; AXELSEN, P. H. Y COLS.; (1994) *Open «back door» in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. Science 263:* 1276-8.

(126) Glickson, M.; Achiron, A.; Ram, Z.; (1991) *The influence of piridostigmina administration on human neuromuscular functions. Studies in healthy human subjects. Fundam Appl Tóxicols. 16*:288-298.

(127) GOLDMAN, M.; KLEIN, A. K.; KAWAKAMI, T. G.; ROSENBLATT, L. S.; (1987) Tóxicity Studies on Agents GB and GD. Davis, Calif: Uni-versity of California Davis Laboratory for Energy.

(128) GOLDMAN, M.; NASR, M.; CONE, N.; ROSENBLATT, L. S.; WILSON, B. W.; (1989) Tóxicity Studies on Agent GA: Mutagenicity of Tabún (GA) in the Ames Mu-

tagenicity Assay. Davis, Calif: University of California Davis Laboratory for Energy.

(129) GOOD, J. L.; KHURANA, R. K.; MAYER, R. F.; CINTRA, W. M.; ALBUQUERQUE, E. X.; (1993) *Pathophysiological studies of neuromuscular function in subacute organophosphate poisoning induced by phosmet. J Neurol Neurosurg Psychiatry 56*: 290-4.

(130) GORDON, J. J.; INNS, R. H.; JOHNSON, M. K.; (1983) *The delayed neuropathic effects of nerve agents and some other organophosphorus compounds. Arch Tóxicols.* 52(3): 71-81.

(131) GOUGE, S. F.; DANIELS, D. J.; SMITH, C. E.; (1994) *Exacerbation of asthma after pyridostigmine during Operation Desert Storm, Mil Med 159*: 108-11.

(132) GRAHAM, C.; COOK, M. R.; (1984) Effects of Piridostigmina on Psychomotor and Visual Performance. Wright-Patterson Air Force Base, Ohio: Final report, contract F33615-80-C-0606, MRI.

(133) GRAUER, E.; ALKALAI, D.; KAPON, J.; COHEN, G.; RAVEH, L.; (2000) Stress does not enable pyridostigmine to inhibit brain cholinesterase after parenteral administration. Toxicol I Appl Pharmacol 164: 301.

(134) GRAY, G. C.; SMITH, T. C.; KNOKE, J. D.; HELLER, J. M.; (1999) *The postwar hospitalization experience of Gulf War veterans possibly exposed to chemical munitions destruc tion at Khamisiyah, Iraq. Am J Epidemiol 150*: 532-40.

(135) GRIFFIN, P.; MASON, H.; HEYWOOD, K,; (1999) Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study. Occup Environ Med, 56;(1).

(136) GROB, D.; (1956) *The manifestations and treatment of poisoning due to nerve gas and other organic phosphate anticholinesterase compounds. A.M.A. Arch Intern Med 98*: 221-39.

(137) GROB, D.; HARVEY, J. C.; (1958) *Effects in man ofthe anticholinesterase compound sarin (iso- propyl methyl phosphonofluoridate). J Clin Invest; 37*: 350-68.

(138) GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H.; (1999) *Structural roles of Acetylcholinesterase variants in biology and pathology. Eur J Biochem, 264*:672-686

(139) GRIFFITHS, G. D.; HORNBY, R. J.; STEVENS, D. J.; SCOTT, L. A. M.; (2001) *Upshall DG. Biological consequences of multiple vaccine and pyridostigmine pretreatment in the guinea pig. J. Appl Toxicol 21*: 59-68.

(140) GROB, D.; (1956) *The manifestations and treatment of poisoning due to nerve gas and other organic phosphate anticholinesterase compounds. Arch Intern Med. 9*8:221-239.

(141) GROB, D.; HARVEY, A. M.; LANGWORTHY, O. R.; LILLIENTHAL, J. L.; (1947) The administration of di-isopropyl fluorophosphate (DFP) to man. Bull Johns Hopkins Hosp. 31:257

(142) GROB, D.; HARVEY, A. M.; (1953) *The effects and treatment of nerve gas poisoning. Am J Med. 14*:52-63.

(143) GROB, D.; HARVEY, J. C.; (1958) *Effects in man of the anticholinesterase compound sarín (isopropyl methyl phosphonofluoridate). J Clin Invest. 37*:350-368.

(144) GROB, D.; LILIENTHAL, J. L. JR.; HARVEY, A. M.; JONES, B. F.; (1947) *The administration of di-isopropyl fluorophosphate (DFP) to man, I: Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase; general systemic effects; use in study of hepatic function and erythropoieses; and some properties of plasma cholinesterase. Bull Johns Hopkins Hosp. 81*:217-244.

(145) GRUNWALD, J.; RAVEH, L.; DOCTOR, B. P.; ASHANI, Y.; (1994) *Huperzine A as a pretreatment candidate drug against nerve agenttoxicity. Life Sci 54*.991-7.

(146) GÜVEN, M.; BAYRAM, F.; ÜNLÜHIZARCI, K.; (1999) Endocrine changes in patients with acute organophosphate poisoning. Hum Exp Tóxicol.; 18(10) H

(147) HADDAD, L. M.; (1992) *Organphosphate poisoning—intermediate syndrome? Clin Tóxicols*. 30:331-332.

(148) HALEY, R. W.; HOM, J.; ROLAND, P. S.; BRYAN, W. W.; VAN NESS, P. C.; BONTE, F. J. Y COLS. (1997) *Evaluation of neurologic function in Gulf War veterans: a blinded case-control study. JAMA 277*: 223-30.

(149) HALEY, R. W.; FLECKENSTEIN, J. L.; MARSHALL, W. W.; MCDONALD, G. G., KRAMER, G. L.; PETTY, F.; (2000) *Effect of basal ganglia injury on central dopamine activity in Gulf War syndrome. Arch Neurol 57*: 1280-5

(150) HALEY, R. W.; MARSHALL, W. W.; MCDONALD, G. G.; DAUGHERTY, M. A.; PETTY, F.; FLECKENSTEIN, J. L.; (2000) *Brain abnormalities in Gulf War syndrome: evaluation with 1 H MR spectroscopy. Radiology 215*: 807-17.

(151) HALEY, R. W.; KURT, T. L.; (1997) *Self-reported exposure to neurotóxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study. JAMA. 277: 231-237; 1997 Haley RW, Kurt TL, Hom J. Is there a Gulf War Syndrome? Searching for syndromes by factor analysis of symptoms- JAMA 277*: 215- 222.

(152) HAREL, M.; SCHALK, L.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C. Y COLS. (1993) *Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetyl-cholinesterase, Proc Natl Acad Sci USA 90*.9031-5.

(153) HARRIS, R.; PAXMAN, J.; (1982) *From disarmament to rearmament. En. Harris R, Paxman J, edítores. A hígher form of killing: the secret story of gas and germ warfare. London: Chatto Windus*: 216-38.

(154) HARRIS, R.; PAXMAN, J.; (1982) A Higher Form of Killing. New York, NY: Hill and Wang; 1982: 53.

(155) HARRIS, L. W.; TALBOT, B. G.; LENNOX, W. J.; ANDERSON, D. R.; SOLANA, R. P.; (1988) Physostigmine and Adjunct Pretreatment (Alone and Together With Therapy) Against Nerve Agent Intoxiction. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense; Technical Report 88-18.

(156) HARVEY, J. C.; (1952) Clinical Observations on Volunteers Exposed to Concentrations of GB. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory.

(157) HASSLER, C. R.; MOUTVIC, R. R.; HAMLIN, R. L.; (1987) *Studies of the action of chemical agents on the heart. In: Proceedings of the Sixth Medical Chemical Defense Bioscience Review. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute for Chemical Defense.* 551-554.

(158) HAYES, G. R.; FUNCKES, A. J.; HARTWELL, W. V.; (1964) *Dermal exposure of human volunteers to parathion. Arch Environ Health. 8*:829-833.

(159) HAYES, W. J.; (1982) Organic phosphorus pesticides. In: Hayes WJ, ed. Pesticides Studied in Man. Baltimore, Md: Williams and Wilkins 284-435.

(160) HAYWARD, I. J.; WALL, H. G.; JAAX, N. K.; WADE, J. V.; MARLOW, D. D.; NOLD, J. B.;(1988) Influence of Therapy with Anticonvulsant Com-pounds on the Effects of Acute Somán Intoxiction in Rhesus Monkeys. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense.

(161) HENDERSON, J. D.; HIGGINS, R. J.; ROSENBLATT, L.; WILSON, B. W.; (1989) Tóxicity Studies on Agent GA: Delayed Neurotóxicity—Acute and Repeated Exposures of GA (Tabún). Davis, Calif: University of California Davis Lab for Energy.

(162) HILL, D. L.; THOMAS, N. C.; (1969) Reactivation by 2-PAM Cl of Human Red Blood Cell Cholinesterase Poisoned in vitro by Cyclohexyl-methylphosphonofluoridate (GF). Edgewood Arsenal, Md: Medica Research Laboratory.

(163) HIMURO, K.; MURAYAMA, S.; NISHIYAMA, K.; SHINOE, T., IWASE, H.; NAGAO, M. Y COLS. (1998) Distal sensory axonopathy after sarin intoxication. Neurology 51: 1195-7.

(164) HOWE, E. G.; (1992) Medicine and war. N Engl J Med. 326:1098.

(165) HOWE, E. G.; MARTIN, E. D.; (1991) Treating the troops. Hastings Center Report.

(166) HOY, J. B.; CORNELL, J. A.; KARLIX, J. L.; SCHMIDT, C. J.; TEBBETT, I. R.; VAN HAAREN, F.; (2000) *Interactions of pyridostigmine bromide, DEET and permethrin alter locomotor behavior of rats. Vet Human Toxicol; 42.* 65-71.

(167) HOY, J. B.; CORNELL, J. A.; KARLIX, J. L., TEBBETT, I. R.; VAN HAAREN, F.; (2000) *Repeated coadministra- tions of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin alter locomotor behavior of rats. Vet Human Toxicol 42*: 72-6.

(168) HUDSON, C. S.; FOSTER, R. E.; KAHNG, M. W.; (1985) *Neuromuscular tóxicity of piridostigmina bromide in the diaphragm, extensor digitorum longus and soleus muscles of the rat. Fundam Appl Tóxicols*. S260-S269.

(169) HYAMS, K. C.; WIGNALL, F. S.; (1997) Identification of Gulf War syndrome: methodological issues and medical illnesses [Letter]. JAMA 278: 384.

(170) INNS, R. H.; LEADBEATER, L.; (1983) *The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphate poisoning in the guinea pig. J Pharm Pharmacols. 35*:427-433.

(171) INSTITUTE OF MEDICINE. (1995) Health Consequences of Service During the Persian Gulf War: Initial Findings and Recommen-dations for Immediate Action. Washington DC: National Academy Press.

(172) JACOBSON, K. H.; CHRISTENSEN, M. K.; DEARMON, I. A.; OBERST, F. W.; (1959) *Studies of chronic exposures of dogs to GB (isopropyl methylphosphono-fluoridate) vapor. Arch Indust Health. 19*:5-10.

(173) JACOBZINER, H.; RAYBIN, H. W.; (1961) *Parathion poisoning successfully treated with 2-PAM (pralidoxime chloride). N Engl J Med. 265*:436-437.

(174) JAGER, B. V.; STAGG, G. N.; GREEN. N.; JAGER, L.; (1958) *Studies on distribution and disappearance of pyridine-2-aldoxime methiodide (PAM) and of diacetyl monoxime (DAM) in man and in experimental anials. Bull Johns Hopkins Hosp. 102*:225-234.

(175) JAMAL, G. A.; (1996) *The Gulf War syndrome. Is there evidence of dysfunction in the nervous system? J Neurol Neurosurg Psy 60*: 449-451.

(176) JOHNS, R. J.;(1952) The Effects of Low Concentrations of GB on the Human Eye. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory; 1952. MRL Report 100.

(177) JOINER, R. L.; DILL, G. S.; HOBSON, D. W.; (1988) Task 87-35: Evaluating the efficacy of antídoto drug combinations against somán or tabún tóxicity in the rabbit. Columbus, Oh: Battelle Memorial Institute.

(178) JOHNS, R. J.; (1962) *Familial reduction in red cell cholinesterase. N Engl J Med. 267*:1344-1348.

(179) JONES, D. E.; CARTER, W. H. JR.; (1985) *Carchman RA. Assessing piridostigmina efficacy by response surface modeling. Fundam Appl Tóxicols. 5*:S242-S251.

(180) JOHNSON, R. P.; GOLD, A. J.; FREEMAN, G.;(1958) *Comparative lung-airway resistance and cardiovascular effects in dogs and monkeys following parathion and sarín intoxiction. Am J Physiol. 192:*581-584.

(181) JOSSELSON, J., SIDELL, F. R.; (1977) Dose-Response Effects of Intravenous Thiamine Hydrochloride on Pralidoxime Pharmacokinetics in Man. Edgewood Arsenal, Md: Biomedical Laboratory.

(182) JOSSELSON, J., SIDELL, F. R.; (1978) *Effect of intravenous thiamine on pralidoxime kinetics. Clin Pharmacol Ther. 24*:95-100.

(183) JOVANOVIC, D.; BOKONJIC, D.; JOKANOVIC, H.; MAKSINOVIC, H.; (1990) Prophylactic effects of oximes applied by osmotic minipumps in saron poisoned rats.

(184) JOYNER CHRISTOPHER, C.; (1990) The Persian Gulf War. Greenwood Press, New York.

(185) KAISER, K. S., HAWKSWORTH, A. W.; GRAY, G. C.; (2000) *Pyridostigmine bromide intake during the Persian GulfWar is not associated with postwar handgrip strength. Mil Med 165*. 165-8.

(186) KALOW, W.; GENEST, K.; (1957) *A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase: Determina-tion of dibucaine numbers. Can J Biochem Physiol. 35*:339-346.

(187) KAPLAN, D. E.; (2000) AUM SHINRIKYO (1995). *En: Tucker JB, editor. Toxic terror: assessing terrorist use of chemical and biological weapons. Cambridge (MA): Belfer Center for Science and International Affairs* 207-26.

(188) KOVACH, I. M.; (1988) *Structure and dynamics of serine hydrolase-organophosphate adducts. J Enzyme Inhib 2*:199-208.

(189) KARSENTY, E.; SHEMER, J.; ALSHECH, I. Y COLS. (1991) *Medical aspects of the Iraqi missile attacks on Israel. Isr J Med Sci.27*: 603-607.

(190) KASSA, J.; FUSEK, J.; (1998) *The positive influence of a cholinergic-anticholinergic pretreatment and antidotal treatment on rats poisoned with supralethal doses of soman. Toxicology 128*: 1-7.

(191) KAWABUCHI, M.; BOYNE, A. F.; DESHPANDE, S. S.; ALBUQUERQUE, E. X.; (1989) *The reversible carbamate (–) physostigmine reduced the size of synaptic end plate lesions induced by sarín, an irreversible organophosphate. Tóxicol Appl Pharmacols. 97*:98-106.

(192) KARADEMIR, M.; ERTURK, F.; KOCAK, R.; (1990) *Two cases of organophosphate poisoning with development of intermediate syndrome. Hum Exp Tóxicols.9*: 187-189.

(193) KARCZMAR, A. G.; (1984) *Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents. Fundam Appl Tóxicols. 4*:S1-S17.

(194) KAWAKAMI, T. G.; GOLDMAN, M.; ROSENBLATT, L.; WILSON, B. W.; (1989) Tóxicity Studies in Agent GA: Mutagenicity of Agent GA (Tabún) in the Mouse Lymphoma Assay. Davis, Calif: University of California Davis Laboratory for Energy.

(195) KEELER, J. R.; (1990) *Interactions between nerve agent pretreatment and drugs commonly used in combat anesthesia. Milit Med.* 155:527-533.

(196) KEELER, J. R.; HURST, C. G.; DUNN, M. A.; (1991) *Piridostigmina used as a nerve agent pretreatment under wartime conditions. JAMA. 266*:693-695.

(197) KENT, K. M.; EPSTEIN, S. E.; COOPER, T.; JACOBOWITZ, D. M.; (1974) *Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system. Circulation. 50*: 948-955.

(198) KEPNER, L. A.; WOLTHUIS, O. L.; (1978) *A Comparison of the Oximes HS-6 and HI-6 in the therapy of somán intoxiction in rodents. European J of Pharmacology. 48*: 377-382.

(199) KETCHUM, J. S.; SIDELL, F. R.; CROWELL, E. B. JR.; AGHAJANIAN, G. K.; HAYES, A. H. JR.; (1973) *Atropine, scopolamine, and Ditran: Com-parative pharmacology and antagonists in man. Psychopharmacology (Berlin). 28*:121-145.

(200) KEWITZ, H.; NACHMANSOHN, D.; (1957) *A specific antídoto against lethal alkylphosphate intoxiction, IV: Effects in brain. Arch Biochem Biophys. 66*:271-283; 1957

(201) KHAN, F.; KENNEDY, G.; SPENCE, V. A.; NEWTON, D. J.; BELCH, J. J.; (2003) Peripheral cholinergic function in humans with chronic fatigue syndrome, gulf war syndrome, and with illness following organophosphate exposure. Clin Sci (Lond).

(202) KLUWE, W. M.; CHINN, J. C.; FEDER, P.; OLSON, C.; JOINER, R.; (1987) Efficacy of piridostigmina pretreatment against acute somán intoxiction in a primate model. In: Proceedings of the Sixth Medical Chemical Defense Bioscience Review. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute for Chemical Defense 227-234. Report AD; B121516.

(203) KISS, Z.; FAZEKAS, T.; (1979) *Arrhythmias in organophosphate poisoning. Acta Cardiol. 5*:323-330.

(204) KOELLE, G. B.; (1946) *Protection of cholinesterase against irreversible inactivation by di-isopropyl fluorophosphate in vitro. J Pharmacol Exp Ther. 88*:232-237.

(205) KOLKA, M. A.; STEPHENSON, L. A.; (1990) *Human temperature regulation during exercise after oral piridostigmina adminis-tration. Aviat Space Environ Med. 61*:220-224.

(206) KOPLOVITZ, I.; GRESHAM, V. C.; DOCHTERMAN, L. W.; KAMINSKIS, A.; STEWART, J. R.; (1992) *Evaluation of the tóxicity, pathology, and treatment of cyclohexylmethlyphosphonofluoridate (CMPF) poisoning in rhesus monkeys. Arch Tóxicols. 66:*622-628.

(207) KOPLOVITZ, I.; HARRIS, L. W.; ANDERSON, D. R.; LENNOX, W. J.; STEWART, J. R.; (1992) *Reduction by piridostigmina pretreatment of the efficacy of atropine and 2-PAM treatment of sarín and VX poisoning in rodents. Fundam Appl Tóxicol* 18:102-106.

(208) KOPLOVITZ, I.; GRESHAM, V. C.; DOCHTERMAN, L. W.; KAMINSKIS, A.; STEWART, J. R.; (1992) *Evaluation of the tóxicity, pathology, and treatment of cyclohexylmethlyphosphonofluoridate (CMFF) poisoning in rhesus monkeys. Arch Tóxicols. 66*:622-628.

(209) KOPLOVITZ, I.; HARRIS, L. W.; ANDERSON, D. R.; LENNOX, W. J.; STEWART, J. R.; (1992) *Reduction by piridostigmina pretreatment of the efficacy of atropine and 2-PAM treatment of sarín and VX poisoning in rodents. Fundam Appl Tóxicols. 18*:102-106.

(210) KOPLOVITZ, I.; STEWART, J. R.; (1994) *A comparison of the efficacy of HI6 and 2-PAM against soman, tabún, sarin, and VX in the rabbit. Toxicol Lett. 70*; 269-79.

(211) KLUWE, W. M.; (1987) *Efficacy of piridostigmina against somán intoxiction in a primate model. In: Proceedings of the 6th Medical Chemical Defense Bioscience Review. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense*. 227-234.

(212) KOPLOVITZ, I.; STEWART, J. R.; (1994) *A comparison of the efficacy of HI6 and 2-PAM against soman, tabún, sarin, and VX in the rabbit. Toxicol Lett. 70*; 269-79.

(213) KOSTER, R.; (1964) *Synergisms and antagonisms between physostigmine and diisopropyl fluorophosphate in cats. J Pharmacol Exp Ther. 88*: 39-46.

(214) KREJCI, E.; DUVAL, N.; CHATONNET, A.; VINCENS, P.; MASSOULIÉ, J.; (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*: 6647-6651.

(215) KRUTZ, R. W. JR.; BURTON, R. R.; SCHIFLETT, S.; HOLDEN, R.; FISHER, J.; (1987) Interaction of piridostigmina bromide with mild hypoxia and rapid decompression. In: Proceedings of the 6th Medical Chemical Defense Bioscience Review. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense.

(216) KULLING, P.; OKUMURA, T.; (1995) Medical aspects of the Sarín attack in the Tokio Metropolitan. IX Word Congress in Emergency and Disaster Medicine. Jerusalem.

(217) KUNKEL, A. M.; O'LEARY, J. F.; JONES, A. H.; (1973) Atropine-Induced Ventricular Fibrillation During Cyanosis Caused by Organo-phosphorus Poisoning. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory. Report 4711.

(218) LAGANIERE, S.; COREY, J.; TANG, X C.; WULFERT, E.; HANIN, I.; (1991) *Acute and chronic studies with the anticholinesterase huperzine A. effect on central nervous system cholinergic parameters. Neuropharmacology. 30*: 763-8.

(219) LALLEMENT, G., FOQUIN, A.; BAUBICHON, D.; BURCKHART, M. F.; CARPENTIER, P.; CANINI, F.; (1998) *Heat stress, even extreme, does not induce penetration of pyridostigmine into the brain of guinea pigs. Neurotoxicology. 19*: 759-66.

(220) LALLEMENT, G.; FOQUIN, A.; DORANDEU, F.; BAUBICHON, D.; AUBRIOT, S.; CARPENTIER, P.; (2001) *Subchronic administration of various pretreatments of nerve agent poisoning. I. Protection of blood and central cholinesterases, innocuousness towards blood- brain barrier permeability. Drug Chem Toxicol 24*: 151-64.

(221) LEADBEATER, L.; (1988) *When all else fails. Chem Br. 24*:684-687.

(222) LEBLANC, F. N.; BENSON, B. E.; GILG, A. D.; (1986) *A severe organophosphate poisoning requiring the use of an atropine drip. Clin Tóxicols. 24*:69-76.

(223) LEMERCIER, G.; CARPENTIER, P.; (1983) *Sentenae-Roumanou H, Morelis R. Histological and histochemical changes in the central nervous system of the rat poisoned by an irreversible anticholinesterase organophosphorus compound. Acta Neuropathol. 61*:123-129.

(224) LENNOX, W. J.; HARRIS, L. W.; TALBOT, B. G.; ANDERSON, D. R.; (1985) *Relationship between reversible acetylcholinesterase inhibition and efficacy against somán lethality. Life Sci. 37*:793-798.

(225) LENZ, D. E.; BRIMFIELD, A. A.; HUNTER, K. W. JR.; (1984) *Studies using a monoclonal antibody against somán. Fundam Appl Tóxicols. 4*:S156-S164.

(226) LENZ, D. E.; YOURICK, J. J.; DAWSON, J. S.; SCOTT, J.; (1992) *Monoclonal antibodies against somán: Characterization of somán stereoisomers. Immunol Lett. 31*:131-135.

(227) LEVIN, H. S.; RODNITZKY, R. L.; MICK, D. L.; (1976) *Anxiety associated with exposure to organophosphate compounds. Arch Gen Psychiatry.33*: 225-228.

(228) LEVIN, H. S.; RODNITZKY, R. L.; (1976) *Behavioral effects of organophosphate pesticides in man. Clin Tóxicols.;9*: 391-405.

(229) LEVINE, R. J.; (1991) *Commentary. Hastings Center Report. March-April 1991*:27-29.

(230) LEVINE, B. S.; PARKER, R. M.; (1991) *Reproductive and developmental tóxicity studies of piridostigmina bromide in rats. Tóxicology. 69*:291-300.

(231) LI, Q.; HIRATA, Y.; PIAO, S.; MINAMI, M.; (2000) *The by-products generated during sarin synthe- sis in the Tokyo sarin disaster induced inhibition of natural killer and cytotoxic T Iymphocyte activity. Toxicology 146*: 209-20.

(232) LITTLE, J. S.; BROOMFIELD, C. A.; FOX-TALBOT, M. K.; BOUCHER, L. J.; MACIVER, B.; LENZ, D. E.; (1989) *Partial characterization of an enzyme that hydrolyzes sarín, somán, tabún, and diisopropyl phosphofluoridate (DFP). Biochem Pharmacols.38*:23-29.

(233) LIPP, J. A.; (1973) *Effect of benzodiazepine derivatives upon somán induced seizure activity and convulsions in the monkey. Acta Int Pharmacodyn. 202*:241-251.

(234) LOEWENSTEIN-LICHTENSTEIN, Y.; SCHWARZ, M.; GLICK, D.; NORGAARD-PEDERSEN, B.; ZAKUT, H.; SOREQ, H.; (1995) *Genetic predisposition to adverse consequences of anti-cholinesterases in «atypical» BCHE carriers. Nature Medicine. 1*:1082-1085.

(235) LOOMIS, T.; (1963) *Distribution and excretion of pyridine-2-aldoxime methiodide (PAM), atropine and PAM in sarín poisoning. Tóxicol Appl Pharmacols. 5*:489-499.

(236) LOTTI, M.; (2000) Organophosphorus compounds. En: Spencer PS, Schaumburg HH, Ludolph AC, editores. Experjmental and clinical neurotoxicology. 2a ed. New York: Oxford University Press.

(237) LUM, K. T.; HUEBNER, H. J.; LI, Y.; PHILLIPS, T. D.; RAUSHEL, F. M.; (2003) *Organophosphate nerve agent tóxicity in Hydra attenuata. Chem Res Tóxicols. 16*:953-7.

(238) LUNDY, P. M.; GOULET, J. C.; HAND, B. T.; (1989) *Hormone- and Dose Schedule-Dependent Protection by Hl-6 against Somán and Tabún Poisoning. Fund and Appield Tóxicology 12*:595-603

(239) LUDOMIRSKY, A.; KLEIN, H. O.; SARELLI, P.; (1982) *Q-T prolongation and polymorphous («torsade de pointes») ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. Am J Cardiol. 49:*1654-1658.

(240) MAGER, P. P.; (1984) Multidimensional Pharmacochemistry. San Diego, Calif: Academic Press.

(241) MAKSIMOVIC, M.; BOSKOVIC, B.; RADOVIC, L. Y COLS. (1980) Antidotal effects of bis-pyridinium-2-monooxime carbonyl derivatives in intoxictions with higly tóxic organophosphorus compounds. Acta Pharm.Jugosl 30:150.

(242) MAKSIMOVIC, M.; KOVACEVIC, V.; (1989) *Protective and reactivating effects of HI-6 Toxogonin mixture in rats and guinea- pigs poisoning by nerve agents. Acta Pharm jugost 39*:27-33.

(243) MANCHE DE LA I. S.; VERGE, D. E.; BOUCHARD, C.; COQ. H.; (1979) *Sentenac-Roumanou H. Penetration of oximes across the blood brain barrier: A histochemical study of the cerebral cholinesterase reactivation. Experientia.* 35:531-532.

(244) MARINO, M. T.; SCHUSTER, B. G.; BRUECKNER, R. P.; LIN, E.; KAMINSKIS, A.; LASSETER, K. C.; (1998) *Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pyridostigmine bromide for prophylaxis against nerve agents in humans. J Clin Pharmacols. 38*:-227-35.

(245) MARRS, T. C.; (1993) *Organophosphate poisoning. PharmacTher 58*: 51-66.

(246) MARTIN, L. J.; DOEBLER, J. A.; SHIH, T.; ANTHONY, A.; (1985) *Protective effect of diazepam pretreatment on somán-induced brain lesion formation. Brain Res. 325*:287-289.

(247) MASSON, P.; ADKINS, S.; GOVET, P.; LOCKRIDGE, O.; (1993) *Recombinant human butyrylcholinesterase G390V, the fluoride-2 variant, expressed in Chinese hamster ovary cells, is a low affinity variant. J Biol Chem. 268*:14329-14341.

(248) MATSUDA, H.; SEO, Y.; KAKIZAKI, E.; TAKAHAMA, K.; (1987) *Changes in mRNA expression levels of synaptic- and target tissue-specific proteins after organophosphate exposure. Leg Med (Tokyo). 2*:55-63.

(249) MAXWELL, D. M.; BRECHT, K. M.; O'NEILL, B. L.; (1987) *The effect of carboxylesterase inhibition on interspecies differences in somán tóxicity. Tóxicol Lett. 39*:35-42.

(250) MAXWELL, D. M.; CASTRO, C. A.; DELAHOZ, D. M.; (1992) *Protection of rhesus monkeys against somán and prevention of performance decrement by pretreatment with acetylcholinesterase. Tóxicol Appl Pharmacols. 115*:44-49.

(251) MCCAIN, W. C.; LEE, R.; JOHNSON, M. S.; WHALEY, J. E.; FERGUSON, J. W.; BEALL, P. Y COLS. (1997) *Acute oral toxicity study of pyridostigmine bromide, permethrin, and DEET in the laboratory rat. J Toxicol Environ Health 50*: 113-24.

(252) MCDONOUGH, J. H. JR.; MCLEOD, C. G. JR.; NIPWODA, T.; (1987) *Direct microinjection of somán or VX into the amygdala produces repetitive limbic convulsions and neuropathology. Brain Res. 435*:123-137.

(253) MCDONOUGH, J. H. JR.; JAAX, N. K.; CROWLEY, R. A.; MAYS, M. Z.; MODROW. H. E.;(1989) *Atropine and/or diazepam therapy protects against somán-induced neural and cardiac pathology. Fundam Appl Tóxicols. 13*:256-276.

(254) MCDONOUGH, J. H. JR.; SMITH, R. F.; SMITH, C. D.; (1986) *Behavioral correlates of somán-induced neuropathology: Deficits in DRL acquisition. Neurobehav Tóxicol Teratol. 8*:179-187.

(255) MCLEOD, C. G. JR.; (1985) *Pathology of nerve agents: Perspectives on medical management. Fundam Appl Tóxicols. 5*:S10-S16.

(256) MELDRUM, B. S.; BRIERLEY, J. B.; (1973) *Prolonged epileptic seizures in primates. Arch Neurol. 28*:10-17.

(257) MESHUL, C. K.; BOYNE, A. F.; DESHPANDE, S. S.; ALBUQUERQUE, E. X.; (1985) *Comparison of the ultrastructural myopathy induced by anticholinesterase agents at the end plates of rat soleus and extensor muscles. Exp Neurol. 89*:96-114.

(258) METCALF, D. R.; HOLMES, J. H.; (1969) *EEG, psychological, and neurological alterations in humans with organophosphorus exposure. Ann N Y Acad Sci.160*:357-365.

(259) METCALF, D. R.; HOLMES, J. H.; (1969) *EEG, psychological, and neurological alterations in humans with organophosphorus exposure. Ann N Y Acad Sci. 160*:357-365.

(260) MCLEOD, C. G. JR.; SINGER, A. W.; HARRINGTON, D. G.; (1984) *Acute neuropathology in somán poisoned rats. Neurotóxicology.* 5:53-58.

(261) MILLARD, C. B.; KRYGER, G.; ORDENTLICH, A.; GREENBLATT, H. M.; HAREL, M.; RAVES, M. L. Y COLS. (1999) *Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase. Nerve agent reaction products at the atomic level. Biochemistry 38*: 7032-9.

(262) MODROW, H. E.; JAAX, N. K.; (1989) *Effect of somán exposure on the acquisition of an operant alternation task. Pharmacol Biochem Behav. 32*:49-53.

(263) MORIARTY, R. M.; HIRATAKE, J.; LIU, K.; (1990) *New synthetic route to unsymmetrically substituted pentacoordinated phos-phorus. Hydrolytically stable chiral monocyclic oxyphosphoranes. J Am Chem Soc. 112*:8575-8577.

(264) MINAMI, M.; HUI, D. M.; KATSUMATA, M.; INAGAKI, H.; BOULET, C. A.; (1997) *Method for the analysis of the methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted ana- logue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster. J Chromatogr 695*: 237-44.

(265) MORITA, H.; YANAGISAWA, N.; NAKAJIMA, T.; SHIMIZU, M.; HIRABAYASHI, H.; OKUDERA, H. Y COLS.; (1995) *Sarin poisoning in Matsumoto, Japan, Lancet 346*: 290-3; 1995

(266) MOSS, J. I.; (2001) *Many Gulf War illnesses may be autoimmune disorders caused by the chemical and biological stressors, pyridostigmine bromide, and adrenaline. Med Hypotheses 56*: 155-7.

(267) MOYLAN-JONES, R. J.; THOMAS, D. P.; (1973) *Cyclopentolate in treatment of sarín miosis. Br J Pharmacols. 48*:309-313.

(268) MYHILL, S.; (2000) *Response to the Committee on Toxicity.s Recommendations of Organophosphates. J Nutric Environ Med, 270*:6370-6380.

(269) MUNRO, N. B.; TALMAGE, S. S.; GRIFFIN, G. D.; WATERS, L. C.; WATSON, A. P.; KING, J. F. Y COLS.; (1999) *The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. Environ Health Perspect 107*: 933-74.

(270) MURATA, K.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; OKUMURA, T.; ISHIMATSU, S.; TAKASU, N. Y COLS.; (1997) *Asymptomatic sequelae to acute sarin poisoning in the central and autonomic, nervous system 6 months after the Tokyo subway attack. J Neurol 244*:601-6.

(271) NAKAJIMA, T.; OHTA, S.; MORITA, H.; MIDORIKAWA, Y.; MIMURA, S.; YANAGISAWA, N.;(1998) *Epidemiological study of sarin poisoning in Matsumoto City, Japan. J Epidemiol RA (Japan) 8*: 33-41.

(272) NADARAJAH, B.; (1991) *Intermediate syndrome of organophosphorus insecticide poisoning: A neurophysiological study. Neurology. 41(suppl 1):*251.

(273) NAKAJIMA, T.; SATO, S.; MORITA, H.; YANAGISAWA, N.; (1997) *Sarín poisoning of a rescue team in the Matsumoto sarín incident in Japan- Occup Environ Med 54*: 697-701.

(274) NAMBA, T.; NOLTE, C. T.; JACKREL, J.; GROB, D.; (1971) *Poisoning due to organophosphate insecticides. Am J Med. 59*:475-492.

(275) NASR, M.; CONE, N.; KAWAKAMI, T. G.; GOLDMAN, M.; ROSENBLATT, L.; (1988) Tóxicity Studies on Agent GA: Mutagenicity of Agent GA (Tabún) in the In Vitro Cytogenetic Sister Chromatid Exchange Test Phase I. Davis, Calif: University of California. Davis Laboratory for Energy.

(276) NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH TECHNOLOGY ASSESSMENT WORKSHOP. (1994) The Persian Gulf Experience and Health. Bethesda Md: National Institutes of Health.

(277) NATO handbook on the medical aspects of NBC defensive operations part 3: chemical. 4th ed. NATO, (1996).

(278) NEITLICH, H.; (1966) *Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: A genetic variant. J Clin Invest. 45*:380-386.

(279) NATO handbook on the medical aspects of NBC defensive operations part 3: chemical. 4th ed. NATO, (1996).

(280) NEVANDER, G.; INGVAR, M.; AUER, R.; SIESJO, B. K.; (1985) *Status epilepticus in well-oxygenated rats causes neuronal necrosis. Ann Neurol*. 18:281-290.

(281) NEVANDER, G.; INGVAR, M.; AUER, R.; Siesjo, B. K.; (1984) *Irreversible neuronal damage after short periods of status epilepticus. Acta Physiol Scand. 120*:155-157.

(282) NIESEN, C. E.; SHAH, N. S.; (2000) *Pyridostigmine-induced microcephaly. Neurology 54*: 1873-4.

(283) NIGHTINGALE, S. L.; (1995) *Medicine and war. N Engl J Med. 326:1097-1098. 1992 Nozaki H, Aikawa N. Sarin poisoning in Tokyo subway [Letter]. Lancet 345*: 1446-7.

(284) NOZAKI, H.; AIKAWA, N.; FUJISHIMA, S.; SUZUKI, M.; SHINOZAWA, Y.; HORI, S. Y COLS. (1994) *A case of VX poisoning and the difference from sarin [Letter]. Lancet 346: 698-9; 1995 experience and health. JAMA. 1994;272*:391-396.

(285) NOZAKI, H.; HORI, S.; SHINOZAWA, Y.; FUJISHIMA, S.; TAKUMA, K.; SAGOH, M. Y COLS. (1995) *Secondary exposure of medicai staff to sarin vapor in the emergency room. Intensive Care Med 21*:1032-5.

(286) NOZAKI, H.; HORI, S.; SHINOZAWA, Y.; FUJISHIMA, S.; TAKUMA, K.; KIMURA, H. Y COLS. (1997) *Relationship between pupil size and acetylcholinesterase activity in patients exposed to sarin vapor. Intensive Care Med 23*: 1005-7.

(287) OAK RIDGE NATIONAL LABORATORY. (2000) *Appendix G: Inhibition of Cholinesterases and an evaluation of the methods used to measure Cholinesterase activity. J Tóxicol Environ Health, 269*:11233- 11239

(288) OBERST, F. W.; CHRISTENSEN, M. K.; (1956) *Regeneration of erythrocyte and brain cholinesterase activity in rats after sub-lethal exposures to GB vapor. J Pharmacol Exp Ther.116*: 216-219.

(289) OBERST, F. W.; KOON, W. S.; CHRISTENSEN, M. K.; CROOK, J. W.; CRESTHULL, P.; FREEMAN, G.; (1968) *Retention of inhaled sarín vapor and its effect on red blood cell cholinesterase activity in man. Clin Pharmacol Ther. 9*:421-427.

(290) OBERST, F. W.; ROSS, R. S.; (1956) *Christensen MK, Crook JW, Cresthull P, Umland CW. Resuscitation of dogs poisoned by inhalation of the nerve gas GB. Milit Med. 119*: 377-386.

(291) OHBU, S.; YAMASHINA, A.; TAKASU, N.; YAMAGUCHI, T.; MURAI, T.; NAKANO, K. Y COLS. (1997) *Sarin poisoning on Tokyo subway. South Med J 1997;* 90: 587-93.

(292) O'LEARY, J. F.; KUNKEL, A. M.; JONES, A. H.; (1961) *Efficacy and limitations of oxime-atropine treatment of organophosphorus anticholinesterase poisoning. J Pharmacol Exp Ther. 132*:50-57.

(293) OKUDERA, H.; (2002) *Clinical features on nerve gas terrorism en Matsumoto. J Clin Neurosci 9*:17-21.

(294) OKUDERA, H.; MORITA, H.; IWASHITA, T., SHIBATA, T.; OTAGIRI, T.; KOBAYASHI, S. Y COLS. (1997) Unexpected nerve gas exposure in the city of Matsumoto: report of rescue activity in the first sarin gas terrorism. Am J Emerg Med 15: 5278.

(295) OKUMURA, T.; (1997) Organophosphate poisoning in pregnancy [Letter]. Ann Emerg Med 29: 299.

(296) OKUMURA, T.; SUZUKI, K.; FUKUDA, A.; KOHAMA, A.; TAKASU, N.; ISHIMATSU, S. Y COLS. (1998) *The Tokyo subway sarin attack: disaster management. part 2: hospital response. Acad Emerg Med 5*:618-24.

(297) OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INACIO, A. F.; (2000) Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. Hum Exp Tóxicol- 19(3).

(298) OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; (1992) *Harel M, Remington SJ, Silman I, Shrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A. Protein Eng. 5*:197-211.

(299) O'NEILL, J. J.; (1981) *Non-cholinesterase effects of anticholinesterases. Fundam Appl Tóxicols.1:* 154-169.

(300) O'NEILL, J. J.; (1981) *Non-cholinesterase effects of anticholinesterases. Fundam Appl Tóxicols.1*: 154-160.

(301) ORLOWSKI, J. P.; ERENBERG, G.; LUEDERS, H.; CRUSE, R. P.; (1991) Hypothermia and barbiturate coma for refractory status.

(302) PAPIRMEISTER, B.; FEISTER, A. J.; ROBINSON, S. I.; FORD, R. D.; (1991) Medical Defense Against Mustard Gas: Tóxic Mechanisms and Pharmacological Implications. Boca Raton, Fla: CRC Press.

(303) PATOCKA, J.; KASSA, J.; HUPERZINE, A.; (1999) *Prospective prophylactic antidote against organophosphate warfare agent poisoning. ASA Newsletter 99-2 (71):* 16-9.

(304) PAXMAN, J.; HARRIS, R.; (1982) A Higher Form of Killing: The Secret Story of Chemical and Biological Warfare. Ed. Hill and Wang, New York.

(305) PAZDERNIK, T. L.; CROSS, R. S.; GIESLER, M.; SAMSON, F. E.; NELSON, S. R.; (1985) *Changes in local cerebral glucose utilization induced by convulsants. Neuroscience. 14*:823-835.

(306) PECHURA, C. M.; RALL, D. P.; (1993) Veterans at risk. the health effects of mustard gas and lewisite. Washington, D.C.: National Academy Press.

(307) PERRON, R.; JOHNSON, B. B.; (1969) *Insecticide poisoning. N Engl J Med. 281*:274-275.

(308) PETRALI, J. P.; MAXWELL, D. M.; LENZ, D. E.; (1985) *A study on the effects of somán on rat blood-brain barrier. Anat Rec.211*: 351-352.

(309) PETRALI, J. P.; MAXWELL, D. M.; LENZ, D. E.; MILLS, K. R.; (1991) *Effect of an anticholinesterase compound on the ultrastructure and function of the rat blood-brain barrier: A review and experiment. J Submicrosc Cytol Pathol. 23*:331-338.

(310) PETROIANU, G.; ARAFAT, K.; KOSANOVIC, M.; SALEH, A.; CAMASAMUDRAM, V.; HASAN, M. Y.; (2003) *In vitro protection of red blood cell acetylcholinesterase by metoclopramide from inhibition by organophosphates (paraoxon and mipafox). J Appl Tóxicols. 23*:447-51.

(311) PITA, R.; ANADON, A.; (2003) *Martinez-Larranaga MR. Neurotoxinas con actividad anticolinesterásica y su posible uso como agentes de guerra. Med Clin (Barc). 121*:511-7.

(312) PITA, R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; (2002) *Actualización de las intoxicaciones por agentes neurotóxicos de guerra: efectos fisiopatológicos. Aten Farm 4*:98-116.

(313) PITA, R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRANAGA, M. R.; (2002) *Actualización de las intoxicaciones por agentes neurotóxicos de guerra: tratamiento farmacológico Aten Farm 4*:178-88.

(314) PITA, R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; (2003) *Estado actual del pretratamiento de las intoxicaciones por agentes neurotóxicos de guerra con piridostigmina y otras alternativas farmacológicas. Rev Toxicol 20*:1-7.

(315) QIAN, B. C.; WANG, M.; ZHOU, Z. F.; CHEN, K.; ZHOU, R. R.; CHEN, G. S.; (1995) *Pharmacokinetics of tablet huperzine A in s ix volunteers. Acta Pharmacologica Sinica 16*.396-8.

(316) QUINBY, G. E.; (1964*) Further therapeutic experience with pralidoximes in organic phosphorus poisoning. JAMA.187*:114-118.

(317) QUINBY, G. E.; CLAPPISON, G. B.; (1961) *Parathion poisoning. Arch Environ Health. 3*:538-542.

(318) QUINBY, G. E.; LOOMIS, T. A.; BROWN, H. W.; (1963) *Oral occupational parathion poisoning treated with 2-PAM iodide (2-pyridine aldoxime methiodide) N Engl J Med. 268*:639-643.

(319) RAFFAELE, K.; HUGHEY, D.; WENK, G.; OLTON, D.; MODROW, H.; MCDONOUGH, J.; (1987) *Long-term behavioral changes in rats following organophosphonate exposure. Pharmacol Biochem Behav. 27*:407-412.

(320) RAVEH, L.; GRUNWALD, J.; MARCUS, D.; PAPIER, Y.; COHEN, E.; ASHANI, Y.; (1993) *Human butyrylcholinesterase as a general pro-phylactic antídoto for nerve agent tóxicity. Biochem Pharmacols. 45*:2465-2474.

(321) RAY, R.; BOUCHER, L. J.; BROOMFIELD, C. A.; LENZ, D. E.; (1988) *Specific somán-hydrolyzing enzyme activity in a clonal neuronal cell culture. Biochim Biophys Acta. 967*:373-381.

(322) RENGSTORFF, R. H.; (1985) *Accidental exposure to sarín: Vision effects. Arch Tóxicols. 56*:201-203.

(323) RENSHAW, B.; (1946) Mechanisms in production of cutaneous injuries by sulfur and nitrogen mustards. In: Chemical Warfare Agents and Related Chemical Problems. Washington, DC: Office of Scientific Research and Development.

(324) RIPOLL, D. R.; FAERMAN, C. H.; AXELSEN, P. H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; (1993) *An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholineste- rase. Proc Natl Acad Sci USA 90*: 5128-32.

(325) RICE, D.; BARONE, S. J. JR.; (2000) Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. Environ Health Perspect 108(83).

(326) RICKETT, D. L.; GLENN, J. F.; BEERS, E. T.; (1986) *Central respiratory effects versus neuromuscular actions of nerve agents. Neurotóxicology. 7*:225-236.

(327) RIDER, J. A.; MOELLER. H. C.; PULETTI, E. J.; SWADER, J. I.; (1969) *Tóxicity of parathion, systox, octamethyl pyrophosphoramide,and methyl parathion in man. Tóxicol Appl Pharmacols. 14*:603-611.

(328) RIDER, J. A.; PULETTI, E. J.; SWADER, J. I.; (1975) *The minimal oral tóxicity level for mevinphos in man. Tóxicol Appl Pharmacols. 32*:97-100.

(329) ROBERTSON, G. S.; (1967) *Serum protein and cholinesterase changes in association with contraceptive pills. Lancet. i*:232-235.

(330) ROBINSON, S.; MAGENIS, T. P.; MINTER, D. I.; HARPER, H.; (1953) The effects of varying doses of atropine on temperature regulation of men and dogs. In: Robinson S, ed. The Physiological Effects of Atropine and Potential Atropine Substitutes.Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratories.

(331) ROLAND, P. S.; HALEY, R. W.; YELLIN, W.; OWENS, K.; SHOUP, A. G.; (2000) *Vestibular dysfunction in Gulf War syndrome. Otolaryngol Head Neck Surg 122*: 319-29.

(332) ROSEN, F. S.; (1960) *Tóxic hazards: Parathion. N Engl J Med. 262*:1243-1244.

(333) ROSENBERG, A. M.; SEMCHUK, K. M.; MCDUFFIE, H. H.; (1999) *Prevalence of antinuclear antibodies in a rural population. J Tóxicol Environ Health, 21 (5)*: 334-339

(334) ROSENSTOCK, L.; KEIFER, M.; DANIELL, W. E.; MCCONNELL, R.; CLAYPOOLE, K.; (1991) *Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxiction. Lancet. 338*:223-227.

(335) ROWNTREE, D. W.; NEVIN, S.; WILSON, A.; (1950) *The effects of diisopropylfluorophosphate in schizophrenic and manic de-pressive psychosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 13*: 47-62.

(336) RUBIN, L. S.; GOLDBERG, M. N.; (1958) *Effect of tertiary and quaternary atropine salts on absolute scotopic threshold changes produced by an anticholinesterase (sarín). J Appl Physiol.; 12*: 305-310.

(337) RUBIN, L. S.; KROP, S.; GOLDBERG, M. N.; (1957) *Effect of sarín on dark adaptation in man: Mechanism of action. J Appl Physiol. 11*:445-449.

(338) RUMP, S.; GRUDZINSKA, E.; EDELWEIN, Z.; (1972) *Effects of diazepam on abnormalities of bioelectrical activity of the rabbit's brain due to fluostigmine. Act Nerv Super. 14*:176-177.

(339) RUMP, S.; GRUDZINSKA, E.; EDELWEIN, Z.; (1973*) Effects of diazepam on epileptiform patterns of bioelectrical activity of the rabbit brain induced by fluostigmine. Neuropharmacology. 12*:815-819.

(340) SCHAUMBURG, H. H.; LUDOLPH, A. C.; EDITORS. (2000) Experimental and clinical neurotoxicology. 2nd ed. New York: Oxford University Press.

(341) SCHAIJMBURG, H. H.; (2002) *Human neurotoxic disease. En: Spencer PS, Schaumburg HH, Ludolph AC, editors. Experimental and clinical neurotoxico- logy. 2nd ed. New York: Oxford University Press* p. 55-82.

(342) SCHIFLETT, S. G.; MILLER, J. C.; GAWRON, V. J.; (1987) *Piridostigmina bromide effects of performance of tactical transport air-crews. Proceedings of the 6th Medical Chemical Defense Bioscience Review. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense*. 609-611.

(343) SCHUMM, W. R.; WEBB, F. J.; JURICH, A. P.; BOLLMAN, S. R.; (2002) *Comments on the Institute of Medicine's 2002 report on the safety of anthrax vaccine. Psychol Rep. 91*: 187-91.

(344) SATOH, T.; HOSOKAWA, M.; (2000*) Organophosphates and their impact on the global environment, Neurotoxicology 21*: 223-8.

(345) SEKIJIMA, Y.; MORITA, H.; YANAGISAWA, N.; (1997) Follow-up of sarín poisoning in Mat sumoto. Ann Intern Med 127: 1042.

(346) SENANAYAKE, N.; KARALLIEDDE, L.; (1987) *Neurotóxic effects of organophosphorus insecticides. N Engl J Med. 316*:761-763.

(347) SHAIKH, J.; KARANTH, S.; CHAKRABORTY, D.; PRUETT, S.; POPE, C. N.; (2003) *Effects of daily stress or repeated paraoxon exposures on subacute piridostigmina tóxicity in rats. Arch Tóxicols. 77*:576-83.

(348) SHANOR, S. P.; VAN HEES, G. R.; BAART, N.; ERDOS, E. E. G.; FOLDES, F. F.; (1961) *The influence of age and sex on human plasma and red cell cholinesterase. Am J Med Sci. 242*:357-361.

(349) SHARABI, Y.; DANON, Y. L.; BERKENSTADT, H.; ALMOG, S.; MIMOUNI-BLOCH, A.; ZISMAN, A. Y COLS.;(1991) *Survey of symptoms following intake of pyridostigmine during the Persian Gulf war. Isr J Med Sci 27*: 656-8.

(350) SHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M.; (1991) *Nature 351*:761-765.

(351) SIDELL, F. R.; (1992) *The medical management of chemical casualty course in CONUS and Europe during Desert Storm. J US Army Med Dept.PB 8-92-3/4*:10-12.

(352) SIDELL, F. R.;(1974) Somán and sarín: Clinical manifestations and treatment of accidental poisoning by organophosphates. Clin Tóxicols. 7:9.

(353) SIDELL, R. F.;(1992) Clinical considerations in nerve agent intoxiction. In: Sománi SM, ed. Chemical Warfare Agents. New York, NY: Academic Press 163.

(354) SIDELL, F. R.; GROFF, W. A.; (1974) *The reactivatibility of cholinesterase inhibited by VX and sarín in man. Tóxicol Appl Pharmacols. 27*:241-252.

(355) SIDELL, F. R.; GROFF, W. A.; (1974) *The reactivatibility of cholinest-erase inhibited by VX and sarín in man. Tóxicol Appl Pharm. 27*:241-252.

(356) SIDELL, F. R.; GROFF, W. A.; (1971) *Intramuscular and intravenous administration of small doses of 2-pyridinium aldoxime methochloride to man. J Pharm Sci. 60*:1224-1228.

(357) SIDELL, F. R.; KAMINSKIS, A.; (1975) *Influence of age, sex, and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. Clin Chem. 21*:1393-1395.

(358) SIDELL, F. R.; KAMINSKIS, A.; (1975) *Temporal intrapersonal physiological variability of cholinesterase activity in human plasma and erythrocytes. Clin Chem. 21*:1961-1963.

(359) SIDELL, F. R.; MARKIS, J. E.; GROFF, W. A.; KAMINSKIS, A.; (1974) *Enhancement of drug absorption after administration by an automatic injector. J Pharmacokinet Biopharm. 2*:197-210.

(360) SIDELL, F. R.; MERSHON, M. M.; SAVOLA, R. H.; SCHWARTZ, H. N.; WILES, J. S.; MCSHANE, W. P.; (1968) Treatment of Percutaneous VX Intoxiction in Rabbits Under Conditions Simulating Self-Therapy in the Field. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory.

(361) SILMAN, I.; MILLARD, C. B.; ORDENTLICH, A.; GREENBLATT, H. M.; HAREL, M., BARAK, D. Y COLS. (1999) *A pre- liminary comparison of structural models for catalytic intermediates of acetylcho- linesterase, Chem Biol lnteract 119*: 43-52.

(362) SIM, V. M.; STUBBS, J. L. V. X.; (1960) Percutaneous Studies in Man. Edgewood Arsenal, Md: Medical Research Laboratory; Chemical Research and Development Laboratory Report 3015.

(363) SINGER, A. W.; JAAX, N. K.; (1987) *Graham JS, McLeod CG Jr. Cardiomyopathy in somán and sarín intoxicted rats. Tóxicol Lett.36:* 243-249.

(364) SINTON, C. M.; FITCH, T. E.; PETTY, F.; HALEY, R. W.; (2000) *Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in the rat. Toxicol Appl Pharmacol 165*: 99-105.

(365) SNODGRASS, H. L.; (1992) *Permethrin transfer from treated cloth to the skin surface: poten- tial for exposure in humans. J Toxicol Environ Health 35*.91-105.

(366) SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L. Y COLS. (1991) *Atomic structure of acetylcholinesterase from Totpedo alifornica: a prototypic acetylcho- line-binding protein, Science 253*: 872-9.

(367) SUZUKI, T.; MORITA, H.; ONO, K.; MAEKAWA, K.; NAGAI, R.; YAZAKI, Y.; (1995) Sarin poisoning in Tokyo subway [Letter]. Lancet 345: 980.

(368) WESTER, R. M.; TANOJO, H.; MAIBACH, H. I.; WESTER, R. C.; (2000) *Predicted chemical warfare agent VX toxicity to uniformed soldier using parathion in vitro human skin exposure and absorption. Toxicol Appl Pharmacol 168*: 149-52.

(369) SODERFELDT, B.; BLENNOW, G.; KALIMO, H.; OLSSON, Y.; SIESJO, B. K.; (1983) *Influence of systemic factors on experimental epileptic brain injury. Acta Neuropathol. 60:*81-91.

(370) SODERFELDT, B.; KALIMO, H.; OLSSON, Y.; SIESJO, B. K.;(1983) *Bicuculline-induced epileptic brain injury. Acta Neuropathol. 62*:87-95.

(371) SOLANA, R. P.; GENNINGS, C.; CARTER, W. H. JR.; (1991) *Efficacy comparison of two cholinolytics, scopolamine and azaprophen, when used in conjunction with physostigmine and piridostigmina for protection against organo-phosphate exposure. J Am Coll Tóxicols. 10*:215-222.

(372) SOMANI, S. M.; HUSAIN, K.; JAGANNATHAN, R.; (2001) *Pharmacokinetics and pharmacodyna- mics of carbamates under physical stress. En: Somani SM, Romano JA Jr., edi- tores. Chemical warfare agents. toxicity at low levels. Florida: CRC Press LLC.* 145-89.

(373) SPENCER, P. S.; WILSON, B. W.; ALBUQUERQUE, E. X.; (2000) Sarin, other «nerve agents», and their antidotes, En: Spencer PS, Schaumburg HH, Ludolph AC, editores. Experimental and clinical neurotoxicology. 2a ed. New York: Oxford University Press.

(374) STEWART, W. C.; MADILL, H. D.; DYER, A. M.; (1968) *Night vision in the miotic eye. Can Med Assoc J. 99*:1145-1148.

(375) SULTAN, W. E.; LENNOX, W. J.; (1983) Comparison of the Efficacy of Various Therapeutic Regimens, With and Without Piridostigmina Prophylaxis, for Somán (GD) Poisoning in Mice and Rabbits. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Chemical Systems Labororatory; ARCSL Technical Report 83103.

(376) SUNDWALL, A.; (1961) *Minimum concentrations of N-methylpyridinium-2-aldoxime methane sulphonate (P2S), which reverse neuromuscular block. Biochem Pharmacols. 8*:413-417.

(377) SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I.; (1991) *Science 253*: 872-879.

(378) SWARTZ, R. D.; SIDELL, F. R.; (1973) *Effects of heat and exercise on the elimination of pralidoxime in man. Clin Pharmacol Ther. 14*:83-89.

(379) SUZUKI, J.; KOHNO, T.; TSUKAGOSI, M.; FURUHATA, T; YAMAZAKI, K.; (1997) *Eighteen cases exposed to sarin in Matsumoto, Japan. Intern Med (Japan) 36*: 466-70.

(380) SWARTZ, R. D.; SIDELL, F. R.; (1974) *Renal tubular secretion of pralidoxime in man. Proc Soc Exp Biol Med. 146*: 419-424.

(381) TABERSHAW, I. R.; COOPER, W. C.; (1966) *Sequelae of acute organic phosphate poisoning. J Occup Med. 8*:5-20.

(382) TALBOT, B. G.; ANDERSON, D. R.; HARRIS, L. W.; YARBROUGH, L. W.; LENNOX, W. J.; (1988) *A comparison of in vivo and in vitro rates of aging of somán-inhibited erythrocyte acetylcholinesterase in different animal species. Drug Chem Tóxicols. 11*:289-305.

(383) TAPLIN, D.; MEINKING, T. L.;(1987) *Pyrethrins and pyrethroids for the treatment of scabies and pediculosis. Semin Dermatol*; 6: 125-35.

(384) TAYLOR, P.; (1996) Anticholinesterase agents. En: Hardman JG, Limbrid LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman A, editores. Goodman Gilman.s The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9a ed. New York: Mc Graw Hill. 161-76.

(385) TAYLOR, P., RADIC, Z.; (1994) *The cholinesterases: from genes to proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol 34*: 281-320.

(386) TAYLOR, P.; WONG, L.; RADIC, Z.; TSIGELNY, L.; BRÜGGEMANN, R.; HOSEA, N. A. Y COLS.; (1999) *Analysis of cholinesterase inactivation and reactivation by systematic structural modifica- tion and enantiomeric selectivity. Chem Biol lnteract 119*: 3-15.

(387) TIAN, H.; SONG, X.; BRESSLER, J.; PRUETT, S.; POPE, C. N.; (2002) *Neither forced running nor forced swimming affect acute pyridostigmine toxicity or brain-regional cholinesterase inhibition in rats. Toxicology 176*: 39-50.

(388) *TONDULI, L. S.; TESTYLIER, G.; MASQUELIEZ, C.; LALLEMENT, G.; MONMAUR, P.*; (2001) *Effects of huperzine used as pre-treatment against soman-induced seizures. Neurotoxicology 22*: 29-37.

(389) TRUSSOV, M. S. (1962) *Effects of eserine upon light sensitivity and dark adaption. Oftalmol J Ukraine. 17*:366-371.

(390) UNITED STATES ARMY MEDICAL RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL DEFENSE. (1990) *Clinical notes on chemical casualty care: pyridostigmine. USAMRICD Technical Memorandum* 90-4.

(391) VALE, J. A.; MEREDITH, T. J.; HEATH, A.; (1990) High dose atropine in organophosphorus poisoning. Postgrad Med J. 66:881.

(392) VELAN, B.; KRONMAN, C., GROSFELD, H.; (1991) *Recombinant human acetylcholinesterase is secreted from transiently transfected 293 cells as a soluble globular enzyme. Cell Mol Neurobiol.;11*:143-156.

(393) VIJVERBERG, H. P. M.; (2000) *Pyrethroids. En: Spencer PS, Schaumburg HH, Ludolph AC, editores. Experimental and clinical neurotoxicology. 2a ed. New York: Oxford University Press.* 1028-44.

(394) VRANKEN, M. A.; DEBISSCHOP, H. C.; WILLEMS, J. L.; (1982) *«In vitro» inhibition of neurotóxic esterase by organophosphorus nerve agents. Arch Int Pharmacodyn. 260*:316-318.

(395) WADE, C. E.; WARING, P. P.; TRAIL, D. S.; GILDENGORIN, V. L.; WILLIAMS, B. F.; BONNER, G. D.; (1988) *Effects of atropine, 2-PAM, or piridostigmina in euvolemic or hemorrhagic conscious swine. Milit Med. 153*:470-476.

(396) WADE, J. V.; GUM, R. M.; DUNN, M. A.; (1992) *Medical chemical defense in Operations Desert Shield and Desert Storm. J US Army Med Dept. PB8-92-1/2*:34-36.

(397) WADIA, R. S.; SADAGOPAN, C.; AMIN, R. B.; SARDESAI, H. V.; (1974) *Neurological manifestations of organophosphorous insecticide poisoning. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 37*:841-847.

(398) WADMAN, M.; (2001) Fracas over 5 million Gulf syndrome grant. Nature 410: 135.

(399) WARD, J. R.; (1962) *Case report: Exposure to a nerve gas. In: Whittenberger JL, ed. Artificial Respiration: Theory and Appli-cations.New York, NY: Harper Row*; 258-265.

(400) WEISS, B.; LANDRIGAN, P. J.; (2000) The Developing Brain and the Environment: An introduction. Environ Health Perspect. 107:53.

(401) WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J.; RACKÉ, K.; (1999) The cholinergic 'pitfall': Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans, Clin Exp Pharm Physio. 26:3.

(402) WETSTONE, H. J.; LAMOTTA, R. V.; (1965) *The clinical stability of serum cholinesterase activity. Clin Chem.* 11:653-663.

(403) WHELPTON, R.; HURST, P.; (1985) *Bioavailability of oral physostigmine. N Engl J Med.* 3:1293-1294.

(404) WHITTAKER, M.; CHARLIER, A. R.; RAMASWAMY, S.; (1971) *Changes in plasma cholinesterase isoenzyme due to oral contracep-tives. J Reprod Fertil 26*:373-375.

(405) WILLEMS, J. L.; PALATE, B. M.; VRANKEN, M. A.; DEBISSCHOP, H. C.; (1983) Delayed neuropathy by organophosphorus nerve agents. In: Proceedings of the International Symposium on Protection Against Chemical Warfare Agents. Umea, Sweden: National Defence Research Institute.

(406) WILSON, I. B.; BERGMANN, F.; (1950) *Acetylcholinesterase: dissociation constants of the active groups. J Biol Chem 186*: 683-92.

(407) WILLS, J. H.; MCNAMARA, B. P.; FINE, E. A.; (1950) Ventricular fibrillation in delayed treatment of TEPP poisoning. Fed Proc.9: 136.

(408) WILSON, I. B.; (1951) *Acetylcholinesterase, XI: Reversibility of tetra ethylpyrophosphate inhibition. J Biol Chem.* 190:111-117.

(409) WILSON, I. B.; GINSBURG, S.; (1955) *A powerful reactivator of alkyl phosphate-inhibited acetylcholinesterase. Biochim Biophys Acta. 18*:168-170.

(410) WILLEMS, J. L.; NICAISE, M.; DE BISSCHOP, H. C.; (1984) *Delayed neuropathy by the organophosphorus nerve agents somán and tabún. Arch Tóxicols*. 55:76-77.

(411) WILLS, J. H.; DEARMON, I. A.; (1954) A Statistical Study of the Adamek Report. Army Chemical Center, Md: Medical Laboratory Special Report.

(412) WILLEMS, J., VERMEIRE, P.; ROLLY, G.; (1971) *Some observations on severe human poisonings with organophosphate pesti-cides. Arch Tóxicols*. 28:182-191.

(413) WOODALL, J.; (1997) Tokyo subway gas attack [Letter]. Lancet 350: 296.

(414) WRIGHT, P. G.; (1954) *An analysis of the central and peripheral components of respiratory failure produced by anticholinesterase poisoning in the rabbit. J Physiol (Lond). 126*:52-70.

(415) WOLTHUIS, O. L.; VANWERSCH, R. A. P.; VAN DER VIEL, H. J.; (1981). *The efficacy of some byspiridinium oximes as antídotos to xoman in isolates muscles of several species including man. Eur J Pharmacol 70*:335-369

(416) WOLTIUS, O. L.; CLASSON, H. J.; VISSER, R. P. L. S.; (1976). The dependence of organophosphate poisoning. Eur J Pharmacols. 39:41.

(417) XIA, D. Y.; WANG, L. X.; PEI, S. Q.; (1981) *The inhibition and protection of cholinesterase by physostigmine and pyridostigmine against soman poisoning in vivo. Fundam Appl Toxicols.* 1.217-21.

(418) XU, S. S.; GAO, Z. X.; WENG, Z.; DU, Z. M.; XU, W. A.; YANG, J. S. ET AL.; (1995) *Efficacy of tablet HUP-A on memory, cognition and behavior in Alzheimer's disease. Acta Pharmacologica Sinica 16*: 391-5.

(419) YANG, H.; CARR, P. D.; MCLOUGHLIN, S. Y.; LIU, J. W.; HORNE, I.; QIU, X.; JEFFRIES, C. M.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G.; OLLIS, D. L.; (2003) *Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. Protein Eng. 6*:135-45.

(420) YOKOYAMA, K.; ARAKI, S.; MURATA, K.; NISHIKITANI, M.; OKUMURA, T.; ISHIMATSU, S. Y COLS. (1998) *A preliminary study on delayed vestibulo-cerebellar effects of Tokyo subway sarin poisoning in relation to gender difference: frequency analysis of postural sway. J Occup Environ Med 40*: 17-21.

(421) YOKOYAMA, K.; ARAKI, S.; MURATA, K.; NISHIKITANI, M.; OKUMURA, T.; ISHIMATSU, S.; Y COLS. (1998) *Chronic neurobehavioral effects of Tokyo subway sarin poisoning in relation to posttraumatic stress disorder. Arch Environ Health 53: 249-56.*

(422) YOKOYAMA, K.; YAMADA, A.; MIMURA, N.; (1996) Clinical profiles of patients with sarin poi- soning after the Tokyo subway attack [Letter]. Am J Med 100: 586.

Desfoliantes. Agente Naranja. Otros agresivos químicos y su control

BARTOLOMÉ RIBAS OZONAS
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Introducción

Uno de los objetivos de este tema, es dar a conocer la naturaleza química, toxicología, peligrosidad y control del «agente naranja», orientado a la evaluación del impacto ambiental y humano de este compuesto y sus mezclas. Se trata de compuestos químicos, tóxicos, peligrosos, persistentes en el medio ambiente y bioacumulativos, es decir se acumulan en tejidos humanos y animales. De igual modo las dioxinas, subproductos de la síntesis del agente naranja, y de características más tóxicas que el anterior.

El agente naranja contiene varias estructuras cloradas del ácido fenoxiacético, importante herbicida, que posteriormente a su utilización como material de guerra en Vietnam se denominó agente naranja, debido a su transporte en bidones de ese color. Consiste en una mezcla de estructuras análogas del compuesto anteriormente señalado, y de otros compuestos todavía más tóxicos, las dioxinas. Estas, las dioxinas, minoritarias en la síntesis orgánica, son neurotóxicos de gran potencia, persistencia y peligrosidad por ser bioacumulativas. Existen otras sustancias químicas activas como compuestos desfoliantes o exfoliantes, que mencionaremos posteriormente algunos de ellos.

Este herbicida fue utilizado en la guerra de Vietnam entre 1960 al 71 y su apogeo fue en 1967-68, con la fumigación de unos 44 millones de litros, y está constituido por una mezcla de dos herbicidas 2,4-D (ac. 2,4-diclorofenoxiacético) y 2,4,5-T (ac. 2,4,5-triclorofenoxiacético) con mayor o menor presencia de impurezas de compuestos minoritarios dioxinas.

Vías de contaminación

El agente naranja, al igual que otros compuestos químicos industriales, de los que ha habido accidentes y su polución ha afectado manifiestamente a la población, irrumpen a través de las vías de contaminación conocidas (aire, agua, industriales y accidentales), en el ecosistema afectando al hombre, animales y plantas, con los consiguientes riegos para la sociedad y futuras generaciones. La inhalación a través del aire y la ingestión a través del agua constituyen las vías de contaminación mas importantes, algunos compuestos a través del contacto con la piel, siendo la primera en este caso, debido al uso en fumigación y la accidental acaecida en Seveso (Italia).

La humanidad está protegida por una serie de normas y legislaciones específicas emanadas de la OMS, OCDE, FDA, EFNA, etc. En vista de los numerosos accidentes habidos, la sociedad no debe permitir que vuelvan a ocurrir so cabo de mermar la vida futura en nuestro planeta. Por ello vienen mejorándose a través de Normativas y Directivas, con participación de la Unión Europea la legislación sobre la síntesis, manufactura, transporte y utilización de las sustancias químicas peligrosas. Los accidentes habidos justifican un estricto control y legislación, para evitar los posibles efectos en seres humanos y el impacto en el Ecosistema. Este tipo de compuestos químicos, principalmente los compuestos orgánicos persistentes (COPs) y los metales pesados tóxicos, ambos con un recambio (turnover) muy limitado, que escapan a su metabolismo y excreción. Son persistentes porque permanecen largamente en el ambiente, y bioacumulativos en los organismos vivos, porque son solubles en la grasa de los organismos vivos. Entre ellos existen numerosos compuestos herbicidas, insecticidas, plaguicidas, medicamentos humanos y veterinarios, y otros, sean o no autorizados y controlados.

Además del aire debemos mencionar la vía acuática, para compuestos persistentes es muy importante, porque estos contaminantes pueden alcanzar los niveles freáticos, manantiales, ríos y el mar. Pueden contaminar charcas, humedales, lagos y pantanos y revertir al hombre a través de los riegos y los alimentos. Su bioacumulación en los seres vivos es muy peligrosa porque atañe la cadena trófica o alimentaria desde el plancton, algas, peces pequeños y los predadores sucesivos hasta el hombre.

Análisis de riesgo

Un agente exfoliante por ser una sustancia activa, es peligrosa, debe estar sometida a un análisis de riesgo, pues ejercerá un impacto ambiental, es decir, debe conocerse completamente su peligrosidad para el ser humano y para el ambiente (ecosistema). Para ello debe conocerse la evaluación de la exposición y la evaluación de los efectos de su exposición en relación con las directivas OCDE y UE disponibles, para evitar a toda costa posibles accidentes, es decir, su prevención con medios humanos y tecnología actual.

El análisis de riesgo sirve para la total concienciación de su peligrosidad y la toma de decisiones en la prevención de posibles accidentes, efectos en los trabajadores y de la sociedad o poblaciones posiblemente expuestas. En la figura 1 se exponen los tres ámbitos que deben conocerse antes de aprobar y registrar una sustancia activa para ser autorizada, envasada y comercializada. Con ello es más factible conocer los riesgos que acarrea y su control, para su transporte, fabricación, manufactura, venta y aplicación para sus fines como herbicida, plaguicida o fitosanitario, con la consiguiente defensa para la exposición del operador, acompañantes y agricultores presentes.

IMPACTO AMBIENTAL DE LOS AGENTES DESFOLIANTES

ANÁLISIS DE RIESGO

- evaluación de riesgo
  (Directiva 91/414/CEE)
  Toxicología y Metabolismo
  Ecotoxicología
- GESTIÓN DEL RIESGO
- COMUNICACIÓN DEL RIESGO

FIGURA 1. *Objetivos a conocer para la aprobación, registro y comercialización de una sustancia química activa como herbicida, plaguicida o fitosanitario.*

EVALUACIÓN DEL RIESGO. TOXICOLOGÍA Y METABOLISMO

- Naturaleza/ Cantidad/ Ruta.
- Toxicocinética: absorción/ distribución/ acumulación/ excreción y metabolismo.
- Toxicidad aguda: oral/ percutánea/ inhalación.
- Irritación: piel/ ojos.
- Sensibilidad: piel.
- Toxicidad a corto plazo: oral 28 y 90 días.

FIGURA 2. *Ámbitos de estudio para la autorización, registro y comercialización de una sustancia activa*

EVALUACIÓN DEL RIESGO. TOXICOLOGÍA Y METABOLISMO

- Genotoxicidad: in vitro/ in vivo/ células germinales - DNA.
- Toxicidad a largo plazo y carcinogenicidad: test de carcinogénesis.
- Toxicidad de la reproducción: 2 generaciones /desarrollo/ teratogénesis.
- Otros estudios de toxicidad: metabolitos/ otras vías/ inmunotox/ neurotox.
- Datos clínicos: personal fábrica/ casos clínicos/ intoxicaciones accidentales agrícolas.

FIGURA 3. *Ámbitos de estudio para la aceptación, registro y comercialización de una sustancia activa.*

EVALUACIÓN DEL RIESGO. ECOTOXICOLOGÍA

- Aves: Toxicidad oral aguda y corto plazo (OCDE 206).
- Organismos acuáticos: T a peces/ T c peces/ T embr (OCDE210)/ bioconcentración peces (OCDE 305E)/T a y c invertebrados (OCDE 202,parte II)/ensayo algas /organismos del sedimento/ plantas acuáticas.
- Artrópodos: T a abejas (guía EPPO 170)/2 esp sensibles /ácaro predador-parasitario.
- Lombrices de tierra: T a/ efectos subletales.
- Organismos del suelo no específicos.
- Otros organismos no específicos (fauna y flora).

FIGURA 4. *•Ámbitos de estudio para la autorización, registro y comercialización de sustancias activas.*

Naturaleza química

El agente naranja había sido utilizado en EE.UU. desde los años 60 como herbicida, en fumigaciones de grandes extensiones agrícolas y posteriormente durante la guerra de Vietnam. Se aplicó con el objeto de eliminar la densa vegetación tipo selva, con numerosos matorrales, que escondía fácilmente y pasaban desapercibidos los soldados enemigos. Se transportaba en bidones de color naranja como se indica anteriormente y observa en la figura 5, algunas estructuras moleculares se observan en la figura 6.

FIGURA 5. *Medio de transporte de la «sustancia naranja» aplicada en Vietnam.*

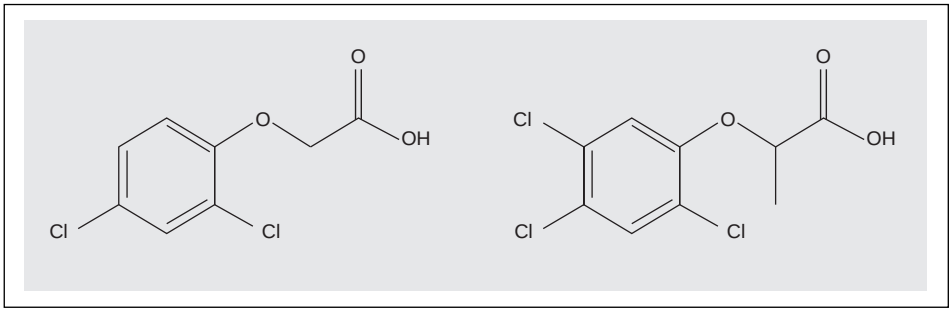


FIGURA 6. *Dicloro-fenoxi-acético y tricloro-fenoxi-propanoico.*

Epidemiología del agente naranja

El Comité encargado de gestionar y procesar información sobre efectos patológicos inducidos por el agente naranja, es el responsable de dis-

cernir si existe evidencia directa de efectos del agente naranja. Debe decidir, la existencia de interrelaciones entre diferentes trastornos y posibles agentes etiológicos implicados. Si existen otros problemas de salud incidentes, incluyendo trastornos de la reproducción y defectos de nacimiento, diferentes a la espina bífida, que pudieran atribuirse a la exposición del agente naranja. En ese sentido algunos estudios han mostrado una asociación entre la exposición al agente naranja y defectos de nacimiento en algunos sistemas del organismo. Un estudio realizado en Australia señaló la existencia de malformaciones y enfermedades en los niños de veteranos de guerra expuestos, que incluían el sistema nervioso central, el sistema óseo el sistema cardiovascular.

Tres estudios han sugerido la existencia de una asociación entre la exposición paterna a herbicidas y un aumento en el riesgo de presentar espina bífida. Estos son: a) el estudio sobre la experiencia adquirida en Vietnam, del Centro para el Control de Enfermedades (Center for Disease Control's Vietnam Experience Study); b) el estudio de efectos de nacimiento de CDC (CDC's Birth Defects Study), y c) el estudio Ranch Hand del personal de la Fuerza Aérea que participó en el programa de riego del y herbicida. Sin embargo, ningún estudio ha registrado todas las diferentes clases de defectos de nacimiento aportadas por 65.000 veteranos de guerra de Vietnam, quienes declararon ante la Corte de Justicia, la existencia de problemas de la reproducción durante la litigación del Agente Naranja.

En 1986, la ABDC (Association of Birth Defect Children) la Asociación de Niños con Defectos de Nacimiento, en colaboración con el Comité del Agente Naranja en Nueva Jersey, desarrolló un registro nacional para recopilar datos de interés toxicológico. El proyecto ha estado apoyado por donaciones de la Legión Americana, DAV y el Fondo de Ayuda a los Veteranos de Vietnam. El registro nacional de la ABDC sobre Defectos de Nacimiento y Problemas de Aprendizaje en las familias de los Veteranos de Vietnam actualmente tiene en su «base de datos» 1.800 casos de niños con defectos de nacimiento o incapacidades, comunicados por las familias de veteranos de la guerra de Vietnam. Los datos de dicho registro se han presentado al Comité de la Academia Nacional de la Ciencia y al Comité de Asuntos de los Veteranos (House Veterans's Affairs Committee). Se ha encontrado un patrón común de incapacidades pero se necesitan más casos.

Agente naranja y patología

En abril de 1995, la ABDC presentó datos sobre los hijos de 1.600 veteranos de Vietnam, al Comité de la Academia Nacional de la Ciencia, que recoge en un informe los efectos sobre la salud del agente naranja y su contaminante la dioxina. Los datos de la Asociación que aparecen en el Registro Nacional de Defectos de Nacimiento plantearon la posibilidad de que los hijos de los veteranos mostraban un patrón común de incapacidades consecuencia de haberse visto implicado el sistema inmune. Este patrón común incluía aumentos de infecciones crónicas y alergias; trastornos de la piel crónicos, problemas en el aprendizaje y atención, trastornos emocionales y de conducta; problemas de crecimiento, tumores, quistes, cáncer y otros síntomas de naturaleza inmunológica.

En 1995, la EPA (Environmental Protection Agency) Agencia de Protección Ambiental dio a conocer un informe de 200 páginas sobre la reevaluación de los efectos sobre la salud de la exposición a la dioxina. La EPA encontró que el sistema inmune y el sistema reproductor son los más sensibles a los efectos de la dioxina, y concluye que las alteraciones funcionales postnatales que implican la conducta, el aprendizaje y el desarrollo del sistema reproductor, parecen ser los efectos más significativos y sensibles a la exposición perinatal a la dioxina.

La exposición prenatal a la dioxina también causa una inhibición del desarrollo del timo. Esto puede inducir a una supresión de la función inmunológica a través de la alteración de las células T. La dioxina también puede causar cáncer a través de la supresión de la función inmune o promoviendo los efectos cancerígenos de otros compuestos. Incluso bajos niveles de exposición a la dioxina pueden tener como consecuencia un aumento de enfermedades bacterianas, virales, parasitarias y neoplásicas. El resumen agrega que el embrión humano puede ser muy susceptible de efectos a largo plazo de la función inmune por los efectos fisiológicos en los órganos sistémicos y en el útero de la TCDD (tetraclorodibenzo-p-dioxina, o «dioxina») y durante el desarrollo del tejido del sistema inmune.

La dioxina puede afectar las células embrionarias ectodérmicas durante el desarrollo del embrión, células que formarán mas tarde la piel, membranas mucosas, dientes y uñas. Algunos niños en la isla de Taiwan

que estuvieron expuestos a la dioxina antes del nacimiento, tienen trastornos en la pigmentación de la piel y en el crecimiento del cabello, dientes y uñas. Finalmente, presentan además un desarrollo psicomotor e intelectual disminuido.

La contaminación no se limita a las áreas de las inmediaciones de los accidentes, o focos de industriales de producción y polución, sino que, como otros agentes orgánicos persistentes son transportados a miles de kilómetros por medio de las corrientes de aire, y en consecuencia de convierten en contaminantes ubicuos globalmente en nuestro planeta. Si son agentes clorados afectan hasta la capa de ozono, siendo un grave peligro para el futuro de nuestro planeta. Actualmente todo ser humano contiene las moléculas que se liberan en cierta cantidad en alguna fuente de contaminación. La contaminación global es una realidad. Los animales silvestres se contaminan simultáneamente, y sus tejidos u órganos son un indicador de la contaminación humana. En las figuras 7 y 8 se relacionan los trastornos patológicos que induce el agente naranja, principalmente por sus impurezas o contenido en dioxinas, por ello se describirán en el apartado correspondiente a las dioxinas.

- Cloracné (durante el 1er año).
- Linfoma no-Hodgkin.
- Sarcoma en tejido blando.
- Enfermedad de Hodgkin.
- Porfiria cutánea tarda (en el 1er año).
- Mielona múltiple.
- Cáncer de vías respiratorias: pulmón, laringe, traquea y bronquios.

FIGURA 7. *Efectos crónicos de la sustancia naranja en veteranos vietnamitas.*

- Cáncer de próstata.
- Neuropatía periférica pasajera aguda y subaguda (en primer año y reversible en dos).
- Diabetes tipo II.

EN HIJOS DE VETERANOS DE GUERRA

- Espina bífida (no oculta).
- Otros defectos congénitos.

FIGURA 8. *Otros efectos patológicos de la sustancia naranja en veteranos de guerra vietnamitas.*

En la figura 9 se representa el espectro infrarrojo del compuesto 2,4,5-triclorofenoxiacético, y en la figura 10 el espectro de masas del mismo compuesto en la sustancia naranja. Mientras que en las figuras 11 y 12 se representan los respectivos espectros del compuesto 2,4-diclorofnoxiacético del agente naranja.

El agente naranja utilizado en EE.UU. antes de su aplicación como material de guerra en Vietnam, donde se requerían grandes cantidades de producto, era elaborado en pequeñas cantidades. Su petición para usos agrícolas era según demanda en pequeñas proporciones, y contenía impurezas en cantidad de 50 nanogramos dioxina/ Kg de producto comercial. Sin embargo, como producto para ser utilizado en la guerra contenía 50 microgramos dioxina/ Kg, es decir, tres órdenes de magnitud superior, lo que producía una contaminación mil veces superior que cuando era utilizado en fumigación como herbicida en agricultura. La diferencia estriba también, en que los aplicadores agrícolas van convenientemente protegidos, según Directivas y legislación vigente, mientras que en la guerra los tóxicos inciden directamente sobre las poblaciones humanas. La dioxina es el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (figura 13).

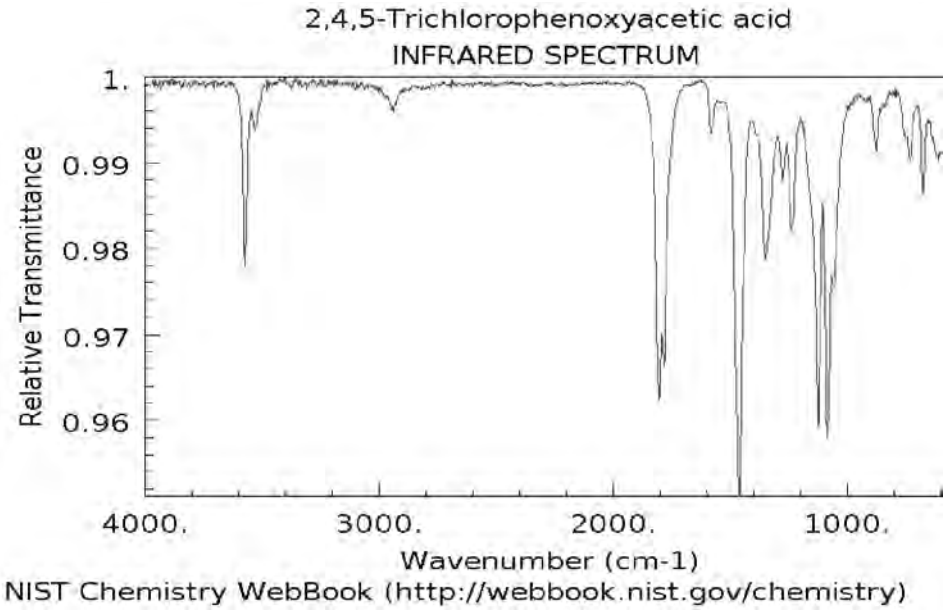


Figura 9. *Espectro en el infrarrojo de la sustancia naranja.*

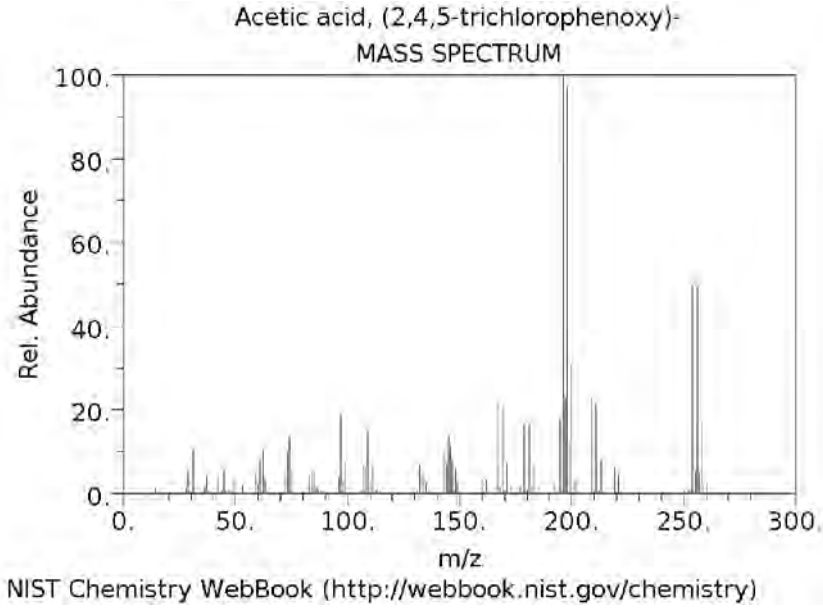


Figura 10. *Espectrometría de masas del agente naranja.*

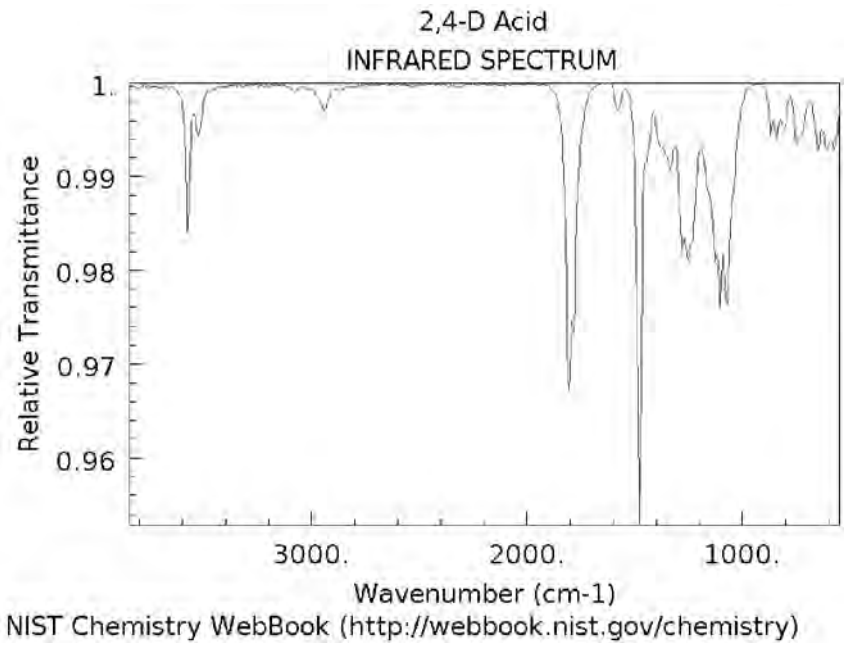


FIGURA 11. *Espectro infrarrojos del 2,4-D del agente naranja.*

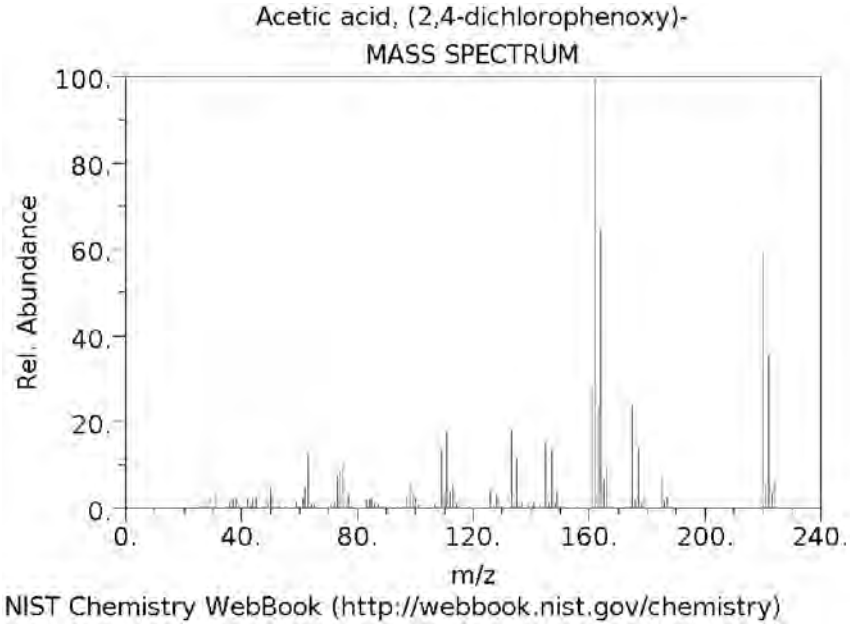


FIGURA 12. *Espectro de masas del 2,4-D, del agente naranja.*

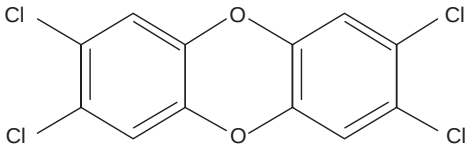


Figura 13. *Estructura molecular de la dioxina: tetracloro-dibenzo-dioxina.*

Efectos en la capa de ozono

Existen otros compuestos químicos liberados en procesos industriales diversos que contienen grupos clorados, y que liberan dioxinas y carbofuranos a la atmósfera, y que son tóxicos para el ecosistema y los seres humanos. Estos agentes tóxicos proceden de impurezas frecuentemente liberadas en incineradoras, papel procesado y su pulpa, de disolventes clorados, plásticos de polivinilos clorados y compuestos químicos clorados (organoclorados). Todos estos agentes tóxicos se hallan en mayor o menor cantidad en la dieta y en la cadena trófica, aire y agua de consumo, donde actúan como alteradores endocrinos, importante capítulo de la Toxicología. Actualmente existe conciencia plena para evitar la liberación de este tipo de compuestos clorados y consiguiente contaminación de los alimentos. Estos compuestos pueden alcanzar y afectar la capa de ozono, disminuyendo esta, con los consiguientes efectos en la biosfera.

Otros herbicidas de interés

Otros agentes tóxicos de interés en este capítulo son: al ácido cacodílico, agente blanco, es el ácido dimetilarsinico, es un herbicida en mezcla aproximada de 4:1, entre el 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) y el picloram. El picloram, que.como herbicida es el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico. El cacodilato de mercurio: $C_4H_{12}As_2HgO_4$, es un agente mercurial. El malatión, insecticida organofosforado, mutágeno causante de efectos genéticos. La vida media es de 8,7 años en seres humanos, e inhiben la actilcolinesterasa, enzima que actúa sobre la placa motora e impide la liberación de la acetilcolina, neurotransmisor de la motilidad, con parálisis nerviosa y muscular, por ello es un destacado insecticida.

Dioxinas

Son los compuestos clave en el agente naranja. Las dioxinas son compuestos sumamente tóxicos, de elevada vida media, persistentes, y bioacumulativos, es decir, se acumulan en las grasas de los seres vivos, como cerebro y médula ósea, pudiendo ejercer su efecto de forma crónica, durante largo tiempo. Estos son tejidos muy importantes para la vida, el primero para la regulación de las funciones de sistema nervioso, fisiológicas voluntarias y vegetativas, neuroendocrina, intelectuales y de relación, y el segundo responsable de la elaboración del tejido sanguíneo, la celularidad sanguínea, a partir de las células madre.

Su elevada toxicidad es a pequeñas dosis, y tiene efectos en la reproducción. Induce a malformaciones congénitas, abortos y conduce a fetos unidos dos a dos y tres a tres. Conduce a deformaciones y trastornos cancerosos, por tener efectos teratogénicos, mutágenos y carcinógenos en animales y humanos

Se trata por tanto de uno de los compuestos mas significativos para los seres vivos, porque se produce y libera a la biosfera en multitud de procesos industriales y domésticos, la dioxina mas tóxica es la tetracloro-dibenzo-p-dioxina. En piel induce a cloracné.

En Seveso, en el año 1976 la dioxina produjo cloracné, ceguera, quemaduras, defectos de nacimiento en los hijos de nacidos en la población circundante que sufrió los efectos, su vida media es de 6 a 10 años.

Son compuestos que se hallan normalmente en los sujetos sanos a concentración en suero sanguíneo de 20 partes por trillón, mientras que en los habitantes de Seveso se encontró a 1.800 partes por trillón en suero. La incineración produce dioxinas, asimismo en las incineradoras, barbacoas, estufas de leña, incineradoras municipales, se liberan cantidades significativas de dioxinas.

El accidente de la planta petroquímica de Seveso se produjo por rotura de la placa de seguridad, en la elaboración de 2,4,5-TCP con impurezas de 2,3,7,8-TCDD, liberándose una nube muy tóxica de los productos implicados.

Se estima que en el accidente de Seveso se liberó con la nube de gas, una cantidad aproximada de dioxina de 2 Kg. Los primeras medidas fueron limitar y aislar la zona y evacuar la población, prohibición de los alimentos agropecuarios circundantes, recogida de varios centímetros de suelo y su incineración. La cantidad, actividad biológica, persistencia y bioacumulación, son las cualidades que deben tenerse en cuenta en una intoxicación. Estas cualidades en las dioxinas, pueden hacerlas altamente peligrosas en función de su concentración. Posteriormente debe hacerse un diagnóstico del ambiente afectado y de los productos liberados.

Después de un accidente y agresión al medio natural se requiere una actuación armoniosa conjunta de todos los implicados, un entendimiento claro y constructivo para un desarrollo social y humano, y la restauración de las condiciones anteriores, y la cooperación en todos los ámbitos posibles sociales y políticos.

Control toxicológico y ecotoxicológico

Se aplican ensayos homologados de garantía de calidad, a vertidos, residuos, efluentes, tierra contaminada, aguas superficiales y freáticas, etc. Mediante protocolos legalmente establecidos. La tierra de somete a lixiviación. Se determina el efecto tóxico de las sustancias peligrosas vertidas y establece su CE_{50} (Environmental Concentration) y DL_{50} (Dosis Letal) con diversos ensayos. En la figura 12 se representan los ensayos mas frecuentes parra establecer la toxicidades, según normas ISO/EN 17.025 mas frecuentes en marcha en el Área de Toxicología Ambiental del Instituto de Salud Carlos III

El ensayo que utiliza la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*, figura 16), indicador biológico del medio ambiente terrestre, se aplica para determinar la toxicidad aguda de muestras contaminadas y agentes químicos de diversa índole, en dos tipos de ensayos: a). Por contacto sobre papel de filtro (método OCDE 1984, prueba 207); y en suelo artificial (Real Decreto 363/1995, anexo 5, parte C12) que se fundamenta en la absorción oral o cutánea, y se determina la CL_{50}.

BIOENSAYOS

ALGAS (*Scenedesmus subspicatus*).
DAPHNIAS (*Daphnia magna*).
PECES (*Brachydanio rerio, Oryzias latipes).
LOMBRICES DE TIERRA (*Eisenia foetida).
INSECTOS (*Parasarcophaga argyrostoma*).
(*Musca vetustissima).
(Aphodius).

ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

ENSAYO LÍMITE EN EL RATÓN (UP AND DOWN)
ENSAYO LÍMITE EN LA RATA

*** Algunos Ensayos según normativa ISO/EN 17.025; y otros aconsejados por la OCDE y UE en marcha en nuestro laboratorio.**

FIGURA 14. *Tipos de ensayos ecotoxicológicos.*

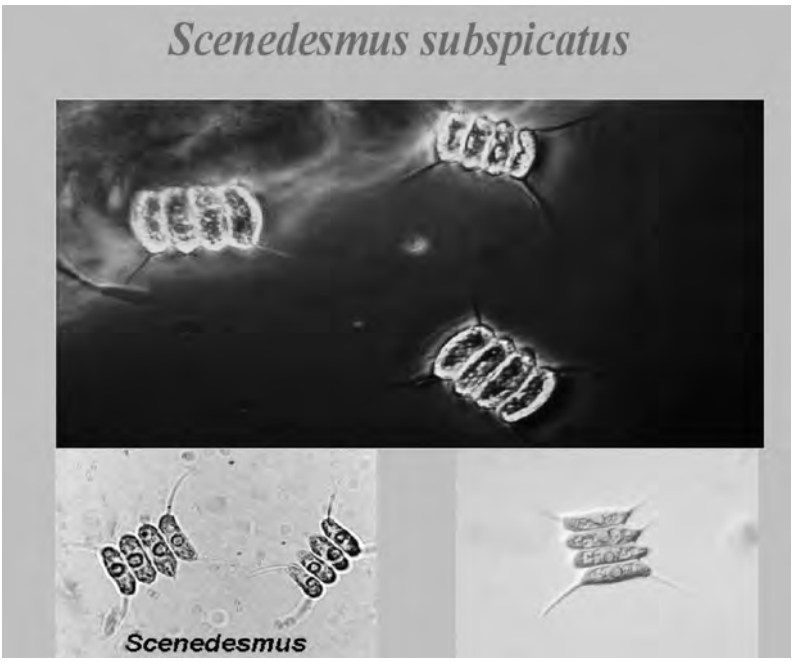


FIGURA 15. *Alga Scenedesmus subspicatus utilizada en el ensayo de toxicidad aguda de compuestos, residuos, vertidos, lixiviados.*

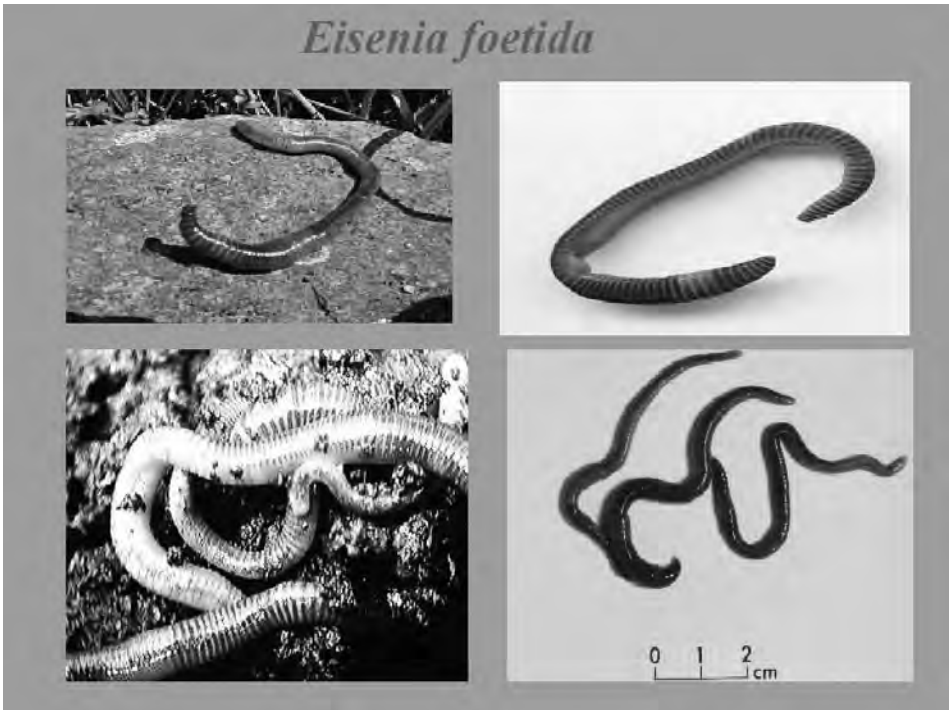


FIGURA 16. *Lombriz de tierra Eisenia foetida aplicada para ensayos de toxicidad sobre papel de filtro y en tierra.*

El ensayo en Daphnia utiliza la *D. Magna* (figura 17), crustáceo de agua dulce, utilizado como bioindicador de medio acuático, para compuestos de naturaleza diversa, y se valora la mortalidad después de su exposición a diversas concentraciones de las muestras durante 24 y 48 horas estableciéndose su CE_{50} (ISO 6341:1996/Cor.1:1998.

En peces se determina la CL_{50} en condiciones definidas (procedimiento estático) las concentraciones a las cuales una sustancia es letal para el 50 % de la población de ensayo con *Brachydanio rerio* (figura 18), en periodo de exposición de 96 horas (Ensayo ISO 7346-1: 1996).

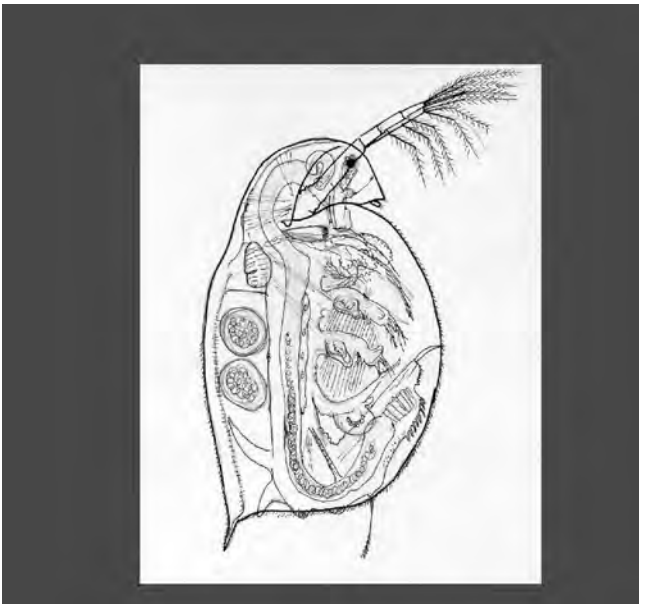


FIGURA 17. *Daphnia magna Strauss, utilizada en ensayos homologados de garantía de calidad para establecer la toxicidad de compuestos y sus mezclas, lixiviados.*

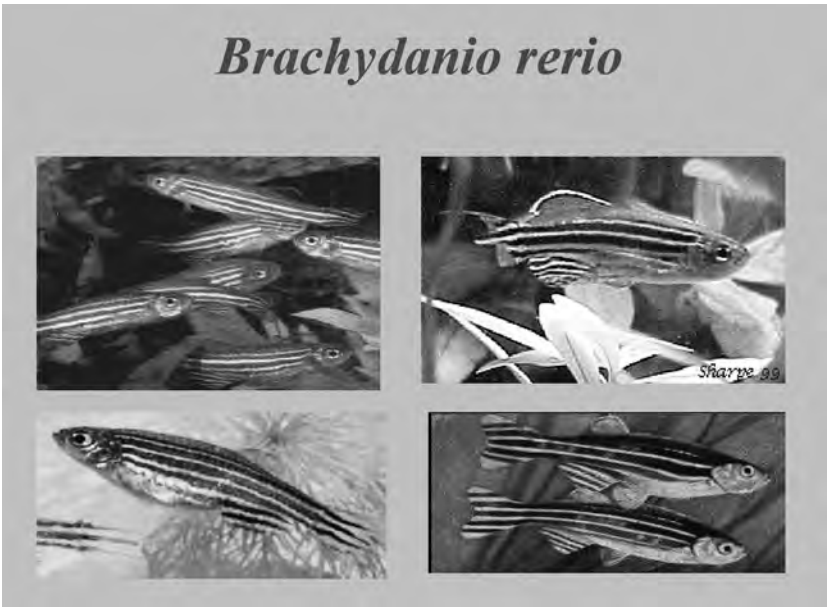


FIGURA 18. *Brachydanio rerio, Teleosteo, utilizado para ensayos en peces.*

Efectos patológicos

Al ser las dioxinas tóxicas, persistentes y bioacumulativas, ejercen su poder tóxico en los tejidos animales y humanos. Sus niveles en las poblaciones y en el medio ambiente en general, y en particular en las regiones industrializadas, han aumentado sensiblemente desde los años setenta, por la utilización intensiva de los plaguicidas clorados y otros productos químicos y sus residuos. El agente naranja que contiene dioxinas ejerce su efecto, y también las incineradoras las liberan a pesar de su avanzada tecnología, no resuelven el problema a largo plazo, se liberan lentamente de las cenizas. Son transportadas a miles e kilómetros por medio de las corrientes de aire y se dispersan globalmente. Todo hombre, mujer y niños del planeta contienen actualmente dioxinas. Están clasificadas como carcinógenas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Se unen al receptor Ah y afecta a varios genes. En las figuras 7 y 8 hemos representado los efectos mas destacados del agente naranja, y que se deben primordialmente a las dioxinas que contienen.

Las dioxinas se han clasificado como carcinógenos clase 1 por la Agencia Internacional del Cáncer (en humanos). Los efectos sobre el sistema inmune se relacionan con la supresión de la inmunidad humoral y la mediada por células, e incremento de la susceptibilidad a procesos infecciosos y respuesta autoinmune. En el sistema reproductor masculino se han mencionado la reducción del número de espermatozoides, atrofia testicular, reducción del tamaño de los órganos genitales, respuesta hormonal feminizada así como respuesta conductual feminizada. En el femenino se describen disminución de fertilidad, incapacidad de la continuación del embarazo, disfunción ovárica, y endometriosis. Se han señalado efectos sobre el desarrollo por la incidencia de abortos, defectos al nacer, retraso en el desarrollo neurológico y neuroendocrino. Se muestran asimismo como alteradores endocrinos e inhibidores de factores de crecimiento, alterando el metabolismo de las hormonas esteroides y sus receptores (andrógenos, estrógenos y glucocorticoides), hormonas tiroideas; insulina; vitamina A; TGF-a y TGF-b; TNF-a; IL-1b; c-Ras, etc. Presentan toxicidad en órganos sistémicos: hígado, páncreas, bazo, timo, piel y otros órganos.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ALLSOPP, M.; ERRY, B.; STRINGER, R.; JOHNSTON, P. AND SANTILLO, D.;(2000) Recipe for disaster: A review of persistent organic pollutants in food. Greenpeace Research Laboratories. ISBN 90-73361-63-X.

(2) ARNOLD SCHECHTER, EDITOR.; (1994) Dioxins and Health. New York: Plenum Press.

(3) ASPELIN, A. L.; (1994) Pesticides Industry Sales and Usage. 1992 and 1993 Market estimates. Washington DC.U.S. Environmental Protection Agency, June.

(4) BUKOWSKY, J. H. AND MEYER, L.W.; (1995) *Simulated air levels of volatile organic compounds following different methods of indoor Insecticide application. Environ. Sci. Technol., 29,* 673-676.

(5) LERDA, D. AND RIZZI, D.; (1991) *Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mutation Res., 262,* 47-50.

(6) MCGREGOR, D. B.; PERTENSKY, C.; WILBOURN, J. AND RICE, J. M.; (1998) *An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. Environ. Health Perspect., 106, (Suppl. 2),* 755-760.

(7) MONTAGE, P.; (1990) *Human health effects associated with exposure to herbicides and their associated contaminants – chlorinated dioxins. Washington DC, National Veterans Legal Services Project, April* 1990.

(8) SWEENEY, M. H. AND MOCARELLI, P.; (2000) *Huam health effects after xposure to 2,3,7,8-TCDD. Food Additives and Coontaminants, 17,* 303-316.

(9) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994); Estimating exposure to dioxin-like compounds. Vol II, Properties, Sources, Occurrence and Background exposures. EPA/600/6-88/005Cb June 1994. External Review Draft. Washington, D.C. U.S.

(10) WEBSTER, T. AND COMMONER, B.; (1994) *Overview: The dioxin debate. In: Schecter A. (Editor). Dioxin and Health, Plenum Press,* pp 1-32.

Agresividad bacteriana y Bioterrorismo

JUAN DEL REY CALERO
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina

BIOTERRORISMO

Definición

Según el CDC, se define como «la liberación intencionada de microorganismos o sus toxinas, con el propósito de dañar o matar a una población, siendo considerados como vehículos potenciales de transmisión aerosoles, alimentos, agua o insectos». Puede ser de *tipo estratégico* empleando microorganismos con gran mortalidad, y de *tipo operacional* de menor mortalidad pero de gran impacto económico, pánico etc. Las armas biológicas se caracterizan por su elevada potencia, fácil accesibilidad y distribución.

Armas biológicas

Estas pueden ser microorganismos naturales, salvajes o genéticamente modificados, capaces de producir morbilidad, mortalidad o incapacidad.

También se emplean productos de su metabolismo, BDBS(Biological Derived Bioactive Substances), como pueden ser Toxinas, Neuropeptidos, Citokinas, y las denominadas Artificial Designed Biological (Mimicking Substances), que actúan en los receptores.

Las características **son:**

1. Su alta infecciosidad como ocurre en la Viruela, o con una mínima cuantía de producto como la Toxina botulínica.

2. Fácilmente dispersables.
3. Capacidad de ser producidos en gran cuantía.
4. Estabilidad en el almacenamiento.
5. Resistentes a las condiciones ambientales.
6. Resistentes a los tratamientos por antibióticos, anticuerpos o fármacos.

Se reconocen principalmente 4 enfermedades infecciosas como agentes potenciales de Bioterrorismo: Carbunco, Toxinas botulínicas, Peste y Viruela. Pero también hay otros agentes potenciales, como pueden ser entre los Virus: las Fiebres hemorrágicas, las Encefalitis virales, los Filovirus (Ébola y Marbung), Arenavirus (fiebre de Lassa), entre las Bacterias: Franciscella tularensis, Brucellas, Fiebre Q, enterototina estafilocócica, Clostridium perfringens, Shigatoxina, Aflatoxina de Aspergillus flavus etc. También hay toxinas como la Ricina (que destruye las mitocondrias), la Abrina, la Conotoxina, la Saxitoxina, Tetradontoxina, T2 Toxina (micotoxinas, terpenos) Diacetoxycirpenol. Según el CDC podemos clasificar a los agentes seleccionados en agentes biológicos, Toxinas o vectores que tienen:

a) Capacidad de producir infecciones o muertes.

b) Que producen deterioro y contaminación de alimentos

c) Contaminación de agua o equipos.

d) Contaminación ambiental.

Los microorganismos seleccionados pueden ser recombinantes o genéticamente modificados como Bacterias, Virus o Toxinas. El potencial agresivo depende del periodo de incubación de la Virulencia del germen, y de la letalidad. Se clasifican en Categoría A, B, C.

Aspectos epidemiológicos

Desde el punto de vista epidemiológico hay que establecer la ***Tasa reproductiva básica*** de una epidemia, que determinan la diseminación de un agente infeccioso en la población. Depende de 3 factores: **a)** El Ries-

go de transmisión por exposición o tasa de ataque. **b)** La frecuencia de exposición por unidad de tiempo. **c)**La Susceptibilidad de la población de la población.(B). Así pues teniendo en cuenta el tiempo de Adquisición (A) de la enfermedad, y la Duración (D) de la protección por los Anticuerpos por ejemplo maternales. La tasa reproductiva básica es **Ro=B/(A-D).**

Cuanto más bajo es **Ro** mayores son las posibilidades de erradicación de la Enfermedad infecciosa. Para la Viruela el **Ro** es 2 a 4, la Polio de 5 a 7, el Sarampión de 12 a 18.

También se pude considerar el **Ro= β CD,** en que β es la probabilidad que un individuo contagie a otro, dependiendo del número de Contactos (C), y de la Duración de la enfermedad (D).

Breve Historia del Bioterrorismo

Podemos considerar algunos acontecimientos que marcaron la utilización de dichos agentes biológicos. En algunas epidemias como las de Peste acabaron con gran parte de la población, como la ocurrida en el 541 a JC en Egipto y Norte de África que acabó con el 60% de la población, o la de Europa en 1346, que causó la muerte de unos 20 a 30 M de personas. En 1346 durante el asedio por los tártaros de Kaffa en Crimea, se arrojaban cadáveres infectados a través de las murallas de Reval.

En 1763 el capitán americano Ecuyer repartió mantas impregnadas de Viruela entre los indios afines franceses, y en 1767 el general inglés Sir Jeffrey Amhers hizo lo mismo entre dichos indios con lo que consiguió la victoria en Fort Carrillon. Durante 1860-65 los confederados utilizaban cadáveres de animales en putrefacción para empozoñar las aguas de los pozos, según las memorias de W. T. Sherman. Napoleón en el sitio de Mantua, aprovechó las bajas que causó la fiebre de los pantanos en 1797.

Según las alegaciones contra los alemanes en la Primera Guerra Mundial 1914-17, éstos intentaron extender el Cólera en Italia, la Peste en San Petersburgo, y tirar bombas biológicas en U. K.. En 1932 los japoneses utilizaron este procedimiento en la guerra de Manchuria, y en 1936 se construyeron allí complejos para la experimentación con armas biológi-

cas, Peste, Cólera, Carbunco. Habiéndose producido muertes al expandirse tales organismos. En 1940 los japoneses utilizaron la Peste en Cushien, causando muertes, de modo análogo en Nippo, en Chinchua y en Suiyuan en 1941.

En 1941-43 el ejército americano establece los centros experimentales para armas biológicas en Camp Detrick. En la guerra de Vietnam, los vietcong utilizan trampas con estacas contaminadas en 1960. En 1972 la secta del Sol Naciente esparce cultivos de Tifoidea para contaminar las aguas en Chicago, San Luis etc. En 1972 se crea la Convención contra las armas biológicas.

De 1975 al 83 en Laos y Kampuchea, por medio de helicópteros se esparcen aerosoles de «yellow rain» sobre la población con micotoxinas T2. en 1978 el búlgaro exiliado G. Markov se le ataca en Londres con un paraguas impregnado de Ricina, consiguiendo asesinarlo. En 1979 acaece la explosión en el complejo militar ruso de Sverdlovsk declarando 40 muertes pero pudieron ser más de 1000 por esporos de Carbunco. En 1984 la secta india de Rajneeshee contamina las ensaladas en Dallas con Salmonella typhimurium. En 1995 el General Hussin K. Asan, evidencia el desarrollo y almacenamiento en Irak de Toxina botulínica, Carbunco, Aflatoxina, dispuestas para ser lanzadas por mísiles. En 1995 en 10 ocasiones pretende Aun Shinrikyo dispersar Toxina botulínica, Fiebre Q, virus de Ébola en Japón.

Desde 2001 se han utilizado envíos y cartas postales contaminadas con esporos del Carbunco, y el CDC en este año reportaba 21 casos de Carbunco por dicho medio.

Aspectos de la genética microbiana

La genética microbiana ha supuesto un gran avance para entender el genoma y los procesos genéticos en otros organismos más avanzados. El dogma central de la Biología molecular viene expresado:

Estamos en el 50 aniversario del descubrimiento del DNA, que forman las estructuras de los genes y su funcionalidad (genoma). Los genes expresan la síntesis de proteínas, formados por aminoácidos, que determinan su estructura y función(proteoma). Cada secuencia de 3 bases (triplete) constituye la palabra del código o codón, así GAC corresponde a la leucina, CAG a la valína etc. Una proteína pues con 100 aminoácidos quedaría codificada por un segmento de 300 nucleótidos del DNA.

La **Adaptación** es un cambio no permanente en determinadas circunstancias ambientales, de nutrientes etc. La **Mutación** es un cambio permanente que se hereda en la progenie, y se realiza en las 3 bases del *codón* del DNA. Los mutágenos más frecuentes son la sustitución de bases análogas en el codón, con lo que se traducen aminoácidos diferentes, sustancias químicas que cambian o remueven las bases durante la replicación. Radiaciones como los RX que rompen puntos de las hélices del DNA, o RU que realiza dimeros de Timina T-T, con lo que la polimerasa comete errores de lectura.

Por mutación se alteran los sitios diana para los Antibióticos como pueden ser la Resistencia a la Estreptomicina en rDNA(rosL), la Resistencia a los beta lactámicos por cambios en las PBP (penicillin binding protein), o reducir la permeabilidad de las porinas bacterianas, por alterar los pasos metabólicos, como la superproducción de DHF dehidrofolato, en la Resistencia al Trimetoprim, o por alteración en los sistemas de eflujo.

Los intercambios de material genético bacteriano, que permite promiscuas transferencias genéticas horizontales, se realiza fundamentalmente por 3 mecanismos:

— **Transformación:** en que el DNA desnudo de otros microorganismos vertidos en el medio, es absorbido por la bacteria en fases de replicación, con lo que esta toma características de aquella. Dicho fenómeno fué descrito por Griffit en 1928, reconociendo Avery, McLeod McCarty, que era debido a la absorción de DNA, con lo que consiguen que una cepa rugosa R viva pueda adquirir de una cepa muerta por el calor el gen que produce la cápsula del Neumococo, con lo que se convierte en S y se hace patógena.

— **Transducción:** el DNA se inyecta en la bacteria a través de un fago, con que adquiere nuevas propiedades, por ejemplo la capacidad de producir toxinas como sucede en el Corynebacterium diphtheriae, o la toxina botulínica C, la toxina eritrogénica del Esteptococos, algunas Salmonellas codifican Antígeno O por este mecanismo.

— **Conjugación:** intercambio de materias genético entre bacterias puestas en contacto a través de pili, como los plásmidos de fertilidad F(el dador es F+, la receptora F–) de alta frecuencia de recombinación Hfr, lo que consiguieron Lederberg y Tatum de la Universidad de Yale con el E.coli cepa K12 en 1946. Oros plásmidos producen la resistencia antimicrobiana R, la capacidad de producir toxinas y otros mecanismos de virulencia.

Los plásmidos son muy importantes porque están constituidos por DNA generalmente en forma de anillo de menor tamaño, pues tienen de 1000 a 25000 bases frentes a los 4 millones de genoma bacteriano, capaces de integrarse en el, o permanecer en el citoplasma, con capacidad de manifestar cualidades específicas, como los pili en E.coli, produciendo factores de virulencia: **a)** ***Toxinas*** como las enterotoxinas en el E.coli, los Col que producen colicinas, hemolisinas en Gram negativos, las toxinas del Carbunco, Vibrio cholerae, neurotoxina del Cl .tetani y toxina del B.thurigiensis etc. **b)** mediante ***Adhesinas*** por plásmidos en la Yersinia eneterocolítica y Y. Pestis, Shigella flexneri, y E.coli. **c)** ***Factores de crecimiento y con capacidad metabólica***, con los que la bacteria puede competir con células de mamífero, como el plásmido Col V del E.coli que puede competir secuestrando iones de hierro, que es esencial para el E.coli cuando parasita a dichas células. **d)** ***Capacidad de Resistencia ante los antimicrobianos*** como los R que resisten a los Antibióticos o el R-100 que lo hace a las Sulfonamidas, Estreptomicina, Spectinomicina, Cloramfenicol, Tetraciclinas. **e)** ***Con capacidad de producir fimbrias*** y posibilidad de adherirse y ejercer patogenicidad.

Los **transposones Tn**, descritos por Bárbara McClintock premio Nobel como «jumping genes», son secuencias de DNA de unos 750 pares de bases, provistos de IS (secuencias de inserción), que tienen una alta capacidad de movilizarse, y codifican productos adicionales y tienen la capacidad de transmitir Resistencias.

Integrones son los sitios específicos para la integración de elementos, por medio de una integrasa, análoga al fagλo _, los integrones son como casettes capaces de aceptar secuencias determinantes de las Resistencias etc.

La ingeniería genética consiste en la manipulación del DNA, mediante la actuación de enzimas de restrinción que son capaces de cortarlo en determinadas secuencias de nucleótidos y de ligasas que son capaces de reunir los fragmentos. Es importante la actuación de ciertos vectores que pueden autorreplicar parte del DNA, independientemente del DNA de la célula huésped. La *terapia génica* consiste en la aportación de un gen funcional a las células que carecen de él y como consecuencia padecen una anomalía o enfermedad. Esta terapia puede ir dirigida a las células germinales, sólo de carácter experimental, o la dirigida a las células somáticas, introduciéndose el gen deficitario mediante un plásmido o vector, lo que supone un gran potencial. Un gen introducido en una bacteria puede producir insulina, o el Factor VIII de la coagulación necesario a los hemoifílicos. También se pueden obtener vacunas recombinantes como la producción del Antígeno superficial de la Hepatitis B(sHBV).

Los peligros derivados son el que se pueden introducir genes que suponen riesgos como virus infecciosos o que produzcan cáncer con el DNA recombinante, por lo que se requiere un estricto control.

AGRESIVIDAD BACTERIANA

En cuanto a la capacidad agresiva de las bacterias, podemos destacar tres aspectos fundamentales. En primer lugar ***los mediadores de la inflamación en relación con el endotelio,*** (en 4 familias: *las enzimas plasmáticas*(cascada de las Kininas, sistemas de coagulación y fibrinolítico, plasminas), las *citiokinas* (I1, 1, 6, 8, TNFα), *quimioquinas* (MIP 1.ª, b proteinas inflamatorias de macrófagos), *lípidos inflamatorios* (ácido araquidónico, lisoPAF de las plaquetas) etc.

En un segundo apartado **las moléculas de adhesión,** que son proteínas localizadas en las membranas celulares, dependiendo de su estructura se organizan en diversas familias: selectinas, similares a la mucína, globulinas, integrinas etc, como tan precisa y científicamente nos ha des-

crito. Las ***adhesinas***, en su mayoría como lectinas son sialoconjugados. Estos sialo-conjugados con capacidad hemaglutinante, que fueron descritas como manosa especificas o hemaglutininas y que se definen como FMH en los E.coli tipo I, y las que se ligan al ácido siálico SHAs, pueden estar además del E.coli uropatogénico y enterotosigénico, en Pseudomonas, Brodetellas, H.pylori y tantos otros. Es muy importante como las células bacterianas aprenden a reconocer en las células eucariotas a los receptores, con capacidad de activar el 2.º mensajero. El papel de los receptores juega pues un papel determinante en el anclaje de los microorganismos. También los virus tienen tal capacidad de adhesión y de hemaglutinación. Los Coronavirus, ahora con un especial protagonismo reconocen como receptores el Antígeno carcinoembrionario, las aminopeptidasas y también residuos de ácido siálico, casi un receptor universal.

Las *integrinas alfa y beta*, se han caracterizado las ICAM 1, 2, 3, VCAM, MadCAM, FeCAm etc. Hay que destacar que se ha pretendido hacer vacunas con pili, ya que la bacteria carece de ellos como ocurre en el Gonococo no puede fijarse al epitelio y ejercer su patogenicidad. También se ha pretendido con el CAM 99 para ciertos E. coli en patología veterinaria, pero como nos ha explicado muy bien dada su variabilidad carecen de efectividad.

Un tercer aspecto a comentar los **factores de virulencia**, como las cepas uropatógenas del E.coli, en que la alfa hemolisina (Hly), los factores necrosantes citóxicos tipo 1 (CNP 1). Las hemaglutininas S o R a la manosa, que actúan o no en presencia de una solución de manosa, como la MRHA III, IV a, b expresadas en cepas P fimbriadas o P relacionadas. Los diferentes serogrupos del E. coli más frecuentes en estos procesos suelen ser los serogrupos 2, 4, 6 etc. Otros factores de patogenicidad son las LPS endotoxinas, la cápsula *k*, los Antígenos de las pared.

El **sistema de comunicación** de las bacterias se realiza por medio de señales químicas que ellas generan, denominadas autoinductores (AI), lo que les permite coordinar actividades favorables de simbiosis, que permiten sinergias o por el contrario adversas, y participan en la densidad poblacional. Esta sensibilidad *a quórum* de las bacterias depende de un sistema de señalización como es el AHL (acil-homoserina lactona) utilizada por los Gram negativos. Cuando hay producción de moléculas

señalizadoras. Se unen a un activador transcripcional (o proteína R) que induce la expresión de genes específicos. La traducción de esta señal puede dar lugar a la producción de un biofilm o matriz polimérica capaz de ser adherente a superficies inertes o vivas, como en las Pseudomonas. Ello permite además la capacidad de impedir la difusión de Antibióticos, la supervivencia de los microorganismos reducidos de Susceptibilidad de los fenotipos bacterianos envueltos en el biofilm. El conocimiento de estos sistemas de comunicación inter-bacterianas supone un nuevo replanteamiento en la lucha contra estas infecciones, para interferir estos AI.

Convenciones internacionales frente al Bioterrorismo y armas de destrucción masiva (WMD-weapon mass destruction)

Sometidos a tratados internacionales podemos destacar la referncia del Protocolo de Ginebra de 1925. en 1972 se crea la Convención contra armas biológicas.

La convención de prohibición, desarrollo, producción y almacenamiento de productos biológicos y toxinas como armas biológicas de 1992, y en el mismo año sobre Diversidad Biológica. En el 2000 en Cartagena el protocolo de Bioseguridad, y en el mismo año la Convención de Diversidad Biológica. El grupo de los 8 se reunió en Okinawa en Mayo del 2000, meses después de la Conferencia de San Diego sobre Bioterrorismo en que se señalaron los países que poseen depósitos de gérmenes letales, como Corea del Norte, Irak, Irán, Rusia, Siria, Libia y otros. También tuvo lugar el 2.º Simposium sobre Bioterrorismo en Washington. El CDC toma el liderazgo para contrarrestar un ataque bioterrorista. El Grupo de los 7 (Canadá, EE.UU., Alemania, R.U., Francia, Italia, Japón y México) con el Comisario Europeo de Salud noviembre 2001 en Ottawa establecieron un programa para mejorar la seguridad y asistencia sanitaria frente a las amenazas del Bioterrorismo. El Consejo Europeo de la U. E. en Gante (octubre 2001) decidió preparar un programa para mejorar la cooperación entre los Estados en materia de alerta, evaluación de riesgos y detección e identificación de agentes infecciosos y tóxicos, así como la prevención y tratamiento ante los ataques químicos y biológicos.

Categorías, Agentes seleccionados y Medidas a tomar

El problema de combatir el Bioterrorismo se debe atacar en muy diversos frentes políticos, militares y policiales, judiciales científicos y técnicos, en que se destaca la Cooperación internacional y el coordinar esfuerzos. En cuanto al aspecto científico-técnico se incluye la monitorización y prognosis por Comités de Expertos del riesgo posible, y de los efectos colaterales «dual use-side effects», cuando se emplean organismos genéticamente modificados, toxinas biorregulares etc. se requiere pues Laboratorios de referencia, dotados de altas medidas de Bioseguridad.

Desarrollar sistemas para la identificación rápida de los patógenos específicos, en Laboratorios de campaña para la toma de muestras que puedan acudir a los de referencia de los 31 organismos que la OTAN considera como potenciales armas biológicas destacan la Viruela y el Carbunco.

Según los patógenos aislados se pueden clasificar en ***las Categorías A, B, C*** del CDC 1998, según que sea de mayor, medio o bajo grado de infecciosidad:

La Categoría A se transmite fácilmente de persona a persona, causan altas tasas de mortalidad, originan gran pánico, requieren un dispositivo alto de control sanitario.

La Categoría B son de fácil o moderada difusión, de moderada morbilidad y baja mortalidad, requieren incrementar la Vigilancia epidemiológica.

La Categoría C son patógenos emergentes, de fácil producción y diseminación, y de incremento en el potencial de Morbilidad y Mortalidad.

En la Categoría A está el Carbunco, Botulismo, Peste, Tularemia, Viruela, Fiebres hemorrágicas como el Ébola, Marburg, Lassa y Fiebre hemorrágica argentína. En la Categoría B se encuentran las Salmonellas sp. Shigella dysenteriae, E.coli O157H7, Vibrio cholerae y Cryptosporidium parvum. En la Categoría C, Virus Nipah, Virus de las fiebres hemorrágicas y encefalitis transmitidas por garrapatas y otros microorganismos potenciales como la Fiebre amarilla, Mycobacterium tuberculosis multiresistentes, Neigleria etc.

La capacidad de transmisión es alta para la Viruela, se estiman de 10 a 100 gérmenes la dosis infecciosa con un periodo de incubación

de 12 días (7-17); para la Peste es de 100 a 500 gérmenes y el periodo de incubación de 2 a 3 días. Es moderada la transmisión de Fiebres hemorrágicas virales, requieren de 1-10 gérmenes, (para la EEV de 10 a 100) y el periodo de incubación es de 4 a 21 días; el Cólera de 10 a 500 gérmenes y su periodo de incubación de horas a 5 días; la Fiebre Q de 1 a 10 gérmenes y el periodo de incubación de 10 a 14 días.

La lista de ***agentes seleccionados*** por ser: a) microorganismos genéticamente modificados, b)por contener secuencias asociadas a alta potogenicidad, c) contienen secuencias que codifican toxinas o sub-unidades tóxicas.

Como medidas a tomar en la población afectada (las oportunas medidas de control):

— Disponer del Aislamento y tratamiento de los enfermos en los Hospitales (dotados para los enfermos requeridos de habitaciones de presión negativas con filtros HEPA). En cuanto a los sospechosos y los contactos la posibilidad de medidas cuarentenarias. Disponer de medidas postexposición, recomendar barreras de protección, desinfección y esterilización.

— Adecuadas medidas de disponibilidad de medicamentos Ciprofloxacino etc. en el Carbunco, Inmunoglobulinas antibotulinicas, antivariolosa etc. y vacunas en los casos posibles de estrategias de vacunación, para la vacunación antivariólica (las cepas LC16m8 y MVA), con prioridades entre el personal sanitario, policías, personal militar, bomberos etc.

— Establecer sistemas de vigilancia epidemiológica y sistemas de geo-información.

— Es fundamental educar e instruir a la población, evitar el pánico, pues no hay que olvidar los aspectos psicológicos, comunicar información sin alarmismo sobre las medidas imprescindibles a tomar. En nuestro país las autoridades sanitarias han extremado la vigilancia en previsión de dichos ataques, así como establecer una reserva de Antibióticos y medicamentos necesarios para hacer frente a los mismos.

El **Terrorismo asimétrico** se refiere tanto al *terrorismo biológico* mediante agentes microbianos o sus productos, que puede ser de tipo

estratégico con gran mortalidad y *operacional* con menor nivel de mortalidad pero que incapacitan, suponen un grave daño económico para la agricultura etc., de gran impacto. También se refieren al *Terrorismo cibernético*, que es un ataque contra los sistemas informáticos y de telecomunicaciones, con el objetivo de destruir información e interrumpir los Servicios básicos de la comunidad. Cualquier país con no muy avanzada tecnología puede desarrollar este tipo de armas biológicas.

Medidas especiales

Cuando se conoce el microorganismo y el medio de difusión se toman las medidas específicas y demás medidas de vigilancia y control. Cuando se remiten paquetes o cartas sospechosas, hay algunas características que las convierten en sospechosas, como pueden ser direcciones escritas a mano o mal escritas, sin dirección de remitente, manchas, demasiado peso, o con más peso de un lado, aviso de restricciones como «confidencial», «personal», el estampillado del sello no coincide con la ciudad del remitente etc.

En dicho caso no abrir el sobre, introducirlo en una bolsa de plástico resistente, salir del cuarto, cerrarlo y llamar a los Servicios de Seguridad. Si se hubiera abierto no tratar de limpiar el polvo, cubrirlo de inmediato, salir y cerrar la puerta, advertir de no-entrada. Apagar el sistema de ventilación del edificio para evitar los posibles aerosoles. Lavarse las manos con agua, jabón o detergente, quitarse las ropas introducirlas en una bolsa de plástico, ducharse, avisar a la policía local, Seguridad etc.

En fin, una vez detectado el agente involucrado, se tomarán las medidas específicas contra el agente etiológico, control de todas las personas que han tenido contacto con el mismo. Emplear quimioprofiláxis, vacunación o aislamiento si procede. Se requieren pues medidas a gran escala incluso con posterioridad al ataque experimentado donde el aunar esfuerzos es imprescindible y no bajar la guardia, exigiendo la máxima colaboración de todos y la Cooperación Internacional.

BIBLIOGRAFÍA

(1) AGASSI, J.(1998) *Science real and ideal: Popper and the dogmatic scientist. Protosociology, 12:* 297-304.

(2) AGRES, T. (2002) Bioterrorism projeet boost US research budget The Scientgtist, 16(6): 26.

(3) ALONSO FERNÁNDEZ, F. (2002) *Aspectos psiquiátricos del terrorismo An RANM (4º):* 579-614.

(4) *Biological Terrorism: preparing to Meet the Threat JAMA* (1997); 278: 428-30.

(5) BRAD ROBERTS BIOLOGICAL WEAPON (1993) Weapon of the future Center for Strategic and Intern Studies.

(6) BUSH, V. (1945) Science the endless Frontier ArnoPress New York.

(7) CDC (2000) Biological and Chemical Terrorism Strategic Plan for Preparedness and Response Recommendation of CDC Strategic Planning Workgroup MMWR 49: RR4.

(8) CDC (1996) Prevention of Plague Recommendation Acip, MMWR 45 (RR14): 1-15.

(9) CDC (1998) Management of patients with viral hemorrhagic fever. MMWR, 37 (n.º 5-3).

(10) CDC (1990) Update Ebola related filovirus infection in non human primates and interim guidelines for handing…» MMWR, 39: 22-24, 29-30.

(11) CDC/NIH (2000) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 4. ed Dep Health and Human Saervices Washington.

(12) CDC (2000) Use of the Anthrax vaccine in the USA Recommendation ACIP MMWR 49 (R15) 1-20.

(13) *Clinical recognition and Management of patients exposed to biological warfare agents. JAMA (*1997) 278: 399-411.

(14) COLE, L. A. (1996) The spectre of biological weapon Sc Am; 275: 60-5.

(15) FREEMAN, H. AD CO. (1996) The eleven plague: the politic of Biological and Chemical Warfare.

(16) COSTERTON, J. W. et al. (1998) *A common cause of persistent infections. Science, 284*: 1318-22.

(17) CHRISTOPHER, G. W. ET AL. (1997) *Biological warfare. A historical perspective. JAMA 278(5)*: 412-17.

(18) DAVIES, D. G. et al. (1998) *The involvement of cell to cell signals in the development of bacterial biofilm. Science 280*: 295-8.

(19) DE KIEVIT, T. R. ET AL. (2000) *Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. Infection and Inmunity, 68*: 4839-49.

(20) DEL REY CALERO, J.(1980) Microbiología e Inmunología de las Enfermedades infecciosas, 2ª edición Ed. Marban. Madrid.

(21) DEL REY CALERO, J; HERRUNZO, R.; RODRÍGUEZ ARTALEJO, A.; (1996) Fundamentos de Epidemiología Clínica. Ed. Síntesis.

(22) DOMÍNGUEZ CARMONA, M. ET AL. (2001) *Bioterrorismo. An RANM*.

(23) GESTAL OTERO, J. J. (2003) Riesgos laborales del personal sanitario. 3 ed Mc Graw Hill- Interamericana. Cap 34. 497-510.

(24) INSTH (2003) Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a riesgos biológicos. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Madrid.

(25) LOPEZ IBOR, J. J. (2002) *Sicopatología de los desastres y catástrofes. An RANM (3º)* 489-506.

(26) MANDELL; DOUGLAS; BENETT; (2000) Principle and Prectice of Infectious Dioseases 5ed. Churchill-Livingstone.

(27) MC CORMICK, J. B.; FISHER-HOCH, S. (1996) Virus Hunter of the CDC Atlanta.

(28) PIEDROLA, G.; DEL REY CALERO, J.; DOMÍNGUEZ CARMONA, M. et al. (1991) Medicina Preventiva y Salud Pública. 9ed. Ed Masson. Barcelona.

(29) PRESTON RICHARD «The Hot Zone»; «The Cobra Event».

(30) PINTER, G. G. (1998*) From epistemology to rational science policy: Ppoper versus Jun Perspectives in Biology and Medicine 41(2)*: 291-8.

(31) POPPER, K. (1997) *Normal science and its dangers. Ed Lakatos and Musgrave. Criticism and the Growth of Knowledge Cambridge Univ. Press New York*: 51-58.

(32) SEFH; (2001) Información sobre Bioterrorismo.

(33) SALLERAS, L. (2003) Vacunaciones preventivas. Principios y Aplicaciones. 2 ed. Masson. Barcelona.

(34) SALMOND, G P. (1995) *The bacterial enigma cracking the code of cell-cell communication Mol. Microbiol; 16;* 615-24.

(35) SUAREZ FERNÁNDEZ, G. (2002) *Seguridad biológica frente al Bioterrorismo. An RANM. 1.º:* 77-93.

(36) THOMSON, R. C. A.; (2000) Molecular Epidemology of Infectious Diseases. Ed. Arnorl London.

(37) WHO. (1986) Safety Measures for use in Outbreaks in Communicable Disease Outbreaks.

(38) WHO (1995) Viral hemorrhagic fever. Management of suspected cases WER. 70 (35); 249-252.

(39) WHO (1970) Health aspects of chemical and biological weapons, Geneva. 98-109.

La ingeniería genética aplicable a la guerra

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

y MANUEL DOMÍNGUEZ DE LA CALLE
Farmacéutico. Clinical Research Associated

EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA

En 1953, James D. Watson y Francis Crick identificaron el código genético, y en 1971 comenzó la ingeniería genética y aunque se prohibió su desarrollo en 1974 por el riesgo de inseguridad cada vez es mas empleada para obtener nuevas variedades o proteinas, que como todo descubrimiento humano es neutral y puede ser empleado para el bien, obteniendo variedades y cepas microbianas dotadas de propiedades útiles para el hombre. Se puede transferir a bacterias o levaduras, ADN procedente de otras bacterias o de virus, más fácilmente si se trata de especies relacionadas o incluso de células eucariotas, es decir creando quimeras, mediante procesos de transformación, transducción, por medio de fagos, transfección, conversión o conjugación, por medio de plásmidos, puede modificar los agentes haciéndolos transmisibles o patógenos para el hombre o modificando sus propiedades como la de su resistencia a quimioterápicos. Por técnicas de fragmentación se han creado pruebas diagnósticas como las de hibridación con sondas o la amplificación del ADN por medio de la PCR. La ingeniería genética se emplea cada vez más para obtener nuevas variedades o proteinas incluidas hormonas como la insulina la somatostatina, el interferón, citoquinas, inmunoglobulinas específicas,.o antígenos como el «S» de la Hepatitis B utilizable como vacuna

etc. La transferencia de genes se logra pasándolos a un microorganismo generalmente la E. coli Cuando esta enterobacteria se reproduce permite obtener en pocas horas millones de bacterias productoras de la deseada sustancia.

La alianza de la tecnología con la maldad, puede aplicar la ingeniería genética a obtener microorganismos utilizables directamente en la guerra o en el terrorismo o indirectamente para fabricar agresivos químicos de origen biológico. Aún no se pueden obtener nuevos microorganismos, dada su enorme complejidad, aunque, en su momento, se ha atribuido a la ingeniería genética el origen de la neumonía atípica, de la legionelosis de Filadelfia o la del sida, cuyo virus habría sido obtenido en Fort Derrick, según el biológo de Berlín Oriental, Jacob Segal, opinión recogida por el semanario soviético en inglés «New Times» en septiembre de 1986. Actualmente se pueden obtener en el laboratorio microorganismos derivados de los existentes pero mejor dotados para su utilización como agresivos. La versatilidad que la ingeniería genética puede lograr es enorme por ej. se dispone de cepas como las E.K. 1 y 2 de la E. coli que se destruyen fácilmente en el medio aumentando la seguridad propia en el caso de desear utilizarlas. En USA se obtuvo la cepa Ames del Bacillus anthracis, cuyas esporas son muy pequeòas y más difusibles, muy semejante a la empleada en los ataques terroristas de 2001 sensible a la penicilina, cefuroxima y cefotaxima, pero se podrán lograr cepas resistentes ya que en 1997 se aisló una estirpe resistente en la India. Se ha obtenido una legionella recombinante que dispone de genes codificadores de proteinas, capaces de atacar a la mielina, o virus híbridos por ej. el muy difusible virus A de la gripe con otros virus o con genes patógenos como el del factor letal del ébola.

El gen es la unidad básica de la herencia. Está formado por 10.000 a 2.000.000 millones de pares de los nucleótidos púricos, adenina (A) y guanina (G), y los pirimidínicos, timidina (T) y citosina (C), unidos a una molécula de fosfato y a la desoxirribosa en dos cadenas (salvo en algunos virus y en algunos fagos) en las que la adenina está unida a la timina y la citosina con la guanina por fuertes enlaces de hidrógeno. El polímero ADN está constituido por cuatro monómeros, los nucleótidos, formados de los nucleósidos respectivos unidos por un grupo fosfórico, en una cadena en la que las tripletas de los nucleótidos, los codones se suceden irregular-

mente en secuencias llamadas exones e intercaladas con ellas, las más largas, o intrones. Los conjuntos específicos de varios cientos de codones forman una unidad de información genética o gen.En algunos virus, y en algunos fagos, que no son seres vivos, la unidad de información genética está en las cadenas de ARN. El «alelo es cada una de las distintas variedades en que puede presentarse un gen que ocupa un locus.

Al replicarse el ADN, se separan las dos cadenas, sirviendo cada una de ellas de molde, para que la ADN polimerasa reconstruya una de las dos hélices idéntica a la original. El ADN no sintetiza directamente las proteínas; antes se transcribe en una copia de ARN sin más modificación que en este el azúcar es ribosa y que la timina, está substituida por el uracilo (U). La secuencia de ARN es complementaria de la cadena complementaria o antisentido del ADN. Una vez madurado el ARN y convertido en ARNm, emigra al citoplasma en donde con los ribosomas sintetizan proteínas funcionales o partes de ella o sus precursores como expresión total o parcial de un gen.

Los genes se expresan por el ARNm, que si están en la dirección correcta y disponen de las señales de inicio y de fin de la lectura del código, formadas por cortas secuencias de nucleótidos, por medio de los ribosomas sintetizan una proteína, parte de la misma o una proteína precursora o preproteina. En algunos casos la expresión requiere elementos adicionales para que, la proteína se segregue y actúe fuera de la célula.

Se abre un nuevo concepto para la epidemiología de las enfermedades transmisibles, atribuyendo la causalidad de las enfermedades transmisibles no a los microorganismos que serían los vehículos de aquellos genes. El conjunto de microorganismos saprofitos y patógenos para animales o plantas, es el reservorio del que algunos individuos, adquirían genes que le confieren patogenicidad para el hombre, en el que al infectarlo, se seleccionan y multiplican, pudiendo a su vez ser fuente de variabilidad genética sobre la que pueden actuar las fuerzas selectivas «alimentando» los procesos evolutivos. Recordemos que los genes reguladores de las células eucariotas, suelen proceder de bacterias y de virus.

La epidemiología actual de las enfermedades transmisibles no debe considerar como agente causal primario a las bacterias o los virus, que pasan a ser factores secundarios, vehiculadores de los primarios que son

los genes codificadores de las proteínas determinantes de la infecciosidad, la patogenicidad y la virulencia. Esos genes pueden ser cromosómicos y en las bacterias además plasmídicos o fógicos, y en los virus de otros virus que confeccionan una misma célula. Los genes podrían proceder de individuos de la misma o de diferente especie. Abalia y cols (1987) encontraron en 49 cepas de E. coli de urocultivos, 68 plásmidos de 0,9 a 130 Md, siendo el mas frecuente el de 62 Md presente en cinco cepas existiendo relación entre el plásmido con el fenotipo de resistencia y con la presencia de hemaglutinina. Cuando entra un fragmento exógeno de ADN en una bacteria parte del mismo se puede introducir en el genoma de la receptora, mientras que el no unido no se replica o se digiere. Se produce en estos casos una diploidía ínfima, llamada merodiploidía generalmente transitoria, y las bacterias merodiploides o merozigotos.

Los «Organismos genéticamente modificados» OGM, o transgénicos, son aquellos a los que se ha alterado su constitución genética, por mutaciones y especialmente introduciendo genes procedentes de individuos de su misma u otra especie, incluidas las plantas o en el futuro procedentes de síntesis gracias a la capacidad de combinar in vitro en un orden escogido, trozos de ADN. La transgenia es el método de combinar in vitro, genes o sus fragmentos para formar nuevos genes estructurales o reguladores por la técnica del ADN recombinante. Se rompe el ADN con enzimas de restricción, se seleccionan los trozos de ADN conteniendo uno o mas genes o incluso fragmentos de ellos, considerados de interés y se introducen e insertan en el lugar y orden apropiado del ADN del microorganismo generalmente una levadura o una bacteria, por medio de una ligasa. Las características adquiridas se transmiten a los descendientes como un carácter hereditario propio, es decir por clonación. La transgenia permite obtener proteínas útiles como la insulina; en la E. coli y en el S. cerevisiae se han clonado el gene S del VHB utilizable para vacunas, pero también se pueden introducir los genes de las dos cadenas de la ricina procedentes de una planta para obtener esta sustancia utilizable como agresivo. La transgenia permite obtener microorganismos con gran capacidad patogénica. Por ej. llevando genes plasmídicos pXO1 (Okinaka y cols. 1999) y pXO2 (Okinaka y cols. 1999) o genes cromosómicos que intervienen en patogenia como hemolisinas, fosfolipasas y quelantes del hierro existentes en varias especies del género Bacillus a otras.

La capacidad invasora de las Shigellas y la de las E. coli enteroinvasivas, depende de un plásmido no conjugable de 140 Md (Sansonetti y cols.1982, Hale y cols. 1983) algunos de cuyos genes codifican varias proteínas de la membrana externa de las bacterias que las hacen capaces de reaccionar con los receptores de las células intestinales permitiendo que entren los gérmenes en la célula; esos plásmidos se pueden pasar a otras bacterias aprovechando los pilis sexuales codificados por plásmidos conjugables coexistentes con ellos. Este fenómeno se ha debido producir espontáneamente pasando plásmidos de Shigellas a la E. coli O136:B22 (K78), lo que explica que muchos serotipos invasores de E. coli tengan antígenos O idénticos a los de ciertas Shigellas y que algunas utilizen el acetato sódico por la técnica de Trabulsi y cols (1.962), y el citrato en la de Christensen, sin fermentar o haciéndolo lentamente a la lactosa. Las cepas de E. coli 0157:H7 lisogenizadas por uno o más bacteriófagos con los genes VT-1 y VT-2 sintetizan verotoxinas; además las cepas toxigénicas de E coli 0157:H7. portan un plásmido que expresa una nueva variedad de fimbrias y el gene cromosómico «eae» que codifica una proteína de membrana externa de 102 kDa, que determinan la unión íntima de las bacterias a las células intestinales. (Karch y cols.1987, Tzipori y cols.1987). El gen «eae» es frecuente en las cepas de procesos humanos y mucho menos frecuente en las cepas aisladas en vacas sanas. La adquisición de las verotoxinas se debió a la entrada de plásmidos y sobre todo de fagos a cepas de E. coli no toxigénicas especialmente a la O157:H7 que los habrían captado de Sh. shigae hacia 1970 (O'Brien y cols 1984, Smith y cols 1984), y desde entonces debió extenderse clonalmente, sin causar casos de enfermedad humana o poco destacados, hasta que en 1983 se detectó el primer brote. Esta bacteria se multiplicaría mucho en los enfermos, de modo que en las heces está casi en estado puro, sirviendo de donante de fagos y de plásmidos portadores de VT-1 y VT-2, que podrían «contagiar» a otros serotipos de E. coli, que se convertirían en verotoxinógenos, aumentando la proporción de intoxicaciones por la verotoxina entre las enteritis por E. coli, hasta que esos genes hayan llegado a todos los serotipos.

Las cepas verotoxigénicas, son sorbitol y betaglucuronidasa negativos (Blanco y cols.) característica necesaria para poder producir verotoxina, incluida la cepa que perdió la verotoxigenia probablemente por haber perdido su plásmido (Karch y cols. 1992): Whittam y cols. (1993)

encontraron unas raras cepas sorbitol y betaglucuronidasa positivas que eran vertoxigénicas.

Se ha atribuido la asociación de ciertos serogrupos y serotipos con determinados mecanismos patogénicos a la gran receptividad a la transferencia de plásmidos o de fagos. Considero más verosímil que la adquisición de los factores de patogenicidad se habría efectuado en aquellos serogrupos y serotipos en los que el azar permitió la transducción o la conjugación pues creemos que es poco probable que haya diferencias de susceptibilidad a adquirir genes de determinadas toxinas, según los genes codificadores de determinados antígenos O y H.

Los fagos K12, M13, R17 y fd que penetran por pilis F y los T4, T7 que lo hacen por lipopolisacáridos tienen genes de patogenicidad, que le habrían sido transferidos recientemente de la Sh. Flexneri a la E. coli, que se hizo agente de una zoonosis emergente, transmisible por el faenado de la carne o por las técnicas culinarias inadecuadas. Las cepas hechas patógenas se habrían seleccionado positivamente por la mayor reproducción intestinal en cuyo contenido llegan a estar prácticamente en cultivo puro, contaminando manos y medio y produciendo casos secundarios.

Esto explica a nuestro juicio que la distribución de las serogrupos y serotipos patógenos sea inicialmente, diferente según países y según el tipo de acción patógena. Las cepas de E. coli 0157:H7 verotoxigénicas aisladas en lugares muy diversos (Whittam y cols 1988, Böhm y col. 1992, Karch y cols. 1993), son muy homogéneas, por ej. muchas cepas causales de brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica y del síndrome hemolítico-urémico en Europa continental tienen el antígeno flagelar 21. La relativa escasez de casos humanos de colitis hemorrágica, pese a la alta frecuencia de VTEC en bóvidos puede ser debida a que aún no han adquirido factores de patogenicidad en el intestino animal.

INGENIERÍA Y GENÉTICA

La técnica puede reproducir en el laboratorio o en la industria, los fenómenos evolutivos naturales y transformar microorganismos saprofitos en patógenos o hacer que estos sean más eficientes para producir infecciones y tal vez en un futuro lejano, obtenerlos de novo para ser empleados con fines agresivos. Por ej. es posible producir, carbunco por un Pro-

teus o por un Bacillus subtilis, al que se le haya introducido el plásmido PXO 1 o el 2.

La ciencia puede favorecer y aprovechar los mecanismos evolutivos para sus fines, que pueden ser buenos o inmorales. Los genes que puedan utilizarse para modificar microorganismos haciéndolos empleables para la guerra son los que determinan la infecciosidad, la patogenicidad y la virulencia, por ej., la capacidad de adherirse a las células blanco, o la de invadirlas etc. o aumentando su estabilidad, su facilidad de diseminación, el ser mas «weaponizables», mas difíciles de detectar en el ambiente y de diagnosticar en los afectados, o lograr cepas resistentes a vacunas y quimioterápicos.

La ingeniería genética utiliza, básicamente, transposones portados por plásmidos o por fagos, para transferir parte de un genoma exogenote al endogenote de una bacteria, además de enzimas como las restrictasas de tipo II, la ADN-ligasa etc. para ampliar el potencial de «diseñar» deliberadamente nuevas combinaciones genéticas como genes híbridos artificiales, crear rutas metabólicas inexistentes en la naturaleza, etc.

La secuenciación de los genomas de microorganismos causantes de infecciones aisladas o de brotes o de epidemias, además de permitir conocer las variaciones y parentesco de los microorganismos presentes en la naturaleza, proporciona medios para estudios forenses y de medicina militar. Así se identificó el origen del VIH de varios pacientes de un odontólogo seropositivo de Florida, que fue acusado de haber transmitido el virus y el origen de la cepa del virus West Nile que atemorizó en 1999 a los neoyorquinos. A medida que se disponga de más y mejores primers y se abarate, (la identificación de la cepa de B. anthracis causante del ataque de Florida de 2002 costó 125.000); esta herramienta aumentara su utilidad ya que proporciona la identificación completa del microorganismo sospechoso

Modificaciones del genoma

El genoma de los microorganismos se modifica naturalmente por mutación, transposición de genes, o adquiriendo genes por transformación, transducción y conjugación, seguidas de recombinación de secuencias del

ADN, mecanismos que la Ingeniería genética utiliza para obtener variedades deseadas para sus fines. La introducción en una bacteria del gen que codifica a la metaloproteasa, enhancina (BA3443), del anthracis a virus favorecería la infecciosidad de los mismos ya que la enhancina degrada a la mucina.

Mutaciones

Las mutaciones son alteraciones no reparadas, de la base de un codón correspondiente a un gen cromosómico o plasmídico, cuyos nucleótidos se afectan con una frecuencia dependiente del codón del que forman parte. El gen mutado puede transcribirse a las células hijas. Las mutaciones pueden modificar el fenotipo de forma observable. A las mutaciones se debe la reciente aparición de cepas de virus patógenas para el hombre, como los VIH, los coronavirus de la civeta etc.; las mutaciones de la hemaglutinina y de la neuraminidasa de los virus gripales A cambian tanto las propiedades de este virus que pueden llegar a ser consideradas como cepas o variantes nuevas insensibles a la inmunidad provocada por las cepas parenterales.

Las mutaciones pueden ser espontáneas cuando no se conoce la intervención de un agente exterior. Hay una predisposición genética para la producción de mutaciones probablemente por la intervención de los genes codificadores de las nucleasas reparadoras, que alteran los procesos de replicación, reparación o recombinación del ADN.

Las mutaciones pueden ser puntuales, cuando se cambia un par de bases por otro, transiciones cuando se cambia una pareja purina-pirimidina por otra del mismo tipo vg G-C por A-T, transversiones cuando se substituye un par purina-pirimidina a una pirimidina-purina (o viceversa), por ej A-T se substituye por _T-A. Otro tipo de mutación es la incorporación o eliminación de uno o unos pocos nucleótidos que alteran la secuencia de los codones; en el 4% de los casos las mutaciones se deben a metilación o a otro cambio químico de una base o desplazamientos tautoméricos del protón que cambian los puentes de H por ej. pasando la adenina a iminoadenina; en el 22% de los casos el cambio de un triplete se hace por otro equivalente, por lo que la mutación no cambia la prote-

ína, pero en los demás casos la mutación impide la formación de la proteína o esta es anómala, sin función o con esta alterada. Las mutaciones aparecen principalmente como consecuencia del mecanismo post-replicativo de reparación propenso a error, es decir el sistema SOS. Además tenemos las delecciones y las inserciones de trozos grandes del ADN, las inversiones, las traslocaciones y las duplicaciones en tándem que interrumpen la lectura. El efecto de la mutación es más trascendente cuanto mas cerca del inicio de la traducción se haya producido.

Dada la frecuencia de las multiplicaciones de las bacterias y la fabricación de virus en las células infectadas, en los clones de estos microorganismos es frecuente que haya individuos mutados. Los agentes ambientales seleccionan a los organismos portadores de determinadas mutaciones pero, además inducen estas. Estos agentes se llaman mutágenos o mutagénicos. Reaccionan con el ADN, o interfieren con la replicación aumentando la producción de mutaciones llamadas por ello «inducidas». Los agentes ambientales pueden ser físicos o químicos.

a) El mutágeno físico más importante es la radiación ultravioleta especialmente la de 260 nm que es absorbida por el ADN. Los UV substituyen pares de bases y sobre todo provocan la formación de dímeros intracatenarios, al unir covalentemente las pirimidinas, citosina y timina consecutivas, en todas las fases del ciclo celular incluso durante la fase de descanso, originando dímeros intracatenarios formando un anillo ciclobutano entre dos fósforos consecutivos. En la mitad de los casos se afecta el dímero T-T, en el 40% el T-C y en el C-C en el 10%. Las mutaciones aparecen principalmente como consecuencia del mecanismo posreplicativo de reparación propenso a error (o sea, el sistema SOS). Con menor frecuencia la luz UV hidrata a la citosina, dando transiciones.

b) Las radiaciones ionizantes (RX y gamma), son más penetrantes que los UV, fragilizan al ADN, rompen la unión fosfodiéster, que puede conducir a delecciones y liberan iones que reaccionan con las bases. Las lesiones son reparables por el sistema SOS.

c) El calor, tal vez a través de los movimientos brownianos, altera selectivamente a las purinas y el paso de citosina a uracilo en bacterias cultivadas en un pH ácido.

d) Una presión superior a 15.000 atm es mutagénica para las bacterias.

e) Los campos magnéticos pueden causar mutaciones; los de 50 Hz de 1,2 mT, estimulan la transposición del elemento cromosómico transposable Tn5, de de una cepa de E. coli al episoma extracromosómico transferible a una bacteria receptora por conjugación. La transposición se estimula por la síntesis y por el acumulo de proteínas del shock térmico (Chow y col.2000).

f) Mutágenos químicos. Pueden ser:

f. 1) Análogos de bases, con un anillo similar al de aquellas, pero con propiedades químicas diferentes, que se incorporan durante la replicación del ADN a este que se hace lábil y causando errores en el emparejamiento. Entre ellos tenemos el 5-bromouracilo, (5-BrU) análogo de la timina, que facilita la producción de transiciones T=A a G=C debido a los frecuentes cambios tautoméricos desde la forma ceto a la enol. El 5-bromouracilo ceto es introducido en el dímero A=T por la ARN-polimerasa ADN dependiente formando bromouracilo-ceto=adenina que como se tautomeriza fácilmente pasa a bromouracilo-enol= adenina y al dividirse nuevamente da la transición G=C en lugar de A=U. Estas moléculas entran en las células y son convertidas a los correspondientes «dNTP», de modo que su estructura les permite incorporarse durante la replicación del ADN.

La 2-aminopurina (2AP) análogo de la adenina se tautomeriza mucho de la forma AP amino a la _AP imino. La pareja A=T en la primera replicación aparece _AP amino=T se tautomeriza pasando a P imino=T que al dividirse da _AP imino=C y en la tercera replicación queda _G:C en lugar de U=A.

f.2) Agentes hidroxilantes o desaminadores de las bases nitrogenadas. El ácido nitroso desamina oxidativamente a la A y a la C, originando transiciones y a la G, aunque en este caso no hay mutación ya que la G-_xantina, se empareja igual que la G con la C. La hidroxilamina (NH_2OH): hidroxila específicamente el NH_2 de la citosina.

f. 3) Los agentes intercalantes, son moléculas planas con 3 o 4 anillos conjugados, semejantes a los pares de bases del ADN, pero que no se pueden incorporar covalentemente a la hélice de ADN, pero si lo hacen intercalándose entre dos pares de bases consecutivas, alterando la in-

formación genética. Entre ellos tenemos el naranja de acridina, el bromuro de etidio, la la proflavina etc.

f. 4) Los bloqueantes del emparejamiento de las bases labilizan las bases, de modo que éstas espontáneamente se modifican frecuentemente bloquean su emparejamiento, estabilizando emparejamientos erróneos durante la replicación y la recombinación del ADN y desplazando la pauta de lectura. Estas lesiones inducen la intervención del sistema SOS que repara al ADN dejándolo propensa al error. Entre ellos tenemos al benzo-a-pireno y la aflatoxina-B1.

f. 5) Agentes alquilantes. Pueden ser monofuncionales que introducen radicales alquílicos en la O 6 guanina de una cadena o bifuncionales, cuando lo hacen en ambas cadenas del ADN. La alquilación distorsiona la doble hélice, causando transiciones mutagénicas. Son alquilantes la iperita, las mostazas nitrogenadas y sulfuradas, como el $Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}S\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}Cl$ o di-(2-cloroetil)-sulfuro, el etil-etano-sulfonato (EES) ($CH_3\text{-}CH_2\text{-}SO_2\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_3$), el etil-metano-sulfonato (EMS) ($CH_3\text{-}SO_2\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_3$ nitrosoguanidina) o (NTG), que es la N-metil, N'-nitro, N-nitrosoguanidina, que solo actúa in vivo, ya que lo hace sobre la horquilla de replicación del ADN. La NTG es uno de los mutágenos más potentes que se conocen, pero es un agente «sucio», en el sentido de que genera varias mutaciones en la misma célula, induce reparación SOS que origina transiciones, transversiones y desplazamientos de la lectura del código. Muchas bacterias tienen una O 6 -alquil-glucosilasa, que alquila el oxígeno 6 de la guanina rompiendo el enlace N-glucosídico entre la O 6 -alquil-guanina y la desoxirribosa creando un sitio apurínico llamado AP que es reconocido por una endonucleasa correctora (apurinasa), que rompe el enlace fosfodiéster del lado 5' del sitio apurínico con corte y resíntesis de unos pocos nucleótidos, pero si el daño es muy grande, la reparación la hace el sistema SOS con las consecuencias antedichas. Muchas bacterias poseen un sistema específico para reparar las lesiones de la O 6 -alquil-guanina.

Transposición

Es el mecanismo por el que se reordena una secuencia de genes, mediante el transporte por si mismos, de, los genes llamados «saltarines» a otras zonas del mismo cromosoma o pasar del cromosoma a un episoma

o a un plásmido, en los que se recombina, sin necesidad de que exista homología entre el elemento transpuesto y la zona de genoma a la que se transpone, llamada secuencia diana es decir de forma «ilegítima». Si el exogenote contiene un transposón, éste puede insertarse en el genoma de la célula receptora. La transposición aleja el elemento transpuesto de unos genes y los acerca a otros, que si son reguladores, le cambian su expresión y con ello el feno y el genotipo, y pueden alterar la lectura del código genético es decir causan mutación o bien se convierten en plásmidos que pueden quedar silentes hasta su puesta en marcha.

Las secuencias nucleotídicas, llamadas de inserción, o IS, tienen menos de 1.000 pb, y los 15 a 25 pb de sus extremos, tienen sus bases inversamente repetidas (IR), es decir, que la secuencia de un extremo en una cadena, leída en sentido de 5 a 3' es idéntica (o casi) a la secuencia del otro extremo de la otra cadena, leída en el mismo sentido. Todos los elementos genéticos transponibles poseen estos terminales. Las IS pueden incorporarse a una cadena de ADN formando parte de la misma. La presencia de un IS en un gen desplaza la lectura del código, generando frecuentes señales de fin de la trascripción. La inserción de una IS puede producir delecciones secundarias de todo o de parte del elemento transponible, y a veces también delecciones del material genético adyacente. Si coexisten dos secuencias IS del mismo tipo, no contiguas, se pueden recombinar causando inversiones y translocaciones del material intercalado entre las dos IS. Las IS sólo poseen un gen, que codifica una transposasa, una de las enzimas que reconocen secuencias específicas inversamente repetidas en los extremos del transposón, necesarias para la transposición. La transposasa corta al ADN «donador» en los extremos del elemento transponible, y luego los inserta en el ADN. Al no tener otros genes las IS, a diferencia de los transposones, no confieren fenotipo seleccionable. Los genomas de muchas bacterias tienen varias copias de cada tipo de IS; la E. coli K12 tiene unas 6 copias de IS1, 7 de IS2, etc.

Los plásmidos, especialmente los conjugativos suelen ser ricos en IS. Se produce una transposición cada 10^{3-4} divisiones bacterianas. La frecuencia de inserción de una IS en un gen concreto es de 10^{5-7}, semejante a la de las mutaciones espontáneas puntuales. La inserción de un IS, puede revertir, en una de cada 10^{6-10} bacterias hijas al cortarse los extremos de la IS.

Transposones (Tn)

Son secuencias de 2.900 a 22.000 pb. Los compuestos terminan en dos IS idénticas o casi idénticas, cuyos extremos terminan en dos secuencias cortas repetidas inversamente (IR), que funcionan como las IS, causando la transposición. Una o ambas IS con la misma u opuesta orientación, transponen y aportan señales de fin de la transcripción y de la traducción, que causan delecciones e inversiones de más de dos genes, el codificador de una transposasa y otro que codifica una proteína que no interviene en la transposición sino en la resistencia a quimioterápicos o a los metales pesados o a otras funciones. La transposición puede cointegrar replicones y transposones. Por ej. el Tn9, está formado por dos secuencias iguales y en la misma orientación de la IS1, que tiene un gen de resistencia al cloramfenicol (Cm R); el Tn10, dispone de dos IS10 casi idénticas, con el gen de resistencia a la tetraciclina (Tet R). Las dos IS50, solo se diferencian en un nucleótido, y tienen los genes de resistencia a la kanamicina (Km R) y a la estreptomicina (Str R).

Los transposones no compuestos carecen de IS, terminando solo en dos IR; llevan en su porción central el gen para la transposasa y a veces también un gen para la resolvasa que deshacen, «resuelven» a los cointegrados o el gen del regulador de la transposición o ambos. Suelen dar sólo transposiciones, siendo los cointegrados únicamente una fase transitoria, que actúan como intermediarios del mecanismo de transposición. Los transposones no duplicativos o de «cortar y pegar», se separan de su inserción trasladándose a otro sitio. Las transposasas reconocen los terminales inversamente repetidos del transposón, y cortan en los extremos (en este sentido se dice que la transposición es específica, pero sólo respecto de las secuencias del elemento transponible).Por otro lado, las transposasas cortan también en una secuencia diana más o menos aleatoria del sitio a donde se van a transponer (inespecificidad respecto del «endogenote», por lo que se llama a esta recombinación «ilegítima»). Los cortes son en ambas cadenas, pero en situaciones ligeramente separadas entre sí en las dos cadenas. Posteriormente hay empalmes entre las cadenas cortadas del Tn y la de la diana.

La mayor parte de los transposones, no están «libres», sino unidos por alguna de sus cadenas al ADN diana durante la transposición. La

transposición de cada elemento transponible, suele conllevar la duplicación de las secuencias contiguas llamadas «diana» de 4 a 9 y hasta 12 pb específica de cada transposición, entre las que queda encerrado, este. y la replicación del propio transposón (por ello se habla de recombinación ilegítima duplicativa). Al terminar la transposición duplicativa queda en el ADN original, una copia del Tn, y otra en el sitio receptor, limitadas por cortas repeticiones de la secuencia diana.

El lugar al que se hace la transposición no es específico aunque hay zonas del ADN más susceptibles a recibir transposones. Numerosas familias de transposasas, con el mismo origen evolutivo, conservan el sistema transposa-resolvasa común. Los transposones TnA pueden contener genes específicos como los que determinan resistencia, adquiridos en su evolución, a la ampicilina.

El Tn3 es un transposón típico de 5.000 pb, cuyos terminales de 38pb están repetidos inversamente. El Tn3 tiene los genes, tnpA que codifica la transposasa (enzima de recombinación «ilegítima», propia de este Tn) y el tnpR: que codifica la resolvasa (recombinasa específica de sitio-conservativa que también regula la transposición) y el gen codificador de una beta-lactamasa; tiene además, la secuencia no codificadora, res (=IRS), que interviene en la fase de resolución de los cointegrados. El Tn3 se transpone formando por la transposasa, un cointegrado entre el replicón donador y el replicón receptor.

La transposición se estimula por la síntesis y por el acumulo de proteínas del shock térmico (Chow y col.2000) o por campos magnéticos; los de 50 Hz y 1,2 mT estimulan el transposón Tn5 cromosómico de una cepa de E. coli.

Integrones (In)

El integrón es un transposón con terminales IR, que con frecuencia contienen genes de resistencia a antibióticos o a metales pesados, más uno que codifica una integrasa, enzima que permite una recombinación específica de sitio; su gen fue «capturado», por recombinación específica, de otro elemento genético. Los integrones se transponen como una IS o un Tn, pudiendo integrarse en transposones mayores (el Tn21 es un gran transposón

que codifica múltiples resistencias a antibióticos, que contiene el integrón In2, y el de la integrasa,contigüo al de resistencia a la estreptomicina

Adquisición de genes por las bacterias

Las bacterias pueden adquirir genes extraños, los exogenotes, que pueden recombinarse con el ADN del endogenote aportando sus genes.

La adquisición de genes esta limitada por la restricción, mecanismo que tienen muchas cepas bacterianas que reconoce como extraño a este exogenote que es destruido enzimáticamente, evitando el mestizaje con el ADN exógeno, sea cual fuere el sistema de entrada en la bacteria, manteniendo la especifidad genética de la bacteria.

La restricción se acompaña de la protección del ADN de la bacteria, que asegura su viabilidad, por la metilación de las bases de determinadas secuencias, fenómeno llamado «modificación», catalizado por metilasas.

La restricción y la modificación fueron descubiertas en 1968, _en las cepas «K12» y «B» de la E. coli infectadas con el fago λ. Los fagos obtenidos de una cepa no se multiplicaban en la otra ya que una endonucleasa especifica de cada una de ellas, reconocía como extraño al ADN del fago crecido en la otra y lo destruía. Este tipo de endonucleasas se llaman endonucleasas de restricción, o restrictasas. Es decir los fagos estaban «restringidos» a la cepa original; uno de cada 10.000 fagos «escapa» a la restricción, ya que no son reconocidos como extraños y se pueden multiplicar en la cepa no parenteral. La transducción restringida nunca se produce por infecciones líticas.

Hay varios sistemas de modificación-restricción (M-R). En el sistema M-R-I, un complejo multiproteico (multimérico), realiza la modificación y la restricción. Son M-R-I la cepas K12 de E. coli con el sistema EcoK, y la cepa B que posee el EcoB. El complejo EcoK dispone de una subunidad «S» que reconoce específicamente, unas secuencias relativamente grandes. Dos subunidades «R» del complejo, son nucleasas de restricción, que cortan a unos 1000 pb, de la secuencia reconocida, una zona, que no presenta simetrías sobre la anterior, acompañándose de la hidrólisis del ATP. Las dos subunidades «M» metilasas del complejo, toma al CH3, de la S-adenosil-metionina.

La actividad del EcoB varía según el ADN sobre el que actúa: si las dos cadenas del ADN parental están metiladas, la subunidad «S» lo reconoce como «propio»,sin que sea modificado por el complejo EcoB. Sobre el ADN hemimetilado, las subunidades M metilan la parte de la cadena, sintetizada inmediatamente después de la replicación. La subunidad «S» reconoce como «extraño» el ADN no metilado en la secuencia-diana. La restrictasa, con hidrólisis de ATP reacciona y destruye esta secuencia.

En el sistema M-R-II la metilasa y la restrictasa no forman complejos multifuncionales. El reconocimiento de la secuencia específica de ADN, de unos 4 o 6 pares de bases dispuestos simétrica o palindrómicamente lo hace cada subunidad dímerica, formada por una proteína de modificación y otra de restricción, y lo corta en un lugar específico, que obviamente tiene su correspondiente en la otra cadena de la otra mitad del palíndromo. El sistema M-R-II, no requiere ATP, pero si iones Mg ++ para funcionar. La metilasa, utiliza también el SAM como donante de metilos.

Las metilasas suelen ser proteínas monoméricas, que introducen grupos metilo en una A o en una G según la metilasa, perteneciente a la secuencia reconocida en cuestión, en ambas cadenas.

Las numerosísimas restrictasas son proteínas formadas por dos subunidades del mismo tipo, ensambladas simétricamente. Muchas restrictasas cortan dentro de la secuencia, dejando extremos que según la restrictasa pueden ser protuberantes adherentes entre sí 5´, o romos. Algunas restrictasas dejan extremos protuberantes 5’, 3´. Más de la tercera parte de las cepas bacterianas presentan al menos un sistema M-R de tipo II. Muchas de ellas son codificadas a partir de genes situados en plásmidos. Las restrictasas que proceden de especies distintas que reconocen y cortan la misma secuencia, dejando el mismo tipo de extremos se llaman isosquizómeros.

Transformación

La transformación es la variación hereditaria de una bacteria susceptible, originada por la captación de ADN libre en el medio, con posterior recombinación del exogenote con el genoma de la bacteria (endogenote).

La bacteria que ha recibido el ADN se denomina transformante, aunque mejor seria «transformada». El fenómeno fue descubierto por Griffith en 1928 al recuperar neumococos capsulados virulentos de ratones inoculados con una mezcla de neumococos capsulados muertos por el calor, con neumococos vivos acapsulados y avirulentos. El ADN transferido puede ser un replicón, es decir capaz de replicarse y mantenerse por sí mismo, en la bacteria receptora.

Transducción

Es el proceso de transferir material genético desde una bacteria donante por medio de un bacteriófago, a una bacteria receptora. En 1951 Joshua Lederberg y Zinder mezclaron dos cepas de Salmonella, cada una con distintos marcadores genéticos, obteniendo recombinantes no debidos a transformación, ya que se producía en presencia de ADNasa ni a la conjugación ya que se seguía produciendo al separar las dos cepas por una membrana en un tubo en «U» que impedía el contacto físico entre ambas cepas; es decir era un proceso causado por un agente filtrable resistente a las nucleasas. Luego se descubrió que el fenómeno se debía al fago moderado P22 presente en una de las cepas como profago, ya que el calor o el suero antifago impedían la transducción; las cepas de Salmonella que no adsorben el P22 no se transducían. La inducción de la cepa donante, lisogénica produce fagos portadores de material genético de la cepa de origen, que los fagos inyectaban posteriormente a las bacterias receptoras. El Bacillus cereus es una bacteria oportunistica que puede causar una toxiinfección alimentaria. Lvanova y cols. (2003) obtuvieron la secuencia genómica de la cepa tipo ATCC 14579 de B. cereus; la región entre las 0,8 y 1,8 megabases (Mb) tiene 35,3% de G + C, similar al de la media del cromosoma; en la región entre 3,7 y 0, 8 Mb la cantidad de G + C es mayor que el valor medio, y la situada entre 1,8 y 3,7 Mb es menor al de la media. Estas regiones son contigüas con putativos profagos, lo que puede indicar el origen del cromosoma de esta cepa de B. cereus como resultado de una recombinación mediada por fago entre el cromosoma de bacterias muy próximas.

El proceso de la infección bacteriana por un fago, comienza cuando el fago se adhiere sobre receptores en la superficie de la bacteria hués-

ped, a la que inyecta el ADN, contenido en su cápside; si el fago es de tipo lítico expresa su programa genético y produce muchas copias de su ADN, y muchas cápsidas proteicas. En el interior de cada cápside se introduce («se empaqueta») una copia del genoma del fago. Las nuevas partículas (viriones), una vez completadas y ensambladas, lisan a la bacteria, desde dentro, quedando libres en el medio y preparadas para infectar nuevas células de la especie bacteriana hospedadora.

Los fagos moderados típicamente inyectan su ADN a la bacteria receptora, que se puede recombinar e insertar en el genoma bacteriano por recombinación específica de sitio conservativa, constituyendo un profago. La bacteria portadora de un profago se denomina lisogénica, y el clon derivado de ella, clon lisogénico. El profago permanece latente, como una porción del genoma de la bacteria, replicándose cuando lo hace este. Los genes del profago quedan inhibidos salvo uno cuya proteína inhibe la expresión de los demás genes del profago y por tanto de la lisis.

La E coli, tiene muchos fagos como los M13, R17 y fd que penetran por pilis F* y los T4, T7 que lo hacen por los lipopolisacáridos de superficie.

Un fago muy estudiado es el lambda «λ» de la E. coli; tiene cabeza icosaédrica, de 60 nm de diámetro, que encierra ADN bicatenario y cola flexible de 60 nm de longitud terminada en una fibrilla, que puede pasar una vez reciclado a profago insertándose entre los genes codificadores de las enzimas sintetizadoras de galactosa y de biotina. Un fago puede transferir un gen de la Sh. flexneri a la E coli K12. Los fagos con genes de patogenicidad, habrían infectado recientemente a la E. coli convirtiéndola en una zoonosis emergente, por coincidir con mecanismos en la cria, faenado de carnes, técnicas culinarias etc. que permiten su transmisión por los alimentos. Las cepas de E. coli 0157:H7 son lisogenizadas por uno o más bacteriófagos que codifican los genes estructurales para las toxinas.

En algunas bacterias lisogénicas, «despierta» su profago que se escinde del genoma bacteriano por recombinación específica, se circulariza y conecta todos sus genes que al expresar su programa lítico, activan sus funciones vegetativas conduciendo a la producción de muchas partículas del fago, con lisis de la bacteria desde dentro. Este fenómeno reci-

be el nombre de inducción. Artificialmente se puede inducir a casi todas las bacterias lisogénicas de un medio, tratándolo con UV, mitomicina, etc. que dañan el ADN y que inducen el sistema SOS. Los fagos transductores son «subproductos» anómalos del ciclo normal del fago. El lisado bacteriano causado por la inducción contiene fagos cuya cápside se formó al ensamblarse sus constituyentes, y en cuyo interior (caso de los fagos con cápside icosahédrica) se empaqueta el ADN, de forma no muy específica. Los fagos P22 de la S. typhimurium o el P1 de la E. coli empaquetan secuencialmente unidades de concatémeros, que pueden tener el genóforo.

Al separarse el profago una vez cada $10^{5\text{-}6}$ veces el corte no se hace en los límites del profago, sino corriéndose hacia uno u otro lado; en el caso de la E. coli K12 λ^{+} deja en la bacteria parte de su genoma unido al operón gal y adquiere el operon bacteriano bio que puede llevar trozos de ADN adyacente y al mismo tiempo se forma un fago «λ» defectivo, «λd» que tiene genes expresables de la bacteria pero que no puede expresar todos los del fago. Los fagos defectivos pueden transducir pero con baja frecuencia. Los lisados que los contienen se llaman «LTF»; los fagos defectivos no pueden insertarse en el ADN de la bacteria en la que entra su ADN, salvo que se coinfecte con un fago silvestre, que ayuda a la integración del defectivo. La bacteria en la que se insertan esos fagos, suelen hacerse lisogénicas para el fago correspondiente.

Según el ADN contenido en la cápside de los fagos inducidos pueden tener:

1.º Exclusivamente genes fágicos.

2.º Exclusivamente genes de la bacteria, introducidos, si lo permite su tamaño, en el hueco de la cápside. (pseudovirión). Son solo una pequeña proporción los que solo contienen una secuencia de genes bacterianos.

3.º El exogenote puede persistir y expresarse en la bacteria sin replicarse; es la transducción abortiva; el exogenote solo pasa a una de las dos bacterias hijas y así sucesivamente de modo que el clon solo tiene una bacteria con el exogenote, cuya concentración va disminuyendo con las generaciones hasta desaparecer por digestión o dilución.

4.º También en escasas ocasiones el ADN fágico se separa del genóforo, unido a cualquier secuencia del genóforo, con la misma frecuencia sea cual fuera la secuencia, y si su longitud lo permite, puede ser «encerrado «en la cápsida del fago, formando pseudoviriones. Es la transducción que puede ser generalizada, en la que las exo y endonucleasas de los fagos virulentos que median la transducción, no degradan completamente al ADN bacteriano. Al infectar estos pseudoviriones a otra bacteria, el ADN del pseudovirión se puede digerir por las exo y las endonucleasas, pero si no es así. se recombina, con la región homóloga del genóforo por medio del sistema de recombinación dependiente de RecA. SE hacen dos cruces («crossing-overs») y se integra la doble cadena del exogenote, eliminando la zona adquirida en la infección anterior, homóloga del endogenote.

5.º Finalmente puede ocurrir que el ADN de los fagos defectivos si le falta el gen int codificador de la integrasa, pero tiene el sitio BOP, procedente de la separación anómala anterior, se haga circular, sin integrarse en el genoma salvo que por un «crossing-over» se recombine de forma homóloga simple, por el sistema RecA de la bacteria receptora, creando un heterogenote gal + /gal -,cuyo fenotipo es gal +, con un profago (defectivo, que por ello no es inducible. Cada copia del gen gal es híbrida de un fragmento derivado del exogenote y otro del endogenote, pero puede quedar como plásmido libre.

La transducción especializada

Fue descubierta en 1956, por los esposos Lederberg y por Morse, en la que solo se transfieren secuencias de ADN bacteriano, contiguas al profago.

Cuando el fago infectante tiene una alta multiplicidad de infección, el ADN del fago silvestre se integraría de la forma habitual, mediante su sistema de recombinación específica de sitio (POP' X BOB') auxiliando al ADN del fago defectivo .λdgal + al proporcionarle zonas en la que se pueda recombinar y expresarse la integrasa. Se forma ahora un heterogenote gal+/gal -, doble lisogénico .λ+λd, cuyo fenotipo es Gal + y λ+, capaz de inducir la producción de fagos silvestres y defectivos.

Conjugación

Es el mecanismo bacteriano de transferencia directa, de genes, desde una célula donadora a otra receptora, a través de contactos íntimos entre ambas (puentes de unión) pero especialmente promovido por un plásmido. El plásmido es una secuencia de ADN extracrómosómica que flota libre en el citoplasma. Una variante de la conjugación es la SEXDUCCIÓN: en la que un trozo definido de material genético de la bacteria donante es transferido como parte de un plásmido conjugativo.

Lederberg y Tatum descubrieron en 1946, los plásmidos sembrando en un medio sólido, una mezcla de la cepa K12 de E. coli no sintetizadora de metionina ni de biotina con otra no-sintetizadora de treonina ni de prolina, en un medio carente de las cuatro substancias. Lógicamente no debería crecer ninguna bacteria y sin embargo aparecieron algunas colonias. No se trataba de transformación pues la adición de ADNasa no impedía el proceso; por lo que pensaron se trataría de transferencia de proteínas pero luego se vio se debía a un organelo bacteriano el plásmido capaz de pasar de una bacteria a otra. Si un fragmento de ADN se puede replicar en un microorganismo, permitirá la replicación del resto unido a él y se obtiene así un arreglo de genes capaz de perpetuarse. Las moléculas de ADN capaces de replicarse independientemente en una bacteria se llaman plásmidos, que algunos llaman plasmidios que son replicones autónomos, cuyos genes no son necesarios para la viabilidad de la bacteria. La mayoría de los plásmidos codifican funciones como la de producir pigmentos, toxinas, antibióticos, bacteriocinas, la resistencia a varios antibióticos o a metales pesados, enzimas degradadoras de la lactosa, del octano, del alcanfor, productores de SH2, de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, de sensibilidad o resistencia a los fagos etc.: los plásmidos llevan a menudo genes codificadores de mecanismos de adhesión y de la virulencia para plantas o animales; otros son crípticos ya que su presencia no modifican el fenotipo bacteriano. Algunos genes de los plásmidos codifican proteínas que forman una estructura tubular capaz de permitir el paso de una copia del plásmido de una bacteria a otra, otros codifican proteínas que determinan la replicación del plásmido Los plásmidos de la E. coli que contienen los genes de los CFA I y II suelen llevar los genes codificadores de ST y el LT aunque el CFA I porta este

gen rara vez que se expresan a 37° C pero no a 18°C. Hay plásmidos que portan conjuntamente genes que codifican a los componentes del CFA IV CS5-CS6- con el ST, al CS6 con el ST, al CS6 con el LT y a los CS4 con el CS6.

La capacidad invasora de las ECEI (y la de las Shigellas) depende de un plásmido no conjugable de 140 Md (Sansonetti y cols.1982, Hale y cols. 1983) que codifica varias proteínas de la membrana externa que interaccionan con los receptores de las células intestinales permitiendo su entrada en la célula y hemos de recordar que los plásmidos no conjugables pueden pasar a otras bacterias aprovechando los pilis sexuales codificados por plásmidos conjugables coexistentes con ellos. De forma semejante un mismo plásmido portador de genes de resistencia a varios antibióticos, lleva, a menudo genes codificadores de mecanismos de adhesión y de efecto patógeno. Es muy interesante el hecho de que los plásmidos con genes de resistencia a los antibióticos, pueden ser expulsados de la bacteria cuando desaparece la presión del quimioterápico

Si, por ej. los fragmentos del ADN, de la Drosofila melanogaster, extraído del ADN de la mosca que contiene unos 10.000 genes, obtenidos con una enzima de restricción se ligan a un plásmido que actúa como vector de clonación, capaz de replicarse introducidos en la E. coli o en otros microorganismos, reordenados en ella los genes de la mosca se perpetúan en los clonos de los microorganismos transgénicos. Como solo se transforman una mínima proporción de vectores, se incorpora un gen que causa resistencia a algún antibiótico, de modo que al cultivar las bacterias en un medio con antibiótico, solo se desarrollan las que contienen el plásmido y por tanto genes de la mosca. Los plásmidos de resistencia o «R» son «modulares», es decir, formados mayoritariamente por transposones, por IS, por transposones anidados es decir un transposón incluido en otro, etc.

La curación, es el proceso de pérdida del plásmido, con la consiguiente de las funciones y fenotipos codificados por este; se produce por temperaturas cercanas a la tolerable o por substancias como el bromuro de etido, o el naranja de acridina, que se intercalan en el ADN, modificando la replicación, estabilidad o reparto del plásmido a las células hijas.

Recombinación

La recombinación es el proceso por el que el ADN, procedente de un exogenote, se redistribuye en el endogenote, «barajando» muchos genes. La recombinación es con la transposición una importante causa de variación y de biovariabilidad que permite la expresión de las múltiples combinaciones teóricas de los genes, de los codones y de las parejas de bases, más rápidamente que la mutación, sobre los que actúa la selección evolutiva. Por otro lado hay mecanismos de defensa de la identidad que se oponen a la variabilidad.

La recombinación permite que en las infecciones mixtas de una célula por dos virus, cuyo ADN está fragmentado, de la misma o diferente especie, puede producirse la recombinación de sus genomas y que al producirse la encapsidación entran en la misma cápside fragmentos de ácidos nucleicos de los dos virus. La coinfección, es muy importante en la epidemiología de la gripe.Por recombinación se han obtenido cepas recombinantes de B. antracis carentes de PA, que pueden introducir LF y la EF en las células (Pomerantsev y cols. 1997, Broad 1998).

La recombinación bacteriana puede ser:

A) General u homóloga. Es la que tiene lugar en cualquier lugar del genoma, al emparejarse por medio de un conjunto especifico de enzimas, segmentos, con una homología superior al 94%. Comienza por un corte efectuado por las endonucleasas RecBCD o V, que se une aleatoriamente a una de las cadenas de la doble hélice del ADN del exogenote, que se va moviendo por la doble hélice, hasta que se empareja con la secuencia «χ», que es un «punto caliente recombinativo», 5’ GCTGGTGG 3’ 3’ CGACCACC 5’ en la que corta 4-6 bases del lado 3’ de una de las cadenas y actuando como helicasa, desenrolla la cadena cortada y hace que se desplace un fragmento monocatenario de ADN con su extremo 3’ libre. El diastema formada al desplazarse la cadena cortada del donante, se cierra por ADN sintetizado de novo. Cada 5 a 10 bases de la parte de la cadena sencilla desplazada del ADN donante se cubre por un monómero de la proteína RecA necesario para la recombinación. La cadena sencilla se presenta como una hélice extendida. La RecA unida al exogenote permite que se acople con la zona de la doble hélice complementaria del endogenote formándose una hélice triple (Meselson y Radding).

La RecA, utilizando la energía del ATP, facilita que la cadena donante desplace a la homóloga del endogenote, emparejándose con la complementaria de este, formando una estructura en «D». La cadena desplazada del ADN receptor se digiere por nucleasas.

En una zona, de la nueva doble hélice cada cadena procede de un ADN diferente. Los extremos originados en las dos cadenas homólogas, se unen covalentemente quedando entrecruzadas y «atadas», adoptando la estructura de Hollidayen cuyo cruce se une el complejo formado por las proteínas RuvA y RuvB, que con la hidrólisis del ATP desplazan el punto de cruce y agrandan la zona de heterodúplex de ambas dobles hélices. (si se giran 180º con eje en el punto de cruce, los dos segmentos de uno de los ADN c.d. se tendría una estructura plana isómera de la de Holliday llamada estructura en «X»).

La recombinación específica es decir que se produce solo en sitios concretos, (no-homóloga),puede ser: a) «conservativa de sitio» o simplemente «conservativa»; no necesita RecA ni largas zonas de homología entre exo- y endogenote. Sus enzimas específicos o «recombinasas», actúan como las topoisomerasas de tipo I. El ADN no se replica en esta recombinación. La integración del genoma del fago λ en un punto concreto del cromosoma de la E. coli, o la variación de fase flagelar por inversión de un segmento de ADN de Salmonella typhimurium son dos recombinaciones específicas conservativas.

B) Legítima que requiere cortas secuencias de homología entre el exo y el endogenote (por lo que también se llama «específica de sitio»), que son reconocidas por proteínas específicas, siendo independiente de RecA. La integración de genomas de fagos en sitios concretos del genoma de bacterias receptoras es un ejemplo de recombinación legítima.

En la recombinación específica duplicativa se transponen la mayoría de los elementos transponibles, qie dejan una copia en el sitio original, y generan una copia nueva en el sitio en el que se transpusieron. De este tipo de recombinación es el paso del ADN fágico circular (vegetativo) a profago, en el que intervienen las secuencias attP del fago y las attB de la bacteria, que en la E. coli están entre los operones gal y bio de su cromosoma. Los núcleos de attP y de attB son idénticos, mientras que los dos brazos del fago, P y P', y los dos de la bacteria, B y B' son diferentes del núcleo y diferentes entre sí.

La integración necesita a la integrasa, codificada por el gen int del fago IHF (factor de integración del hospedador), codificado por los genes himA e himD de la bacteria. La escisión es, la inversa de la fusión que regenera el ADN circular del fago. Para esta reacción se necesitan las proteínas Int e IHF, la proteína Xis o escisionasa, producida también por χ.

INVERSIÓN DE SEGMENTOS DE ADN POR RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA CONSERVATIVA

Algunas bacterias cambian con extraordinaria frecuencia su fenotipo que se presenta inestable, de forma reversible. En la mayoría de los casos se debe a recombinación específica de sitio, por el que un segmento del ADN se invierte. Este fenómeno permite cambios adaptativos rápidos y reversibles ante las modificaciones rápidas del ambiente bacteriano, como puede ser la activación del sistema inmune del hospedador.

La inversión se presenta, en las fimbrias adhesivas, en las proteinas de adhesividad o de virulencia y especialmente en la transición de fase flagelar de la Salmonella typhimurium; al cabo de poco tiempo de crecimiento, de un clon con el gen de la flagelina, por ej de tipo H1 aparecen bacterias cuyos flagelos tienen flagelina H1 y otras que los tienen de tipo H2, las cuales proceden de las H1 por mutación que ocurre cada 10^{-7} pero que en la transición aparece con una frecuencia de 10^{-3}.

El gen «hin» de H-inversión codifica una invertasa, que es una recombinasa específica, que reconoce los terminales inversamente repetidos (IR) de 14 pb que limitan al segmento invertible en el que está “hin”. La enzima aproxima a los dos IR, para luego efectuar los cortes y empalmes específicos, actuando como una topoisomerasa de tipo I.

Otra inversión específica de segmentos es la existente en algunos fagos ADN, que tienen un segmento invertible, de modo que en una orientación el fago puede infectar a determinadas bacterias o cepas bacterianas, mientras que con la otra orientación infecta a otras especies o cepas. Esto se debe a que en cada orientación el segmento induce la síntesis de tipos distintos de fibras para adsorberse sobre distintas bacterias. Por ejemplo, el fago Mu, posee el segmento «G», invertible por el producto

del gen gin; ello le permite cambiar de bacteria hospedadora (puede cambiar de Escherichia coli a Citrobacter); el fago P1, posee el segmento «C», invertible por el producto del gen cin.

Los genes hin, gin, cin y otros están relacionados evolutivamente entre sí y con otros genes codificadores de recombinasas específicas, incluyendo las resolvasas de algunos transposones.

La síntesis de fimbrias adhesivas de ciertas cepas patógenas de Escherichia coli viene regulada por una secuencia invertible.

Otra variación de fase ocurre en las pilinas de las fimbrias de la Neisseria gonorrhoe; esta bacteria, dispone de un lote de genes cada uno de los cuales codifica una pilina antigénicamente diferente. Cada clon bacteriano transcribe solo uno de estos genes, permaneciendo los otros latentes, pero cada 10^3 multiplicaciones bacterianas se recombina una copia silenciosa con la que se esta expresando. La copia recombinada se expresa formando una nueva pilina, antigénicamente diferente no reconocida por la inmunidad desencadenada por la pilina original.

Hay una recombinación específica «ilegítima», favorecida por elementos genéticos transponibles. No depende de homologías (ni siquiera cortas) entre el exogenote (en este caso, un elemento genético transponible, como IS o Tn) y el endogenote. También es independiente de RecA. El elemento transponible codifica una enzima llamada genéricamente transposasa que reconoce secuencias específicas inversamente repetidas en los extremos del propio elemento, lo cual se requiere para el proceso de transposición.

La mayoría de los elementos transponibles bacterianos tienen un mecanismo replicativo, llamado recombinación ilegítima duplicativa, en la que la transposición se realiza por una replicación del elemento transponible, de modo que queda una copia del mismo en la posición original, mientras una copia nueva, se inserta en una nueva posición, del mismo o diferente replicón, (p. ej., un plásmido).

BIBLIOGRAFÍA

(1) ABALIA, I.; VARGAS, M. J.; RODRÍGUEZ, E.; UMARAN, A.; CISTERNA, R.; (1987) *Plásmidos asociados a factores de virulencia en cepas hospitalarias de E. coli aisladas de infecciones urinarias. Enf Infec Microb Clín. 5*:456.

(2) Blanco, J.; Gónzalez, E. A.; García, S.; Blanco, M.; Regueiro, B.; Bernárdez, I.; (1988) *Production of toxins by Escherichia coli strains isolated from calves with diarrhea in Galicia (North-western Spain). Vet Microbiol 18*: 297-311.

(3) Blanco, J. y cols.; (1993*) Escherichia coli enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo*. pp. 1-361.

(4) Blanco, J. y cols.; (1997) *Información Veterinaria 177*:25-28.

(5) Blanco, J. E. y cols.; (2000) Serotypes and virulence genes of verocytotoxigenic E. coli (VTEC) isolated from human patients in Spain. In: Verocytotoxigenic E. coli in Europe, 3. Pathogenicity and virulence of verocytotoxigenic E. coli, G Duffy, P Garvey, J Coia, Y Wasteson and DA McDowell, eds, Teagasc, The National Food Centre, Dublin p. 191.

(6) Blanco, M. y cols.; (1992) *Med. Vet. 9:*199-213.

(7) Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Alonso, M. P.; Escribano, A.; (1993) *Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por Escherichia coli enterohemorrágices productores de verotoxinas. Enferm Infec Microbiol Clin 11*:325-334.

(8) Böhm, H.; Karch, H.; (1992) *DNA fingerprinting of Escherichia coli 0157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 30*: 2169-2172.

(9) Karch, H.; Böhm, H.; Schmidt, H.; Gunzer, F.; Aléksic, S.; Heesemann, J.; (1993) *Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing sorbitol-fermenting Escherichia coli 0157:H-. J Clin Microbiol. 31:*1200-1205.

(10) Karch, H.; Meyer, T.; Rüssmann, H.; Heesemann, J.; (1992) *Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of Escherichia coli upon subcultivation. Infect Immun 60*: 3464-3467.

(11) Lvanova, N.; Soroklnt, A.; Yerson, I. y cols.; (2003*) Genoma sequence of Bacillus cereus y comparative análisis con Bacillus anthracis. Nature 423. 86.*

(12) O'Brien, A. D.; Newland, J. W.; Miller, S. F.; Holmes, R. K.; Smith, H. W.; Formal, S. B.; (1984) *Shiga-like toxin-converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226:* 694-696.

(13) Okinaka, R. y cols.; (1999) *Sequence,assembly and analysis ufpXOI and pX02.J. App1. Microbiol. 87,* 261-262.

(14) Read, T. D.; Peterson, S. N.; Tourasse, B. y cols.; (2003) *The genome sequence of Bacillus anthracis Ames and comparison to closely related bacteria. Nature 423: 81.*

(15) SMITH, H. R.; DAY, N. D.; SCOTLAND, S. M.; GROSS, R. J.; ROWE, B.; (1984) *Phage-determined production of vero cytotoxin in strains of Escherichia coli serogroup 0157. Lancet 1*: 1242-1243.

(16) WHITTAM, T. S.; WACHSMUTH, I. K.; WILSON, R. A.; (1988) *Genetic evidence of clonal descent of Escherichia coli 0157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. J Infect Dis 157:* 1124-1133.

(17) WHITTAM, T. S.; WOLFE, M. L.; WACHSMUTH, K.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; WILSON, R. A.; (1993) *Clonal relationships among Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect Immun 61*: 1619-1629.

El bacillus anthracis como agresivo

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

y MANUEL DOMÍNGUEZ DE LA CALLE
Farmacéutico Clinical Research Associated

PASADO

El carbunco es una zoonosis de ovejas, cabras, vacas y menos de cerdos y équidos producida por el Bacillus anthracis. Los griegos lo llamaron anthrakos, por su parecido con el carbón y por la misma razón Hipocrátes lo nombró carbunclo, del que pasó al latín carbunculus,con la que hoy se designa tambíen al rubí. En inglés se llama a la enfermedad «anthrax», término que como el español carbunco, deriva de carbón en griego. Antrax en español designa a una piodermitis caracterizada por un acúmulo de forúnculos,que asienta generalmente en la nuca y en la parte superior de la espalda, pero el Diccionario de la RAL en una segunda acepción la equipara al carbunco y a este como equivalente a sabañones.

Al parecer las V y VI plagas de Egipto que describe el capítulo 9 del Éxodo fueron de carbunco. Igualmente debió tratarse de carbunco la peste del ganado lanar, descrita por Homero y luego por Virgilio (siglo I) quien en la III Geórgica: «cuando vieres desviarse alguna de tus ovejas de las demás buscando la sombra, se retrasa al seguir al rebaño, se tiende mientras están paciendo las demás, ataja al punto el daño»

En los siglos XVII al XIX era enfermedad rural que causaba importantes daños en la ganadería constituyendo una enfermedad profesional

de pastores, ganaderos, esquiladores, veterinarios, carniceros, peleteros, traperos, colchoneros etc.

Microbiología

La enfermedad está producida por el Bacillus anthracis descubierto y cultivado por Robert Koch en 1876, El B. anthracis fue el primer microorganismo que se conoció capaz de producir una enfermedad, abriendo el enorme capítulo de las enfermedades microbianas en la Medicina humana. El carbunco bacteridiano, debido al Vibrio septicus de Pasteur no transmisible al hombre, no tiene ninguna relación con el auténtico carbunco. Es una bacteria inmóvil, gram-positiva, aerobia o anaerobia facultativa de 3 a 10 micras de largo por 1 a 1, 4 de ancho, agrupada en estrepto como cañas de bambú.

Crece bien en agar sangre de cordero produciendo grandes colonias rugosas, ligeramente grisaceas. El bacilo contiene una fosfogliceril mutasa, una sintetasa NAD+. Dispone de numerosos plásmidos cuyo número se puede identificar por un PCR perfeccionado.

Cápsula. La bacteria en medios con bicarbonato y anhídrido carbónico produce una cápsula que rodea a uno, dos y hasta tres bacilos. La cápsula es esencial para la patogenicidad como se observó a comienzos del XX al comprobar que las cepas acápsuladas no eran virulentas. La cápsula está codificada por tres genes situados em un plásmido de 110-kilobases cuya curación suprime la cápsula (Ivins y cols. 1986). La cápsula es un polímero de D-glutámico que le hace resistente a la fagocitosis y contribuye a que resista a la lisis por proteinas catiónicas del suero (Keppie y cols. 1963). Una L-aminoácido-transaminasa del B. anthracis (y del subtilis) a partir de ácido pirúvico y de L-glutámico forma L-alanina (y alfa-cetoglutárico) a la que la alanin-racemasa, transforma en D-alanina. La D alanina con el alfa cetoglutárico por la acción de una D-amino-transaminasa pasa a ácido D- glutámico que al polimerizarse dará lugar a la cápsula. La cápsula es antigénica pero no es protectora. La formación de la cápsula, depende de un plásmido de 110 kb, de Mr $1x10^6$ llamado PXO1, aunque hay cepas como las del Pasteur, que tienen otro, denominado pXO2, con Mr de $60xl0^6$. Los plásmidos pxO1 y pxO2 poseen los ge-

nes cap A, cap B, cap C, cya, lef y pag que intervienen en la formación de la cápsula. La virulencia del B. anthracis está asociada con la clonalidad de los plásmidos pXO1 y pXO2. Coker y cols. (2003) mediante la inoculación a cobayos vacunados con vacuna adsorbida, preparada con 20 cepas de B. anthracis representativas de la diversidad genética a nivel mundial,determinaron el número de copias de pXO1 y de pXO2, lo que junto con la superviviencia, y la clonalidad, les permitió obtener un modelo predictor de la virulencia, el cual fue validado usando un lote de otras 12 cepas de anthracis elegidas al azar. La curación del pXO2 por cultivo durante 3 días en presencia de 1% de novobiocina produce colonias rugosas debidas a la pérdida de la cápsula, al igual que ocurre con las variantes espontáneas rugosas de la cepa Pasteur 6602. Las variantes espontáneas rugosas conservan el pXO2 y pueden revertir a formas cápsuladas, cosa que no pueden hacer las cepas carentes de pXO2. Rodeando a la cápsula hay una cubierta que es un polisacárido de galactosa al que se unen lectinas, permitiendo su aglutinación con antisueros específicos. La virulencia depende de los genes plasmídicos pXO1 (Okinaka y cols. 1999) y pXO2 (Okinaka y cols. 1999), provistos de numerosos transposones, cuyas secuencias varian mucho según sea la cepa de anthracis, lo que sugiere movilidad de plásmidos en el grupo cereus. Los experimentos de hibridización indican la presencia de homólogos de pXO1 en la mitad de 19 cepas examinadas, consistente con lo que se encontró en otros estudios (Pannucci y cols. 2002) Pocos genes desde la isla de patogenicidad pXO1, pXO1-96 a pXO1-1 (Thorne 1993), estan presentes en las 19 cepas del grupo del B. cereus. Unos pocos genes de la toxina, centrales en la patogenia del carbunco se encuentran en el B. anthracis pero no en ninguna de las 19 cepas del grupo B. cereus. En brusco contraste al pXO1, hay pocos genes del pXO2, que hibridizan con ADN del genoma del grupo B. cereus. La razón obtenida por CGH para genes cromosómicos se usa para inferir las relaciones filogenéticas entre las cepas de B. cereus produciendo tres clusters. La transferencia de plásmidos dentro del grupo del B. cereus está bien establecida (Thorne 1993) y hay numerosos genes móviles en el pXO (Cossart 2002). Pese a la evidencia de la variabilidad genómica en el grupo B. cereus, el cromosoma y los plásmidos de virulencia del B. anthracis desarrollan poca variación en su contenido G + C y compo-

sición dinucleotídica (generalmente asociada con genes adquiridas horizontalmente desde donantes situados a distancia, lo que sugiere que muchos genes son nativos del grupo del B. cereus lo que refleja recientes adaptaciones por la adquisición de islas de patogenicidad que contiene el locus de la toxina letal en el pXO1.

El cromosoma tiene al menos cuatro profagos y dos intrones del tipo I uno de los cuales rompe al gene recA (Ko y cols. 2002) algunas de cuyas proteínas intervienen en la patogenia como hemolisinas, fosfolipasas, quelantes de hierro y otras de superficie, utilizables como vacunas o como blanco de medicamentos. Estos genes cromosómicos, intervienen en la virulencia, pero no son determinantes de la misma, ya que casi todas estas proteinas tienen homólogas en los Bacillus cereus y thuringiensis (Guttmann y cols. 2000, Helgason y cols. 2000). Muchas de las proteinas codificadas por genes cromosómicos de la cepa Ames del B. anthracis tienen homología con las proteinas codificadas por el genoma del B. cereus ATCC 10987, una cepa muy relacionada. Solo hay 141 proteinas en el B. anthracis, la mayoria codificadas por genes de función desconocida, son transposasas o estan en las regiones de los fagos, que no tienen funciones en el B. cereus ATCC 10987. En los Bacillus y Clostridium, formadores de endosporas (Kunst y cols. 1997, Nolling y cols. 2001) los ARNr, ARNt y los genes de proteinas ribosómicas se concentran en torno al origen de la replicación, disposición que maximiza la síntesis de las proteinas durante las primeras fases de la replicación del ADN después de la germinación de la endospora en fase durmiente. Las funciones como la replicación del ADN y el metabolismo de los ácidos grasos, están sobreexpresados en el cromosoma.

Varios genes cromosómicos de la cepa Ames del B. anthracis son homólogos de los que intervienen en la patogenicidad del B. cereus y del B. thuringiensis que producen dos hemolisinas de tipo III (BA5701, BA2241) formadoras de canales y un complejo de tres enterotoxinas no hemolíticas (BA1887-1889), y otras entre ellas la fosfolipasa C (BAO677 y BA3891),específica del fosfatidil-inositol y con actividad preferente para la fosfatidil-colina, la intemalina (BA1346 y BA1406), la listeriolisina O (BA3355), el factor sigma B (BAO992) y la proteasa extracelular p60 (BA1952 y BA5474) que tienen secuencias homó-

logas a las que contribuyen a la virulencia de la Listeria monocytogenes (Cossart 2002) bacteria también intracelular. Estas homologías pudieran estar relacionadas con la capacidad del B. anthracis de resistir, sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos. También el B. anthracis contiene un gene que codifica un homólogo de la enhancina, proteina estimuladora, (BA3443), encontrada primero en los baculovirus que infectan a polillas. La enhancina es una metaloproteasa que ayuda a la infección por virus degradando la capa de mucina que rodea al tracto digestivo de los insectos. Un homólogo de la enhancina del B. anthracis lo tiene el genome de la Yersinia pestis, que se desarrolla en mamíferos y en insectos (Parkhill y cols. 2001). El B. anthracis tiene también dos homólogos de la metaloproteasa (BAO672 y BA1295) del B. thuringiensis, que inhiben la inmunidad y aumentan la virulencia en insectos al romper las bactericidas lectinas (Guttmann y cols. 2000). La presencia de estos genes puede indicar infecciosidad en insectos en el antecesor reciente.

Filogenia

Claire Frase, esposa de Craig Venter, ex presidente de Celera, obtuvo en 2003 la secuencia de los 5,2 millones de unidades de ADN que forman los 5.000 genes del B. anthracis, que está depositada en el «GenBank» bajo el número A.E016879. Pese a la gran ubicuidad del B. anthracis, no hay una gran diversidad genética diferenciándose los diferentes aislados en unos pocos nucleótidos, principalmente en las secuencias de los tandem repetidos (VNTR). Se han diferenciado (Keim y cols. 2002), dos ramas de anthracis, la A la más común en todo el mundo y la B que tiene una distribución más restringida aunque en alguanas zonas pueden ser importantes. La fase de espora ha influido mucho en la ecología y en la evolución del B. anthracis.

Una interesante cepa es la Ames, que fue aislada en 1981, en una vaca muerta en Texas, que ha sido utilizada en muchas investigaciones, cuyo genoma fue codificado por Read y cols (2002) que presenta las características descritas en la tabla I. (Read y cols. 2002).

TABLA 1

Característica	*Cromosoma*	*pXO1*	*PXO2*
Pares de bases	5.227.293	181.677	94.829
Número de genes	5.508	217	113
Porcentaje de coficadores de replicones	84,3	77,1	76,2
Longitud media de los genes en «nt»	800	645	639
Porcentaje de G+C del ADN	35,4	32,5	33,0
Operones de ARNr	11	0	0
Operones de ARNt	95	0	0
Operones de ARNs	3	2	0
Phage genest (según las categorias del TIGR)	62	0	0
Transposon genest	18	15	6
Número de genes con indels o con mutaciones puntuales que causan una pronta terminación.	37	5	7
Genes sin función asignada	2.782	65	38
Genes hipotéticamente conservados	1.212	22	19
Genes de función desconocida	657	8	5
Genes hipotéticos	877	122	51

Estas características están de acuerdo con la evolución del B. anthracis a partir del B. cereus, que fue adquiriendo genes plasmídicos codificadores de toxina, de la cápsula y locis reguladores. La estructura de los genes plasmídicos es más variable que la de los cromosomicos.

El ancestro del grupo cereus, al que pertenecen el anthracis, el thurigiensis parasito de los insectos, usado como insecticida y el propio cereus, patogeno oportunista, que causa en el hombre intoxicacion alimenticia (Dixon y cols. 1999) tenia su nicho ecológico en el intestino de insectos. El B. anthracis posee genes para codificar enzimas capaces de digerir la quitina y el quitosán extracelular, y la utilización de N-acetil-

glucosamina constituyentes de estos polímeros, lo que apoya alguna asociacion con insectos. El B. cereus y el B. thurigiensis se diferencia del anthracis solo por unos 150 genes, otro apoyo a la hipótesis de que el anthracis proceda de una bacteria cuyo hábitat fueron los insectos. Posteriormente debio producirse una adaptación que permite al grupo cereus desarrollarse en la tierra. La secuencia genética del cromosoma del B. anthracis revela una bacteria cuyo nicho es la tierra, que posiblemente tiene preferencia para un medio rico en proteinas y que adquirió numerosos genes que le confieren virulencia potencial.

Los bucillees constituyen cerca de cien especies, entre ellas los B.cereus, thuringiensis, mycoides con los que pueden dar reacción de aglutinación cruzada, que se reduce o anula si se tratan con tripsina, mutanolisina, subtilisina o con 8M-urea. Del estudio de los genes cromosómicos no se resuelve si los Bacillus anthracis, cereus y thurigiensis son especies diferentes o variedades de una misma especie (Okinaka y cols. 1999, Helgason y cols. 2000).

Los genes plasmídicos pXO1 (Okinaka y cols. 1999) y pXO2 (Okinaka y cols. 1999), tienen secuencias que varian mucho según sea la cepa de anthracis, lo que sugiere movilidad de plásmidos en el grupo cereus. Las hibridaciones demuestran que la mitad de las cepas tienen pXO1 homólogos, y lo mismo vieron Pannucci y cols. (2002). Las 19 cepas del grupo cereus desde la isla de patogenicidad pXO1, pXO1-96 a pXO1-1 contienen pocos genes.

Solo en el anthracis, el único bacillus virulento (algunos tienen cierta patogenicidad) se encuentran los genes de la toxina. Los genes de pXO1 y escasos del pXO2, pueden hibridar con el ADN del genoma del grupo B. cereus. Thorne en 1993, establecieron la transferencia de plásmidos dentro del grupo del B. cereus, teniendo el pXO numerosos genes móviles (Cossart 2002). Pese a la evidencia de la variabilidad genómica en el grupo B. cereus, el cromosoma y los plásmidos de virulencia del B. anthracis desarrollan poca variación en su contenido G + C y composición dinucleótida (generalmente asociada con genes adquiridos horizontalmente desde donantes situados a distancia, lo que sugiere que muchos genes son nativos del grupo del B. cereus de reflejar recientes adaptaciones por la adquisición de islas de patogenicidad que contienen el locus de la toxina letal en el pXO1.

El B. anthracis carece del factor sigma, el sigD, que tiene el B. subtilis, el cual gobierna una cascada de reacciones del ciclo bacteriano y que es necesario para que se exprese el operon del flagelo (West y cols. 2000). Sin embargo la L. monocytogenes,que es móvil y tiene operón para el flagelo similar al B. anthracis, también carece del gen del sigD (Glaser y cols. 2001).

El Bacillus cereus es una bacteria oportunista que puede causar una toxinfección alimentaria. Lvanova y cols. (2003) obtuvieron la secuencia genómica de la cepa tipo ATCC 14579 de B. cereus, encontrando que la región entre las 0,8 y 1,8 megabases (Mb) tiene 35,3% de G + C, similar al de la media del cromosoma; en la región entre 3,7 y 0, 8 Mb la cantidad de G + C es mayor que el valor medio, y la situada entre 1,8 y 3,7 Mb es menor al de la media. Estas regiones son contigüas con putativos profagos, lo que puede indicar el origen del cromosoma de esta cepa de B. cereus como resultado de una recombinación mediada por fagos entre los cromosomas de bacterias muy próximas. Los B. anthracis y cereus comparten el 75 al 80% de los genes situados en la parte central del genóforo, al menos para las cepas ATCC 14579 del cereus y la A2012 del anthracis lo que apoyaria un ancestro común que no sería una bacteria telúrica como son los Streptomyces spp. o el mismo B. subtilis, que disponen de muchas vías catabólicas para aprovechar los variados hidrocarbonados del suelo procedentes de las plantas. En el subtilis hay 41 genes codificadores de la síntesis de enzimas catabolizadores de hidrocarbonos y solo 14 en el B. cereus y 15 en el B. anthracis, que solo catabolizan el glicógeno, el almidón, la quitina y el quitosán. Probablemente el nicho ecológico del ancestro común del grupo cereus (Margulis y cols. 1998) sería el intestino de insectos, cuya membrana peritrófica está formada por diversas proteinas entre ellas la quitina y sobre todo por mucina; los enzimas quitinolíticos del cereus, homólogos de las zinc-metaloproteasas, degradan a la quitina; cuyos productos de degradación la activan a la enhancina de los virus entomopatogénos como vieron Wang y cols. (1997) con los baculovirus que atacaría a la mucina. En el B.cereus se ha encontrado un sitio potencial para unir la plcR del homólogo de la enhancina del B. cereus. De ese ancestro procedería el anthracis y el cereus, cuyos genomas comparten un grupo de genes entre ellos codificadores de numerosos factores para invadir, estable-

cerse y propagarse de la bacteria con el huésped. Es sorprendente, que el saprofito B. cereus, al menos su cepa ATCC14579 tenga genes codificadores de dos toxinas.

Los genes involucrados en el transporte y en el metabolismo de nutrientes del B. anthracis son muy similares a los del B. subtilis (Kunst y cols. 1997). El B. anthracis es el único bacillus que tiene el gen codificador de la homogentisato dioxigenasa BAO242, que cataliza a la tirosina y los genes codificadores de enzimas que digieren aminoácidos; además segrega mas proteasas y peptidasas que el B. subtilis. El B. anthracis tiene 17 proteinas que se ligan a péptidos ABCc mientras que el B. subtilis solo tiene cuatro; es decir el anthracis, tiene mas capacidad para utilizar aminoácidos y péptidos que el subtilis; la cadena ramificada BrnQ transportadora de aminoácidos tiene nueve homologos en el B. anthracis y solamente dos en el B. subtilis. El B. anthracis, dispone de seis sistemas de flujo de los aminoácidos LysE/Rht que impiden el acúmulo de aminoácidos a niveles bacteriostáticos durante la síntesis de péptidos (Benmann y cols. 2001) lo que permite que el B. anthracis se desarrolle en medios ricos en proteinas, como los animales y el hombre, mientras que el B. subtilis solo tiene dos. En cambio el B. anthracis cataboliza menos los azúcares que el B. subtilis, careciendo de de via catabólica para la manosa, arabinosa y ramnosa, y tiene pocos sistemas de fosfotransferasa y de otros transportadores de azúcares. El B. anthracis contiene un operón completo para la síntesis de poliester, que pudiera funcionar como almacen altemativo de energía.

El B. anthracis dispone un gen que codifica tres homólogos de la transpeptidasa sortasa enzima capaz de unir las proteinas secretadas a los peptidoglicanos de la pared de los Gram-positivos (Panen y cols. 2001); los genes csaABg unen las proteinas con dominios SLH que relacionan a la bacteria con el medio y determinan el carácter liso de sus colonias, que podrián usarse como vacunas.

Pese a a las numerosas proteinas codificadas por su genoma, el B. anthracis produce escasa proteasa extracelular, (Mignot y cols. 2001), posiblemente por la pérdida de la capacidad de segregar proteinas por mutación de los genes reguladores de la expresión del gene al que se debe la secreción. Tienen también una multisubunidad de NADH hidrogenasa

no descrita anteriormente en las bacterias Gram-positivas. El B. anthracis posee una cadena con dos grupos de genes para la síntesis de sideróforos del tipo de la aerobactina, para captar el hierro del medio. Como el B. subtilis y otras bacterias del suelo el B. anthracis codifica una amplia faja de bombas de paso de drogas, y una variedad de genes de resistancia a los antibióticos, aunque no se sabe si influyen en la resistencia clínica, (Tumbull 1999).

El genoma del B. anthracis, dispone de seis pequeñas regiónes. que faltan en casi todas las cepas del grupo cereus. Las regiónes uno a cuatro corresponden a profagos del B. anthracis, la quinta es un elemento de inserción y la sexta es la única en laque no se ha encontrado relacion clara con elementos móviles.

El B. anthracis tiene numerosos genes reguladores entre ellos el atxA que controla la expresión del gen de la toxina. El gen atxA es incompatible con los genes pleiotrópicos situados en el genóforo, plcR, que es uno de los principales genes reguladores de la virulencia del B. cereus y del anthracis (Agaisse y cols. 1999, Salamitou y cols. 2000, Okstad y cols. Mignot y cols. 2001). Es posible que algunos productos del plcR contribuyan a la virulencia estando sus genes regulados por otros genes. En el B. thuringiensis y en el B. cereus, el producto del gen plcR es regulador positivo para la producción de mumerosos enzimas extracelulares al unirse al motivo «TATGNAN4 TNCATA». Agaisse y cols. (1999) encontraron una mutación sin sentido en ese gen. Aunque el homólogo del plcR del B. anthracis esta truncado, hay motivos ligantes de plcR en el cromosoma y dos en el pXO2. El B anthracis tiene genes codificadores de fosfolipasas, enterotoxinas y hemolisimas que son segregadas contribuyendo a la toxicidad; la mutación plcR reduce mucho la lecitinasa, la proteasa y la hemolisina en el B. anthracis (Mignot y cols. 2001). Otro gene codifica un homólogo de la proteina estimuladora, BA3443, o enhancina. La enhancina se encuentra en los baculovirus infectantes de polillas, y en la Yersinia pestis, que se desarrolla en mamíferos y en insectos (Parkhill y cols. 2001). La presencia de CDSs codificadores de factores de patogenicidad del B. cereus, B. anthracis y B. thuringiensis (Agaisse y cols. 1999, Salamitou y cols. 2000) esta de acuerdo con la hipótesis de que estas bacterias proceden de insectos.

Variabilidad genética

La gran variabilidad genética del B. anthracis depende básicamente de las regiónes genómicas llamadas VITA. Hay al menos diez serotipos que se designan con mayúsculas, muchos genotipos y un gran número de subgenotipos. Jackson y cols. (1997) encontraron por PCR en 198 bacilos una región de ADN con polimorfismos caracterizados por la presencia de dos a seis copias del tándem 5'-CAATATCAACAA-3' de 12 pb, situadas en una secuencia mayor que contiene un open reading completo que codifica una proteina de 30-kDa igual en todas las cepas salvo en el número de copias (2 a 6) de la secuencia de 4-aminoácidos QYQQ. Otro polimorfismo consiste en una secuencia de ADN repetida una o más veces, lo que determina que la proteina pueda tener un número diferente del tándem VNTR, que por cierto tambien tienen los bacilos anthrax-like. La no muy grande variabilidad genética del B. anthracis permite que para subtipar las cepas, baste emplear unos pocos métodos.

El sistema de análisis «multiple locus variable number tandem repeat» (MLVA), permite simplificar la determinación del genotipo del anthracis. En 1998 las técnicas de amplificación génica con «primers» demostró,que en el accidente de Sverdlorsk intervinieron varias cepas.

Fouet y cols (2002) vieron que los 50 B. anthracis aislados de amimales en Francia eran de ocho genotipos pertenecientes a dos racimos genéticos; el genotipo B2 era prevalente en el sur y el A1 solo lo hallaron en el norte. El estudio genético de las variantes del bacilo, señala que el B. anhracis procede del sur de África. Las cepas procedentes del Parque Kruger de Sud-Africa, pertenecen a diferentes genotipos (Smith y cols. 1999) lo que indica que se asentaron en el mismo hace mucho tiempo. El subtipado molecular del Bacillus anthracis juega un importante papel en la diferenciación e identificación de las cepas lo que entre otras utilidades puede ayudar mucho a la identificación de la procedencia de los esporas utilizados por el bioterrorismo.

CARBUNCO ANIMAL

Hay amplias diferencias de susceptibilidad de las diferentes especies; el animal más sensible es la cabra, que por ello se le consideró como animal centinela, seguido, los óvidos (el carnero de Argelia es muy resis-

tente), los bóvidos, los osos, y los herbívoros gregarios silvestres. La susceptibilidad depende de:

a) La eficacia de la fagocitosis de los PMN a la que se debe la resistencia de algunas especies. Todo lo que disminuya la fagocitosis favorece la presentación de la enfermedad. La cápsula impide la fagocitosis y por eso las cepas acápsuladas no provocan enfermedad. Asi como los PMN protejen, los macrófagos, actúan en la patogenia.

b) De sustancias bactericidas séricas, derivadas de precursores inactivos; es posible que se trate de un polipéptido o de una histona. Los animales resistentes tienen esas substancias. Al menos en los ratones las deficiencias del C5 del complemento disminuyen la resistencia.

c) Factores ambientales. Pasteur logró producir la enfermedad en la gallina, sumergiendo una o ambas patas en agua fría, y en las ranas manteniéndolas 36-38ºC, posiblemente por afectar a la fagocitosis de los PMN. Las radiaciones y la cortisona rebajan la inmunidad natural, de modo que incluso cepas poco virulentas pueden producir la enfermedad. La dieta también influye. La lisina se requiere para la fagocitosis (Gray, 1963). Las ratas alimentadas con carne son más resistentes que las que se nutren con grano. Es posible que la resistencia de los carnívoros sea debida a la ingesta de proteínas animales. (se ha señalado que los habitantes de zonas con hambre son más susceptibles a la enfermedad).

Al llegar, la bacteria al tubo digestivo. Pasteur decía que entraba por las amígdalas y señaló la importancia de las lesiones orales causadas por ej. por hierbas secas,espinas etc. Penetra en los tejidos en los que germina a las pocas horas, adquiriendo rápidamente la cápsula, con lo cual resiste a la fagocitosis por los PMN. En los cápridos, y en los óvidos, al cabo de 1-5 días de incubación se produce una sepsis fulminante con fiebre brusca y excitación, que pronto pasa a depresión, dificultad cardíaca y respiratoria, temblor, convulsiones, anorexia, trastornos intestinales con dolor abdominal, esplenomegalia y hematuria. Si se trata de una hembra preñada, se produce el aborto, y si lactaba, se suprime la producción de leche o disminuye segregando leche alterada o teñida de sangre. La bacteridia se disemina por el cuerpo ocasionando edemas locales en varias áreas, especialmente en el cuello, sobre las que aparecen pústulas. La sangre se hace incoagulable, presumo que por CID y se producen hemorra-

gias por los orificios naturales. El animal casi siempre muere al cabo de 1-2 días, aunque a veces sobrevive algo más y unos pocos se restablecen. Es importante hacer el diagnóstico diferencial con la dermatitis pustular que afecta a óvidos y a cápridos, causada por el poxvirus Orf.

Los bóvidos, desarrollan sepsis con esplenomegalia intensa, que llevó a denominar al cuadro bacera (también mal de bazo, mal de sangre). Los anglosajones la llaman block bane o veneno negro, pues bane es una palabra que significa, en lenguas teutónicas, muerte, destrucción o asesinato. Otro nombre que se da a la enfermedad es el de murraine o morriña epizoótica, término que parece proceder del francés antiguo, moraine, que a su vez procedería del latín morire. El 80 % de los animales muere en poco tiempo, aunque algunos sobreviven desarrollando abscesos cutáneos y pústulas. Los équidos son más resistentes, pero no es raro el proceso en ellos. Desarrollan sepsis subagudas con trastornos intestinales iniciales y luego hematemesis que ocasiona cólicos. En ocasiones aparecen pústulas.

En los animales hay que hacer el diagnóstico diferencial con la tularemia, las infecciones estrepto y estaflocócicas y en las cabras y ovejas con el orf y con viriasis zoonósica.

Cuando hay cierta resistencia, el proceso tiende a quedar localizado en la puerta de entrada cutánea. El carbunco digestivo es la presentación más frecuente en el cerdo a menudo, en los cerdos la bacteria queda localizada en ganglios, en el intestino o en la piel y puede curar espontáneamente, aunque, si hay afectación de laringe o faringe, la llamada angina carbuncosa puede producir asfixia por el edema gelatinoso que se forma. Se ha encontrado a la bacteria en ganglios submaxilares y mesentéricos de algunos cerdos sanos, sin que se halle en bazo, músculos, etc., lo cual sugiere que ha habido infección sin enfermedad. Redmond y cols. (1997) no encontraron bacilos o solamente unos pocos en la carne de cerdos infectados veintiún días antes por esporas adicionados al pienso aunque llegó a morir el 4%.

Los elefantes pueden padecer la enfermedad. En los zoológicos se han producido brotes en leones, leopardos, pumas, osos, etc. por comer carnes carbuncosas. Los roedores suelen ser resistentes. El visón aleutiano padece la enfermedad aunque coma carne de animales carbuncosos. La inoculación de esporas a ratas mata sólo a un 14 %. El cobaya, en

cambio, es un animal sensible. Los perros y los gatos son muy resistentes, sobre todo los adultos pero pueden morir como el cerdo por edema laríngeo. Las aves, entre ellas los pájaros, son muy resistentes, y lo son algo menos las crías. Se han dado, sin embargo, casos en avestruces (Stein, 1955) y en patos. Shrewsbury y cols. (1952) encontraron la bacteria en las heces de águilas y en el buche del gorrión inglés. Las aves carroñeras que eliminan el ácido úrico por sus heces pueden diseminar la espora. Afecta a menudo a animales silvestres; una epizootia en los años sesenta en el Parque Kigezi obligó a prohibir la caza en el mismo. Los animales de sangre fría, entre ellos, los peces, son muy resistentes. Las ranas también lo son, pero si se inocula una rana y se mantiene a 37-38º C, se desarrolla la infección.

Hábitat

Los tejidos y especialmente la sangre, de los animales con carbunco, contienen varios millones de microorganismos por mililitro que salen al exterior por las hemorragias a través de los orificios externos, y también por la orina, saliva, vómitos, heces a menudo con melenas, y hasta por la leche, si se sigue produciendo. En los países musulmanes, dado que el Corán prohibe consumir cadáveres de animales, los sangran cayendo la sangre a la tierra a la que siembran con billones de microorganismos. También se contamina la tierra con los cadáveres de animales que contienen enormes cantidades de bacilos, cuando se abandonan en su superficie o cuando se entierran someramente. Estos terrenos conocidos como «campos malditos» por que enfermaban la mayoría de los animales que pastaban en ellos. Pasteur en uno de ellos de la región francesa de la Beaucé, descubrió que se formaban, regando tierra con orina y sangre de animales afectados. La presencia de esporas en el suelo forma un foco enzoótico, que perpetúa la infección en los animales que allí pastan. La tierra se puede contaminar con los fertilizantes, a menudo importados, a partir de huesos u otros productos procedentes de animales carbuncosos que pueden contener, no la bacteridia sino esporas. Las aves y animales carnívoros pueden diseminar las esporas. Los bacilos en el suelo, pueden quedar inhibidos por la competición y el efecto antibiótico de la flora telúrica y la de la putrefacción, especialmente por las pseudomonas que pueden llegar a liberar al suelo del B. anthracis, si actúan

antes de la esporulación. Tal vez influyan las aflatoxinas que a una concentración de 10 microgramos por ml inhiben al Bacillus brevis y a la de 15 al B.megaterium (Durmeister y cols. 1966). El hábitat de la espora del B. Anthracis es la tierra; el medio telúrico es el reservorio y en la mayoría de los casos la fuente de infección. La bacteria se encuentra en todo tipo de suelos, con tal de que su pH sea superior a 6 como los calcáreos o los glacial-calcáreos, poco permeables; los suelos ricos en materia orgánica y húmedos contienen muchas esporas; un pH ácido elimina pronto a la bacteria. El B. anthracis prefiere una temperatura de 28-30ºC; en invierno con temperaturas inferiores a los 10ºC la bacteridia puede persistir varias semanas, (Minett 1950). También requiere alta humedad relativa y oxígeno.

Aparte de los campos malditos, hay áreas que originan abundantes casos esporádicos, como el valle inferior del Mississipi, pero en general se puede presentar, en cualquier sitio, incluso en las regiónes áridas y semiáridas de Africa, Asia y Sudamérica. En la primera mitad del siglo XX la mayoría de los casos de carbunco en Canadá se produjeron en Ontario y en Quebec a menudo asociados con pastos contaminados con efluentes de las industrias de cuero que usaban cuero importado. La desinfección desde 1952, de estos materiales redujo la incidencia. A partir de 1962, los brotes en el ganado se dieron casi exclusivamente en las praderas del oeste; entre 1962 y 1993, se produjeron nueve epizoótias en bisontes que mataron al menos a 1.309 animales en su mayoría toros sexualmente maduros, diferencia sexual que se atribuyó a la sequedad del verano precedida de una primavera húmeda y al estrés causado por el frío, aunque es más verosímil que los toros pastaban más que las hembras, en zonas contaminadas. En Rusia a comienzos del siglo XX se producían anualmente unos cuatro millones de casos en animales de uso agrícola contagiados en más de 10.000 focos. La zoonosis afecta a los animales de las reservas y parques de Suráfrica afectando sobre todo a varias especies de gamos. Hacia 1995 se produjeron entre el 26 de enero y el 26 de marzo (verano) en un área en la parte norte del centro de Victoria (Australia) una epizootia que afectó a 202 bóvidos y a cuatro ovejas, en 83 granjas de una zona en la que no había habido casos desde 1914, aunque si había habido casos entre 1880 a 1890. La cuarentena, la restricción de movimientos de los animales, la incineración de sus cadáveres y vacunación resolvieron la situación.

Son hábitats peligrosos los arroyos, las balsas de aguas efímeras que llegan a secarse, los deltas de ríos como el Ródano, el Danubio, el Ganges o los oued marroquíes, en cuyos lechos se abandonan los cadáveres de los animales que contaminan la hierba de los alrededores; cuando en la estación lluviosa, el río o el oued se desbordan, extienden la contaminación. La lluvia arrastra las esporas hacia lugares bajos, concentrándolos. El agua superficial se contamina al pasar por el terreno. Jones (1963) encuentra contaminadas muchas aguas superficiales de EE.UU. En los suelos anegados en los que el agua ha estado suficiente tiempo para desvitalizar o matar las plantas, suele ser difícil aislar el B. anthracis debido a la presencia de B.cereus, móvil y acápsulado y de la de otros muchos microorganismos semejantes.

Es posible el transporte a distancia de las esporas por el viento, por la lluvia, por los animales carroñeros y por fertilizantes elaborados con huesos de animales. En los focos enzoóticos se pueden encontrar diversas cepas de anthracis cuyo ADN tiene distinto número del tandem VNTR demostrable por PCR así como B. anthracis-like. A mi modo de ver esto implica que los bacilos se reproducen mucho en esos suelos o lo que es más probable que la enzootia sea antigua, permitiendo que el terreno se haya contaminado con varias «cosechas» de esporas.

Esporulación

El Bacillus anthracis, como los demás bacillus, puede producir endosporas cuando salen de los animales y van a la tierra. La endospora es esférica u oval (en otras especies es cilíndrico)central,que mide 2 a 5 micras de diámetro, sin superar la anchura del bacilo. La bacteria con la espora forma un esporangio. Las esporas son muy refringentes; requieren para teñirse que se intensifiquen con mordientes, los colorantes, pero una vez teñidas, son ácido-alcohol resistentes.

Para que se produzca la esporulación, se requiere buena viabilidad, y aerobiosis. La putrefacción al abrir los cadáveres, proporciona la aerobiosis necesaria para la esporulación. Los bacilos de los cadáveres abandonados superficialmente, o enterrados a poco profundidad, esporulan e incluso pueden hacerlo los de los cadáveres enterrados profundamente pues son llevados a la superficie por el laboreo, por las lombrices de tie-

rra,por las larvas de insectos o por las hormigas. Si la temperatura es inferior a los 20ºC, el bacilo tarda en esporular, pero si supera los 28ºC lo hace pronto.

La esporulación se desencadena por agotamiento de alguno o de varios nutrientes hidrocarbonados, lípidicos o del NPT y del NDP, derivados del nucleótido tetrafosforilado (ppGpp) producido durante el crecimiento. Se puede provocar la esporulación, llevando los bacilos que han llegado a la mitad de la fase exponencial, lavados (para eliminar cualquier tóxico externo), a SS o a un medio pobre en nutrientes, lo cual excluye la hipótesis de que la esporulación se debería a catabolitos producidos por la utilización de substratos que al comienzo de la fase exponencial la bacteria no utilizaba pues su eliminación por lavado de la bacteria no impide la esporulación. En consecuencia se activa un factor latente, o se inhibe un factor bloqueante de los genes de la esporulación que estaban sin expresarse. Si se adiciona el nutriente limitante antes de que la bacteria alcance la fase estacionaria, se puede retrasar o incluso se impide la esporulación, hasta que se vuelva a agotar dicho nutriente pero a partir de la fase IV la esporulación es irreversible. La esporulación está regulada en el tiempo por un esporulón formado por una serie de operones específicos llamados «spo» con más de 125 genes, situados en cuatro zonas del genóforo. Los operones de la bacteria vegetativa están regulados parcialmente por las subunidades «s» de la holoenzima de la ARN-polimerasa que reconocen a los promotores. Los operones están reprimidos durante el crecimiento vegetativo y se van activando de modo ordenado y secuencial, y una vez que han actuado, se inhiben de nuevo, substituyéndose secuencialmente las subunidades «s», hasta que en la preespora actúan las subunidades sigma de la ARN-polimerasa. El cromosoma del B. anthracis codifica una maquinaria para la esporulacion similar a la del B. subtilis (Kunst y cols. 1997).

Al empezar la fase estacionaria del crecimiento, se integran señales ambientales, que en el caso del anthracis es la presencia de aire, y se pone en función el « sistema de repetidores de fosfatos», que se basa en fosforilaciones sucesivas, que comienzan cuando tres histidín-proteínquinasas ceden su fosfato a la Spo0F; de la Spo0F-P, el P pasa a la Spo0B fosforilizandola, de la que el P pasa a la Spo0A transformándola en Spo0A-P, que es un regulador transcripcional esencial modulado por fosfatasas es-

pecíficas, como la Spo0E. La Spo0A-P, interacciona, con promotores y con unos ARN que tienen las holoenzimas A y H provistas de la subunidad «s», que activan la transcripción de al menos 7 genes y operones que inician la esporulación.

La esporulación se realiza en 7-8 horas (a 37ºC), en siete fases caracterizadas por cambios citológicos y bioquímicos. Cada fase se designa con un número romano, y entre paréntesis la letra «t» con un subíndice que indica el intervalo en horas de cada fase. La esporulación comienza en la fase 0 en la que el bacilo en forma vegetativa al final del periodo de crecimiento exponencial, contiene dos genóforos.

Fase I (t_o a t_1). Los dos genóforos se condensan formando un ancho filamento axial en el centro de la célula, según su eje longitudinal.quedando unido cada uno a uno de los extremos de la célula. En el caso del B.anthracis, se forman dos septos centrales que comienzan por cuatro espículas de la pared enfrentados dos a dos (en el Cl tetani el septo es polar). El septo es una invaginación de la membrana y de la pared bacteriana a partir de espículas situadas en una zona donde se forma un anillo de FtsZ que es una proteína contráctil de tipo tubulina. En esta fase se sintetizan y liberan al medio, antibióticos y exoenzimas, entre ellas serinproteasas, metalo-proteasas, ribonucleasas, y α-amilasa. Se hidrolizan por proteasas proteínas intracelulares, cuyos aminoácidos se emplean para sintetizar proteínas específicas de la esporulación. Al iniciarse el septo se activa en la preespora la nueva subunidad «s», la «s F», que induce la aparición de la «s E» en la bacteria madre; la s E causa la aparición de la « s G» en la preespora, la cual activa una cadena de reacciones que determinan la producción de «s K» en la bacteria original. Mientras tanto, los dos compartimentos siguen dos vías para controlar la transcripción. En la preespora, s F dirige la transcripción de s G, que a su vez dirige la transcripción del gen de la proteína de unión a ADN, la SpoVT. En la célula madre, la s E conecta el gen de otra proteína de unión a ADN, la SpoIIID, que a su vez logra la transcripción y construcción del gen de la s K, que activa el gen del factor transcripcional final, GerE.

Fase II (t_1 a t_2). Se completan los septos, se deposita nueva mureina entre las dos membranas adyacentes. (en los clostridios, un genóforo queda en el compartimento mayor y el 30% del otro se sitúa en el menor que será la preespora); la proteína SpoIIIE es una translocasa que «empuja»

al resto del cromosoma dentro de la preespora antes de que se completen los septos. En esta fase continúa la síntesis de los antibióticos y de las exoenzimas.

Fase III (t_2 -t_3). El protoplasto de la preespora, se independiza de la célula madre. La mureina del septo que se había formado en la fase II, se va degradando desde el centro hasta la periferia, proceso en el que intervienen los productos de varios genes. La membrana citoplásmica de la célula madre va creciendo unidireccionalmente en torno a la preespora, hasta que ésta queda libre en el citoplasma del esporangio. El citoplasma de la preespora queda rodeado por dos membranas la interior de polaridad normal, y la exterior, derivada del crecimiento de la membrana de la célula madre, de polaridad inversa y se detiene la síntesis de proteinas que continúa en la célula madre.

Fase IV (t_3 a t_4). Se forma casi completamente la corteza de la espora. Se deposita peptidoglicano entre las dos membranas y en la pared; se pierde agua que desde 3-4 g por gramo de peso seco de la bacteria baja a 0,3 lo que hace que la preespora sea refráctil en fresco. Comienza la síntesis del ácido dipicolínico, y el acúmulo de Ca^{++} y comienza la síntesis del exosporio.

Fase V (t_4 a $t_{5,5}$).Los materiales de las cubiertas, sintetizados en las fases II y III en la bacteria comienzan a depositarse por fuera de la membrana externa. En el B. subtilis se van ensamblando capas, formadas por unas 14 proteinas diferentes. A esas proteinas se unen gran cantidad de cisteína. Sobre la membrana externa se deposita la proteína SpoIVA que recluta proteínas de andamiaje a la que se une la proteína CotE y a esta la CotD y otras formando laminas visibles en el microscopio electrónico, y finalmente se apone la proteína de cubierta externa CotA que forma parte de las capas externas electrón densas. Sobre esta se depositan las otras proteínas de las cubiertas. Continúa el acúmulo de ácido dipicolínico, que sigue captando iones Ca ++ para formar el dipicolinato cálcico. El compartimento mayor introduce activamente iones de calcio y sigue sintetizando dipicolinato, que es transportado a la preespora en donde forma un quelato que al retirar calcio libre estimula el paso de más Ca^{++}, difusión facilitada por la inversión de la polaridad de la membrana. Al final de la fase V, la preespora ya es resistente al octanol.

Fase VI ($t_{5,5}$ a t_7). En esta fase la preespora madura hasta espora. La corteza adquiere la mureina específica; las cubiertas también maduran, el citoplasma se hace más homogéneo y más electrón-denso. la espora se ha hecho resistente al calor,al cloroformo, a las radiaciones ultravioleta y a la lisozima.

Fase VII (t_7 a t_8). La bacteria original se autolisa y se libera la espora madura. El exosporio si existe, se elimina con el resto de citoplasma, de la bacteria original, como un saco vacío, arrugado, unido a las cubiertas. La espora tiene una concentración de agua inferior a la décima parte de la de la forma vegetativa. La deshidratación se produce al acidificarse el espacio cortical en la fase III, por la entrada de iones H^+ en el protoplasto; compensatoriamente salen muchos iones K^+, junto con moléculas de agua. La pérdida de iones potasio y del calcio por su quelación hace que la corteza se quede sin cationes que no pueden neutralizar las cargas negativas de la mureina cortical; por eso la mureina se expande al repelerse sus cargas negativas hasta que toca a las cubiertas presionando y compactando al protoplasto del que sale más agua, facilitando sus interacciones con los cationes residuales. Asi se forma un gel a base de una matriz formada por macromoléculas y por pequeñas moléculas densamente empaquetadas, unidas entre sí e inmovilizadas.

Endosporas

Están formados por:

1.º Protoplasto equivalente al núcleo («core», en inglés) que contiene un genóforo completo,condensado, los plásmidos y los componentes necesarios para iniciar la germinación.

2.º El citoplasma muy deshidratado, está constituido por una malla de dipicolinato cálcico formado por la quelación de iones Ca^{++} con ácido dipicolínico, (el Ca^{++} constituye el 1 al 3% del peso seco de la espora y el ácido dipicolínico, exclusivo de las esporas, el 10%.) en cuya trama están los demás componentes, entre ellos la envoltura quitinosa con puentes disulfuro, impermeable. El dipicolínico se sintetiza a partir del ácido aspártico por una desviación de la vía que llevaría a síntesis de la lisina y del ácido mesodiaminopimélico de la pared bacteriana.El citoplasma contiene

algunos ribosomas ARNt, cofactores, ARN polimerasa, nucleósidos mono y difosfatados, ácido 3-fosfoglicérico y varias pequeñas proteínas especiales, las SASP, «small acid-soluble proteins», muy semejantes entre sí, de 60 a 75 aminoácidos, que pueden llegar a constituir el 5% de la proteina total de la espora. Las SASP forman complejos con el ADN al que cubren por completo, a razón de un monómero de SASP por cada 5 pares de bases, cambiando su configuración B a la rara A, lo que hace que el ADN resista la acción de los UV. Las SASP son la primera familia multigénica, descrita en las procariotas. Cada proteína está sintetizada por un gen ssp monocistrónico. Los genes de esta familia están repartidos en diversas regiónes del cromosoma bacteriano y han surgido por duplicaciones génicas y diversificación de secuencias. Carece de ARNm, de enzimas para las síntesis, de aminoácidos,de bases nitrogenadas libres, de cofactores reducidos (NADH; CoA), de NTP, y de ATP.

3.º La membrana citoplásmica es la membrana interna de la espora, que rodea al citoplasma; es una bicapa lipídica carente de fluidez, posiblemente como resultado de su estructura policristalina.

4.º La pared está situada por fuera de la membrana interna de la espora, Está formada por un peptidoglicano similar al de la bacteria en forma vegetativa con sus característicos enlaces entre los tetrapétidos.

5.º La corteza o córtex, rodea externamente la pared. Es transparente a los electrones, gruesa, constituida por láminas concéntricas. Está formada por un peptidoglicano parecido al de la pared y aunque el 30% de la mureina tiene unido al acetilmurámico tetrapéptidos normales, solo el 6% de los tetrapéptidos tienen puentes entre ellos. El 15 % tiene solo L-alanina. Esto hace que la corteza tenga estructura de gel que sea mas laxa y flexible que la mureina y que sea capaz de expandirse en ausencia de cationes que neutralicen los grupos negativos del diaminopimélico y del glutámico lo cual también explica su rápida autolisis, durante la germinación de la espora. El 55 % de los ácidos acetilmurámicos forma lactama que hace que la espora sea muy resistente a la lisozima.

6.º La membrana esporal externa, rodea a la corteza. Se forma por una invaginación de la membrana citoplásmica de la forma vegetativa madre. Su polaridad es la contraria a la de la membrana interna de la espora.

7.º Las cubiertas de las esporas están formadas por una o varias proteínas de tipo queratina, muy ricas en aminoácidos hidrófobos y cisteina la mayoria de la cual se apone después de la traducción, por modificación de la proteína inmadura. La cisteina permite numerosos puentes disulfuro, que estabilizan a las cubiertas y las hace muy compactas. Las cubiertas llegan a constituir el 60% del peso seco de la espora; son muy insolubles e impermeables, e impiden la entrada de numerosos agentes químicos, incluidos los que son tóxicos para la bacteria. Las proteinas de la cubierta de las endosporas varían mucho en las diversas especies de bacillus.

8.º El exosporio es una estructura superficial que solo tienen algunos bacillus; puede llegar a tener el 50% del volumen de la espora. Su aspecto varía según las especies. El exosporio está constituido por una mezcla de proteínas, polisacáridos complejos, y lípidos.Su capa interna, de unos 16 nm de ancho está formada por el ensamblaje de subunidades de simetría hexagonal, que dejan unas perforaciones de 7,6 nm de diámetro. Su capa externa de 6 nm de grosor dispone de proyecciones filamentosas de unos 25 nm de longitud. El exosporio es muy resistente a los enzimas proteolíticas. Es posible que el exosporio concentre las de las cubiertas.

Las endosporas son células en estado latente, criptobiótico o de dormancia, en el que casi se anula su metabolismo, y respiración debido a la práctica ausencia de agua. Son practicamente insensibles al medio, lo que les permite pervivir en situaciónes extremas y en ausencia de nutrientes. Son muy resistentes a la acción de diversos agentes químicos como el octanol, el cloroformo, y, por la impermeabilidad de las cubiertas, debida a su gran grosor y a su peculiar composición a base de proteínas ricas en aminoácidos hidrófobos y con abundantes puentes disulfuro (cistinas). Las esporas resisten los 100ºC. durante 15 minutos y algunas incluso los 120ºC. lo cual dificulta la esterilización de los fómites debido a la presencia de macromoléculas formadas por las reacciones intermoleculares y especialmente con los cationes, y a la compactación de sus componentes por la deshidratación.

La resistencia a los rayos ultravioleta depende de la absorción ejercida por el ácido dipicolínico. El complejo de las SASPs con el ADN impide la pérdida de adenina y de guanina y la deshidratación impide que

los UV formen dímeros de pirimidinas adyacentes en la misma cadena. del ADN. Aunque los UV generan 5-timinil-5,6,dihidrotimina, este tóxico no mata a la bacteria pues al germinar se activa un sistema de detoxificación de este fotoproducto; la espora resiste a las radiaciones ionizantes debido a la lactama del murámico; la espora resiste a la lisozima y a las radiaciones ionizantes por la lactama del murámico.

Las esporas no perviven indefinidamente, pero se ignora cuanto pueden persistir viables. Pasteur, Roux y Chamberland las encontraron viables en un terreno en el que se había enterrado un animal que había muerto hacía 17 años. Merchant y cols. (1961) obsevaron la aparición de animales enfermos al cabo de 25 años de haber muerto los casos originarios. Graham (1941), Stein (1955) y Sneath (1962) vieron que las esporas resistían entre 12 y 41 años en escobillones, algodón, papel de envolver, etc. mantenidos en condiciones invariables. Wilson y cols. (1964) observaron que esporas mezcladas con tierra seca guardada en una botella pervivió 60 años. Se han aislado esporas de huesos encontrados en excavaciones arqueológicas en el Parque Nacional Kruger de Sudáfrica, que tenían al menos 200 años de antigüedad.

Las esporas resisten condiciones climáticas adversas incluidas las temperaturas muy bajas. Resisten al menos 45 veces el paso rápido de -72ºC a 37ºC.En contraste con la forma vegetativa resiste a los desinfectantes como el sublimado pero se afecta por el formol. Las radiaciones ionizantes inactivan a la espora, aunque resiste más que el bacilo.

En el suelo la espora puede germinar si las condiciones son favorables, exponiendose a las agresiones del ambiente. En los climas cálidos y secos, la espora tiene poca tendencia a germinar.

Epizootiología

La zoonosis carbuncosa está muy relacionada con el suelo, y aunque los animales se pueden contagiar entre ellos, la mayoría de las transmisiones se realizan a través del ciclo animal-suelo-animal o por medio de la paja, el estiércol, cuadras, pesebres, apriscos o camas, contaminados con esporas. La tierra contaminada es el reservorio que determina focos enzoóticos, que pueden recrudescer la enfermedad. Los animales se infectan

principalmente al comer pastos, piensos a base de harinas de carne, sangre o huesos o al beber agua, contenido esporas procedentes de zonas donde hay cadáveres carbuncosos. Las esporas del polvo pueden penetrar por las abrasiones y por microerosiones cutáneas, pero los animales se contagian en la mayoría de los casos por vía digestiva al comer pastos de los terrenos contaminados. El heno y los piensos de harina de huesos infectados conservan al menos 12 años las esporas. Es muy rara, la transmisión por artrópodos ya que en ese caso la enfermedad sería epizoótica. Thenko atribuyó a los tábanos el 4,5 % de los casos humanos y equinos de Hungría.

El carbunco animal no suele ser epizoótico, sino esporádico con casos aislados relacionados casi siempre con pastar en terrenos contaminados. En el 92% los 492 brotes señalados en Gran Bretaña, en 1964 se afectó sólo un animal; en el brote de Oklahoma de 1957, el 60 % de los rebaños estudiados perdieron sólo una res. En el Tchad (Sirol y cols. 1973), la enfermedad humana se daba en zonas de campos malditos, sin que se presentaran casos en el ganado porque está vacunado, salvo cuando se dejaba de vacunar, y los animales enfermos contagiaban al hombre. Las aguas residuales de tenerías, fábricas de lana etc., pueden contener esporas y en los Estados Unidos se han producido brotes en bóvidos por pastos regados con efluentes de tenerías.

Los animales poco susceptibles, como el cerdo, se infectan difícilmente por vía oral. El contagio es más fácil en verano, pues el polvo contiene esporas que penetran por las heridas que hacen las raíces y las hierbas cortas y duras por la sequedad, y además los animales, al pastar, rozan la tierra con el hocico, por lo que ingieren más fácilmente la espora. En los climas templados, la enfermedad se presenta incluso en invierno. Las epizoótias, tienden a aparecer después de cambios climáticos, como fuertes lluvias, inundaciones o sequías. Los animales osteófagos se contaminan más fácilmente.

En las áreas enzoóticas la enfermedad se presenta en forma endemoesporádica con brotes epidémicos especialmente en verano. En los siglos XVIII y XIX se produjo una epizoótia en el Sur de Europa que devastó la ganadería; en Francia llegó a morir en un año la cuarta parte de sus bóvidos y óvidos. Es posible la presentación de casos esporádicos en zonas declaradas libres de enfermedad debido a la resistencia ambiental de las esporas.

CARBUNCO HUMANO

En 1989 solo declararon casos animales en 82 paises (Fujikura 1990); en Francia se siguen dando casos esporádicos.

Cada vez hay más países exentos. Sigue siendo problema en Asia Central en donde aparece la enfermedad en el ganado estabulado y en el silvestre.

El carbunco es endémico en Afghanistán, Irán, Turquia e incluso aumenta en muchas zonas africanas. Entre 1961 a 70 aparecieron brotes esporádicos el Sudeste asiatico, con máximo en 1967. En En el Delta birmano se produjeron unos 34 epizoóticos que afectaban a una media de 934 bóvidos y caballos; en las areas al este de Mandalay enfermaban cabras y ovejas y poquísimos en cerdos y elefentes, Como consecuencia se presentaron casos humanos de pústula maligna y de carbunco gastrointestinal. En Tailandia en el decenio estaban afectadas 19 provincias con un total de 766 casos humanos, de ellos 42 mortales. En Filipinas casi la mitad de las provincias tenían corbunco. En 1969 se señaló su presencia en 11 provincias de la isla de Luzon en la que se produjeron unos 500 casos en bufalos con letalidad de 44 y un brote em bóvinos con letalidad de 51.

El carbunco es la zoonosis, más típica. El hombre tiene una resistencia intermedia entre la de la oveja y la del perro. La DL oscila entre $10^{5\,a\,8}$ (Lincoln y cols. 1967).

Al comienzo del siglo XX se producían en Rusia un millón de casos anuales de carbunco humano con una letalidad de 25. Actualmente es rara en la UE en donde aparece menos de un caso de media al año (Bemstein 1987, Whitford 1990). En 1958, se produjeron en el Mundo entre 20.000 a100.000 casos. En USA se producían a comienzos del siglo XX una media de 127 cases anuales; en 1966 se dieron 19 casos y actualmente se detecta menos de un caso al año.

En Haití hacia 1975 se producían varios cientos de casos anuales. En Zimbabwe, en 1979-1980 debido al colapso de la sanidad debido a la guerra se produjo una epidemia que afectó a casi 10.000 personas de carbunco de ellos ocho inhalatorio (Davies 1982,83,85).

En España el carbunco es esporádico con algunos brotes causados al manipular productos animales a menudo importados de países con áreas enzoóticas. En el quinquenio 1941-1948 se declararon unos 1.500

casos anuales (1.628 en 1949) que bajaron a unos 250 casos (tabla 2).y en la década 1985-95 a unos 100 casos,(137 en 1990) concentrados en unas pocas regiónes de la Meseta central entre las que se encuentra Extremadura.

TABLA 2

Tasas de morbilidad por carbunco humano por Comunidades Autónomas (1983-1985)

Comunidad Autónoma	*Tasa media anual por 10^5 habitantes*
Castilla-La Mancha	7,24
Extremadura	2,82
Aragón	2,71
Castilla y León	1,39
Navarra	0,98
Madrid	0,42
Rioja	0,38
Andalucía	0,38
Murcia	0,36
Baleares	0,12
Asturias	0,07
Cantabria	0,06
Valencia	0,03
País Vasco	0,02
Canarias	0,00
Galicia	0,00
Ceuta y Melilla	0,00
Cataluña	0,00
ESPAÑA	0,72

Carbunco cutáneo. Epidemiología

El hombre sufre la enfermedad, pero no interviene en su transmisión, ya que no contagia ni a otros hombres ni a los animales. La fuente de infección del hombre son los animales enfermos, y sus productos, transmitiéndose por contacto (inoculación) accidental, o lo que es más frecuente, de modo profesional en agricultores, trabajadores pecuarios, pastores, esquiladores, carniceros, labradores, matarifes y veterinarios, que manipulan el animal vivo o sus productos frescos, y que pueden sufrir salpicaduras de sangre, carne, estiércol, etc.

Enaus y Chaussier, en su «Breve tratado de la pústula maligna», traducido por Piñera y Siles, y publicado en España en 1787, escribieron: «la pústula maligna nunca ataca sino a los vaqueros, pastores, labradores, albéitares, zurradores, carniceros y generalmente a los que tocan y cuidan las reses, manosean sus pellejos, laban (sic) las lanas o las trabajan todavía recién esquiladas». Dado el mecanismo de transmisión es lógico que se trate de una enfermedad ligada a determinados trabajos ganaderos y por ello profesional. Por ej. los 120 casos tratados en el «London Hospital» entre 1884 t 1954 tenian estas actividades:

TABLA 3

Actividad	*Porcentaje*
Trabajadores de muelles especialmente cargadores de Londres y Liverpool	42,14
Trabajadores de la construcción	41,16
Trabajadores de mataderos	5,8
Otras actividades	10,78

También en Gran Bretaña Henry encontró esta distribución de los 743 casos recogidos entre 1915 a 1925 y en los 479 entre 1933 a 1952 por actividades:

TABLA 4

Actividad	*Porcentaje entre 1915-1925*	*Letalidad*	*Porcentaje entre 1933-1952*	*Letalidad*
Trabajadores de la lana	55,5	14	133,18	6
Trabajadores de crines	7,6	23	5,42	11
Trabajadores de cueros y pieles	27,8	10	49,25	8
Otras industrias	4,3	22	12,14	21
Descargadores de puertos	4,3	31		

En el Hospital del Rey, ingresaron entre 1927 y 1974 157 casos de varones y 63 de mujeres cuyas profesiones fueron por orden decreciente: pastores y vaqueros, obreros del campo, amas de casa que prepararon carne de animales enfermos, carniceros y matarifes. Pinedo (1965), basado en los 1.238 casos declarados en la provincia de Teruel desde 1941 a 1962 estableció la siguiente proporción de casos según la actividad:

TABLA 5

Actividad	*Porcentaje*	*Actividad*	*Porcentaje*
Amas de casa	30,70	Esquiladores	0,48
Labradores	23,74	Ordeñadores	0,32
Pastores	23,37	Albarderos	0,26
Escolares	7,51	Tratantes	0,24
Carinceros	2,34	Herradores	0,24
Manipuladores de pieles	1,93	Veterinarios	0,16
Lactantes y sin profesión	0,94	Gamaderos	1,68
Matarifes	0,80	Otros	0,51

Los mecanismos de transmisión de estos 1.238 casos por cien, fueron:

TABLA 6

Contacto con animales domésticos	26,81	Colocación de apósitos a animales	0,08
Manipuación de res enferma o sospechosa	26,41	Contacto interhumano	0,32
Picadura de insectos	11,87	Manipulación de estiércol	0,40
Manipulación de pieles	5,08	Salado de carnes	0,16
Ingestión de carne	2,80	Polvo de granero	0,08
Lavado de lana	0,16	Tierra de labor	0,16
Lavado de intestinos	0,16	Aperos de labranza	0,16
No especificado en historia o desconocido	24,07		

Se han dado casos en trabajadores de muelles y de transporte al cargar embalajes que contenían lanas, etc., o pellejos confeccionados con piel de animales enfermos. Los cueros importados a Liverpool tenían esporas entre el 3,1 % en los procedentes de bóvidos de Argentina a 64 % en las pieles de ovejas de Africa occidental. Sin embargo, entre 1947 y 1952 sólo se produjeron 130 casos en trabajadores que manejaban cueros y pieles. En Oriente Medio se producían casos por secar la piel depilada en casas de baños. Se han dado casos en estibadores y cargadores de huesos importados.

Un caso curioso relatado por Faure fue el de un carnicero que desarrolló una pústula maligna en el labio inferior, por haber despellejado a una vaca insuflando aire con la boca. Lakshmi y cols. (1992) comunicaron un brote de 25 casos de carbunco humano causado por el contacto con una vaca Jercy con carbunco y por el consumo de su carne poco cocida. 18 tuvieron pústula maligna, que curaron con la terapia, 6 con carbunco intestinal,y uno con ambos procesos; dos de estos eran niños que fallecieron y 5 adultos que sobrevivieron.

Aunque en los animales se da en toda época, en el hombre, la enfermedad aparece casi exclusivamente durante la recrudescencia primaveral de la enzootia y sobre todo al final de ella en septiembre y después en

agosto y julio. Gamter relaciona la aparición de la enfermedad en Marruecos a fines de agosto al rascado debido al prurito producido por el calor, el sudor y al polvo esparcido en esa época por el esquileo. Las bacteridias de la sangre y de otros productos y las esporas del polvo entran por erosiones, especialmente las de las partes descubiertas, más expuestas. Es el contacto con materiales de los animales enfermos desde sus carcasas pieles, pelos, lanas, huesos.

La transmisión puede hacerse por fómites. El Levítico dice que el carbunco se puede transmitir por vestidos, y Virgilio describió una epidemia por el uso de pieles, cuero, lana, pelo, cerdas, etc. de reses enfermas en donde la bacteridia resiste unos 15 días, y muchos años las esporas, pues estos no se inhiben por los microorganismos ambientales. Vicq d'Azir (1748-1794), fundador de la anatomía comparada, en su «Médecine des bétes á cornes», publicada en París, en 1781, relató el caso en una persona que había manejado la piel de un animal que había muerto de carbunco 6 meses antes. El lavado, el teñido y la confección del tejido en el caso de la lana reducen mucho el riesgo y el tanizado, especialmente la inmersión en cal que destruye a las bacterias. En la Primera Guerra Mundial se dieron casos en soldados rusos que usaron abrigos de piel de carnero, apareciendo la pústula, sobre todo, en las zonas de roce o en donde estaba la piel macerada. Aún son peligrosos el pelo de cabra y la lana procedente de Oriente Medio asi como las crines de China y de la URSS. Piédrola describió un caso en una mujer cuya falda se manchó con carne que estaba cocinando. En la guerra civil de 1936-39 enfermaron unos soldados que descansaron en un terreno sobre el que se había sacrificado ganado enfermo, en la provincia de Toledo. Otros fómites son los instrumentos que usan los esquiladores, ganaderos etc. Están. expuestos los trabajadores de mataderos que transportan huesos en sacos y los obreros de las fábricas de gelatina (Marchaud, 1967). En estos trabajadores, las lesiones son casi exclusivamente cutáneas, sobre todo en la cabeza, en el cuello y brazos, debido al roce.

El sebo, la cola, la gelatina y el carbón animal (usado para refinar azúcar, o como adsorbente de tóxicos), se obtiene de los cascos, los cuernos y los huesos tratados con calor y con substancias químicas que eliminan a las esporas, por lo que no suponen riesgo. Tampoco lo tiene la harina de hueso usada para enriquecer los piensos con sales cálcicas, pues

se trata con vapor de agua. En cambio el triturado de cuernos y de huesos para fertilizantes,produce mucho polvo que puede ser peligroso. El 85 % de 21 muestras de harina de hueso, importadas a Inglaterra en 1959 desde Pakistán y la India, tenían esporas.

En 1957 se produjeron inesperadamente, cinco casos de carbunco respiratorio, en manipuladores de pelo de cabra en Manchester, con 4 muertes. Una persona que padecía sarcoide de Beck quiescente, solo estuvo expuesto una vez en la que pasó por el recibidor abierto de una tanería (Brachman y cols.1961).

En diciembre de 1973, un barco hospital de Estados Unidos estaba anclado en Puerto Príncipe (Haití), en donde había habido anteriormente unos 40 casos de carbunco. Una periodista que viajaba en el barco bajó a tierra el día 13, no tuvo contactos con ningún enfermo, pero compró bongos y un gran congo (especie de tambor de madera con funda de piel de cabra, en la que quedaban franjas de pelos intactos). El día 28 desarrolló un carbunco en el párpado izquierdo; en dos tambores se encontró el B. anthracis. Los Centers for Diseases Control encontraron la bacteria en el 5 % de 124 tambores y en dos caretas de piel curtidas. Flye Sainte Marie vio casos en Marruecos ocasionados por almohadas de piel de cabra, que ocasionaron pústulas malignas en el ángulo orbitario y en otras zonas de la cara. Era clásico el carbunco producido por brochas de afeitar confeccionadas con pelos de animales enfermos. El 16,7% de los 120 casos tratados entre 1884 y 1954 en el London Hospital se debieron a brochas. Piédrola cita el caso de transmisión por una navaja de afeitar que se había utilizado para rasurar animales enfermos. Los bacilos pueden quedar viables en los frotis sobre porta y se ha producido al menos un caso de carbunco por esta causa. Se han señalado casos por contacto con piensos o con abonos contaminados, incluso por cosechas cultivadas en suelos con esporas.

Se ha descrito la transmisión mecánica por medio de insectos. La mosca doméstica puede vehicular las esporas pasivamente. Magnin, en 1874, señaló el papel importante de las moscas en la transmisión. Raimbert transmitió la enfermedad al cobaya, al que inoculó triturado de moscas que 24 horas antes habían estado sobre el cadáver de un animal carbuncoso. Poco papel puede tener las moscas de la carne, tales como las Sarcophila, Wohlbartria o Sarcophago, pues sólo chupan sin perforar la

piel de los animales. Davaine logró transmitir la enfermedad al cobaya, al que había inoculado un triturado de estas moscas. Su papel en todo caso sería pasivo, transportando esporas de un lugar a otro, lo que también realizan los animales, especialmente las aves, carroñeros.

Los artrópodos picadores al chupar sangre de los animales enfermos o de sus cadáveres absorben millones de bacteridias, ya que la sangre es incoagulable, y pueden así teóricamente transmitir la enfermedad (Davies 1958). Los casos debidos a picadura de artrópodos son lógicamente cutáneos y suelen afectar la cara, sobre todo los párpados en donde pican cuando la persona duerme. Piédrola vió un caso en el pecho de una mujer que fue picada mientras lactaba. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los datos se obtienen del interrogatorio de los enfermos, y, si hubo una picadura días antes, más o menos próxima, hay tendencia a indicar la picadura como origen de la enfermedad. Además, la enfermedad es pruriginosa y se parece inicialmente a la picadura de un artrópodo, lo cual aumenta la tendencia a pensar que la causa era esta picadura que se complicó después. Pinedo (1965) atribuyó a esta causa el 11,87 % de los 1.238 casos vistos en Teruel, entre 1941 y 1962. Se ha incriminado a la mosca de los arrozales, a la mosca equina, etc. Leroy des Barres transmitió la enfermedad inoculando triturado del ácaro Glycifago del suelo de talleres donde se trabajaba con productos animales. Las larvas y adultos del Dermestes vulpinus eliminan con sus heces la espora carbuncosa. Los cabileños marroquíes confieren al redúvido «Bounif» un papel transmisor. Los atrópodos se pueden contaminar al picar a animales vivos (no pican a los cadáveres) pero la bacteria persiste en el artrópodo poco tiempo por lo que su papel transmisor es poco importante. En Laponia en donde hay muchos tábanos, la incidencia del carbunco, es baja, pero en el Mediterráneo la situación era la contraria. Sirol y cols. (1971) achacaron a la picadura de un tábano en la cara externa del codo a una mujer francesa de 39 años en el Tchad, zona en la que apareció a los tres días una pústula maligna. Un caso literario se debe al novelista Henry Murguer (1822-1861), quien en su novela «Zueco» publicada en 1860, relata que un carretero que había recogido el estiércol derramado, «lanzó de pronto un juramento que expresaba mas susto que cólera, y arrojando enseguida al suelo su horca, aplastó una mosca negra y velluda, cuya picadura había dejado en su epidermis un punto negro. ¿Que tiene usted? —Le preguntó Mélie, atraída a su lado por su grito e inquieta por la palidez que cubría su cara. Sin responderle, el carretero entró en la cocina, cogió rápidamente unas tenazas que halló

en un rincón del hogar, y las metió en el incandescente brasero. Su silencio y la rapidez de sus movimientos expresaban un terror invencible. Retiró del fuego las tenazas al rojo blanco,y con pulso firme llevo el hierro humeante, a la picadura. Manteniéndolas fuertemente sobre la misma hasta que el terebrante dolor producido por la cauterización le obligó a soltar las tenazas, que cayeron enrojecidas, no ya por el fuego, sino por la sangre de la llaga que acababa de abrir. El carretero pidió por señas que le diesen un vaso de agua, que tomó con avidez de manos de Mélie. —Gracias—, le dijo, dando un suspiro de alivio, y como hablando para si agregó, contemplando su brazo, que había envuelto con un pañuelo. Ahora ya no hay peligro. —¿Lo hubo, pues?— dijo la muchacha, que todavía no se había percatado de la gravedad del accidente. —¿Usted no había visto que la mosca que me había picado era una mosca carbuncosa?, un animal de carroña. A un hermano mío, le picó una de esas moscas, y al cabo de diez horas estaba muerto y tan negro como el paño que hubiese cubierto mañana mi cuerpo si no hubiera tomado mis precauciones.»

Clínica del carbunco cutáneo

La «Pústula maligna» o antrax cutáneo es la forma clínica habitual, que presenta el 96 % de los casos. Por la gran resistencia que tiene el hombre, el proceso queda acantonado en la piel. Besredka decía que «si el hombre no tuviera piel, no padecería carbunco». La localización depende de la puerta de entrada. Por ello predomina en las partes descubiertas y varía según la actividad profesional. Curiosamente, en los dedos y antebrazo, que tanta relación tienen con objetos contaminados, es rarísima; se ha señalado en carniceros. La localización labial se debe al hábito de mojar cuerdas con saliva metiéndolas en la boca y por eso es frecuente en tejedores e hilanderos. Las lesiones de los 1.234 casos ocurridos en Teruel desde 1941 a 1962 se localizaron (Pinedo) de este modo tabla 48-4.

No son raras las lesiones en zonas intertriginosas, como en el cuello, en los pies y en la zona del cinturón. En porteadores de sacos, las lesiones pueden asentar en nuca y en la espalda, y son muy raras en la ingle.

La transmisibilidad es baja ya que requiere contactos reiterados y una puerta de entrada del bacilo o de la espora a través de soluciones de con-

tinuidad de la piel, causadas por espinas, huesos, artrópodos, etc., o por roces repetidos. A esta circunstancia, creemos que se se debe el que la lesión sea casi siempre única. Fue descrita por Maret, en 1752. Al cabo de 1 a 5 días aunque en ocasiones llega a los diez,aunque se han señalado casos de hasta ocho semanas, aparece en la puerta de entrada una mácula roja de unos pocos milímetros de diámetro, que puede estar precedida por prurito, que pasa en 1.2 días a vesícula de 1-2 cm de diámetro que contiene un líquido con algunos leucocitos y muchos bacilos que enseguida pasa a pápula eritematosa, pruriginosa, poco dolorosa, a la que por su parecido con la picadura de una pulga se la llamó «pulga maligna». La lesión es única aunque excepcionalmente han aparecido hasta tres pústulas.

Enaus y Chaussier escribieron, hacia 1796, que «la primera impresión del mal es semejante a la ligera picadura de un insecto». A las 10-18 horas aparece a menudo en su ápice una vesícula, pequeña, aunque puede llegar al tamaño de un garbanzo, de base consistente y que, al abrirse por el rascado, da salida a un contenido serosanguinolento, que puede tener algunos PMN, sin llegar a pus, salvo que se añada una infección piógena. En dicha serosidad o en el exudado de las escarificaciones de la pápula se encuentran muy abundantes bacterias. A los dos días aparece en el contorno del eritema una corona más o menos regular de vesiculitas del tamaño de una cabeza de alfiler, al principio claras y brillantes, y que luego, al crecer, pasan a un color azulado con contenido oscuro o teñido de sangre. Es la areola vesicular de Chaussier o collar de la reina. A veces faltan las vesiculitas o están relativamente alejadas de la escara; en otros casos son grandes —bullas— con líquido serosanguinolento. Cuando aparece el anillo de vesículas, la pápula central se ulcera y rápidamente se seca desarrollándose en su base una típica escara al principio amarilla que pasa enseguida a negra, seca, dura y deprimida como un trocito de carbón de 1 a 14 mm debida a la necrosis superficial, que se desprende hacia la 2-3 semanas, dejando a menudo cicatriz, lesión a la que se debe su nombre en español e ingles. Rodeando a esta lesión hay una zona de edema gelatinoso indoloro. Puede aparecer linfadenopatía regiónal dolorosa. El cuadro progresa aun cuando se administren antibióticos, hasta la formación de la escara, aunque hayan eliminado el bacilo.

En pocas horas, la escara sigue extendiéndose y aumenta el número de vesiculitas, de modo que, hacia el quinto día, la escara es gruesa, ne-

gra y muy adherida a una zona de eritema. El conjunto se parece a un ágata sobre un rubí rodeado de perlitas, y montado en la escarapela roja de un intenso edema de diversa extensión. El líquido del edema está constituido por exudados fibrinosos y sanguinolentos. No hay pus, salvo en los casos raros en que hay infección secundaria. Los bacilos pueden extenderse a lo largo de los linfáticos, causando linfangitis, sobre todo en las formas graves, e hipertrofia de los ganglios regionales que están ligeramente sensibles, blandos y de color oscuro azulado. El infarto ganglionar puede durar bastante, aunque desaparece espontáneamente y más rápidamente con el tratamiento. Inicialmente hay infiltración de macrófagos que engloban a los microorganismos y a algunos neutrófilos.

Pronto se sobrepasa la capacidad fágica de aquéllos y los microorganismos quedan libres en la lesión. La lesión se acompaña de edema, discreto inicialmente, que progresa rápidamente, de modo que hacia el tercer día puede ser grande y si afecta tejidos laxos, puede ser enorme, distendiendo y fragmentando al tejido conectivo.

Cuando la lesión afecta al párpado se inicia con conjuntivitis que rápidamente se hace muy intensa; el edema palpebral, se extiende, en torno al ojo, a cara y frente, adquiriendo un tono azulado. Cuando el edema afecta al cuello, puede infiltrar a la glotis y al mediastino, ocasionando disfagia, afonía, insuficiencia respiratoria y colapso y comprimir la tráquea, y extenderse a órbita, pecho y especialmente si la lesión está en el tórax llegar hasta al escroto.

La pústula suele evolucionar favorablemente, desprendiéndose la escara en unos 15 a 30 días, pero puede infectarse secundariamente y en este caso, la lesión cicatriza lentamente. La cicatriz puede ser retráctil, exigiendo cirugía reparadora, si asienta en párpados, boca o flexuras.

Los fagocitos de los sinusoides marginal e intermedio de los ganglios engloban y destruyen a la bacteria, pero en las infecciones intensas se produce dilatación hemorrágica de los sinusoides y se desintegran los ganglios bloqueando los linfáticos. Si la linfagitis es muy marcada, se debe sospechar una infección secundaria.

TABLA 7

Localización de las lesiones carbuncosas en 1.234 casos humanos vistos por Pinedo desde 1941 a 1962

Localización única %		*Localizaciones múltiples %*	
Mano	35,62	Ambas manos	0,24
Antebrazo	19,38	Antebrazo y manos	0,41
Cara	18,01	Antebrazo y brazo	0,32
Cuello	5,75	Cara y cuello	0,16
Párpado	3,87	Cuello y antebrazo	0,08
Brazo	2,90	Ambos antebrazos	0,16
Muñeca	3,73	Cara, cuello y antebrazo	0,08
Labio	1,93	Cara y tórax	0,08
Pierna	1,70	Cara y antebrazo	0,08
Rodilla	0,41	Ambos brazos	0,16
Pie	0,32	Cuello y dorso	0,08
Tobillo	0,16	Cara e intestino	0,08
Muslo	0,15	Ambos senos	0,16
		Región lumbar	0,08
		Sin especificar	0,73
		Región dorsal	0,08
		Cuero cabelludo	0,24
		Intestinal	0,24
		Oreja	0,24
		Nariz	0,81
		Tórax	0,73
		Abdomen	0,32

La escara puede faltar o ser mínima. A veces se dan en el mismo paciente mas de una lesion típica.

El paciente tiene malestar cefalea. La septicemia es en el hombre muy rara.

Edema maligno

Es una forma clínica del carbunco, sín pústula y solo aparece un edema precoz y extenso, debido a la inoculación directa del bacilo en el tejido celular subcutáneo, en el que las esporas germinan y los bacilos se multiplican rápidamente liberando las toxinas que producen el pronunciado edema causando, septicemia y necrosis tisular. Es una forma menos frecuente que la de la pústula y mucho más grave. El edema es enorme, duro, caliente, indoloro, brillante, rosado a rojo violáceo y surcado de manchas debidas a la extravasación de sangre. En su superficie aparecen ampollas irregulares que contienen un líquido cetrino a menudo turbio. Hay adenopatías satélites. El edema maligno asienta más a menudo en los párpados y en la cara, invadiendo rápidamente el ojo, nariz, boca, orejas, mejillas, etc., deformando la cara. Puede dar escara por distensión, diferente de la escara de la pústula. La evolución es muy rápida, soliendo curar en 2-3 días.

Los pacientes con carbunco cutáneo tienen pocas molestias; el sensorio es normal, sin ansiedad pese a que suele estár muy afectado el estado general. En el 52% se presenta fiebre de hasta 38,5º'C con escalofríos; en otros casos aparece rápidamente hipotermia lo cual es de mal pronóstico. Puede haber cefaleas, sobre todo al principio, astenia, quebrantamiento, anorexia y oliguria. Son signos de gravedad la presencia de vómitos y un pulso rápido y débil. Hay leucocitosis, superior a los 20.000 leucocitos por mm^3 con neutrofilia de un 80 % y discreta desviación a la izquierda. Los anticuerpos aparecen en la convalecencia y no se producen en las formas graves que matan antes de formarse las inmunoglobulinas, predominando la IgG3 en los convalecientes y mas tardiamente la IgG1; en los vacunados aparecen las cuatro subclases de IgG. Es rarísimo padecer dos veces el carbunco no por inmunidad sino por la poca frecuencia del proceso.

Complicaciones

Las formas cutáneas del carbunco pueden causar trombosis, especialmente de senos, gangrena miocarditis. El edema puede afectar al cuello, comprimiendo la laringe y la tráquea, y extenderse a órbita, pecho y hasta al escroto. Cuando afecta el tórax, puede producirse también edema en las zonas próximas y en el pulmón, con asfixia, colapso, hemorragias y fallo renal con necrosis papilar, cuadros que confieren al carbunco una alta letalidad.

No suele ser necesario hacer el diagnóstico diferencial del carbunco cutáneo, pues la clínica suele ser clara. Inicialmente puede confundirse con un forúnculo y con otras estafilococias cutáneas. El forúnculo está centrado por un pelo, es pustuloso y doloroso y carece de escara. La erisipela está delimitada por un resalte, es dolorosa, y se acompaña desde el principio, de fiebre. El chancro luético no tiene vesículas ni escara. Las picaduras de artrópodos en la cara pueden ocasionar un gran edema. Producen una escara instantánea y pequeña. Al pasar sobre ella una torunda con amoníaco toma color pardo (signo de Girouard). Los flemones dentarios, muy dolorosos, están relacionados con caries u otras infecciones de las piezas dentarias. En los eczemas agudos, el edema es menos intenso. El zoster ocular tiene menos edema y es muy doloroso.

Carbunco digestivo. Epidemiológía

Es poco frecuente. El vehículo habitual del carbunco digestivo es la carne, las vísceras poco cocinadas y la leche, si se sigue produciendo; estos productos pueden contener la bacteridia en forma vegetativa, siendo poco frecuente que tengan esporas, salvo tal vez en la parte externa en contacto con el aire. Ya Virgilio observó el contagio del hombre por comer carne de animales enfermos. También puede transmitirse por agua contaminada. La salazón, la cocción, el asado y los jugos digestivos, destruyen la forma vegetativa, lo que explica que los pobres que comen carne de animales enfermos o los que consumían corderos enfermos, procedentes de los campos de la Beaucé cuando había carbunco, no enfermaran o solo tuvieran la forma cutánea y no la intestinal. En cambio la espora resiste a esos tratamientos. Se han encontrado esporas a los 8 meses de

haber sido confeccionado un embutido. Para algunos, el carbunco intestinal sería una variante de la forma septicémica. Sin embargo, es clara la relación con la ingesta.

Para que se produzca la enfermedad, tienen que haber entrado suficientes esporas. Loefler encontró que la ingesta de un número pequeño de esporas no solía provocar la enfermedad y Opperman concretó en 33.000 las esporas necesarias para producir la enfermedad por vía oral. El número de esporas necesarias para producir carbunco cutaneo está en relación inversa con las puertas de entrada en las mucosas; si hay erosiones por espinas se necesitan pocas esporas. Chamberland y Pasteur vieron que corderos alimentados con forraje impregnado con cultivos de la bacterídia, rara vez enfermaban, pero que lo hacían fácilmente si se añadía al pienso cardos o barbas de espigas. Los animales osteófagos se contagian más fácilmente. En el Sudeste asiático se producían bastantes casos de carbunco intestinal por comer productos de animales enfermos. En 1961 se señalaron 10 casos humanos con gastrointestinales por comer carne de elefante.

La enfermedad puede aparecer en forma de brotes en personas que han consumido el alimento contaminado como cualquier toxiinfección alimentaria. En Djekarta (Indonesia) se produjeron en 1971 75 casos por comer carne de animales sacrificados clandestinamente. Un interesante brote ocurrió en el poblado de colonización pacense, Guadiana del Caudillo. Entre los días 1 y 19 de septiembre de 1972 enfermaron treinta personas de las que fallecieron 3 de 15 a 17 años, con un cuadro gastrointestinal fulminante, habiéndose encontrado en el líquido ascítico de uno de ellos al B. anthracis. En la encuesta epidemiológica se comprobó que el dueño de una pequeña chacinería, su esposa y un hijo habían padecido previamente una pústula maligna contagiada, sin duda por contacto con carne de cabra que había adquirido en la primera quincena de septiembre de 1972, sin control sanitario alguno ni constarle la procedencia de dichas carnes. Parte de la carne fue vendida como tal, sin que produjera carbunco en los consumidores y parte la mezcló con carne de cerdo para hacer chorizos que habían comido los afectados. Curiosamente la Voz de Galicia del día 27 de septiembre de 1972 denominaba al proceso «antracosis». Se intervinieron los embutidos elaborados en dicha chacinería, en los que se encontró el Bacillus anthracis, se informó al juzgado poniendo a su disposición las existencias y comunicándosele

por considerar que había indicios racionales de delito contra la salud pública. El fiscal solicitó para el carnicero 16 años de reclusión, más multa e indemnizaciones y la acusación privada 18 años y cuatro meses de cárcel, más una indemnización de cuatrocientas mil pesetas a los familiares de cada víctima, por un delito contra la salud públ1ca mientras que la defensa pidió la absoluclón o, condena de seis meses, de arresto por una infracción múltiple. La Audiencia de Badajoz condenó al carnicero a seis años de prisión por imprudencia temeraria y a una indemnización de 900.000 pesetas a los herederos de cada uno de los tres fallecidos y 26.000, y dos indemnizaciones de seis mil pesetas a tres afectados. La sentencia fue confirmada el 4 de mayo de 1974 por el Tribunal Supremo. El carbunco intestinal puede dar pequeñas epidemias. En 1979 se produjo una gran epidemia de carbunco (y peste) en la antaño floreciente región de Kompong Speu en Camboya por haber comido carne de animales enfermos, hecho explicable dada la hambruna en que vivía el pueblo sometido a los jemeres rojos que desde 1975 a 1979, asesinaron a 150.000 personas y obligaron a destruir los edificios modernos, incluidos los hospitales, pues los consideraban como pertenecientes a una «época moderna» imposible de ser aceptada por una sociedad «gloriosa e igualitaria».

Clínica del carbunco digestivo

Se debe a la ingesta de carne insficientemente tratada por el calor conteniendo bacilos o sus esporas. Algunos casos son orofaríngeos,Fue descrita por primera vez en Argentina.

La incubación puede ser de unas horas a 3 y hasta 5 días. Puede comenzar con úlceraciones orales y en amigdála que causan angina necrosante bilateral con intenso dolor de garganta, fiebre, edema, adenopatía cervical o submadibular que hinchan el cuello, pudiendo causar disfagia indolora y dificultad respiratoria.incluso distres respiratorio, fiebre, cuadro tóxico y alta letalidad. Cuando la bacteria penetra en el estómago, se inflama este de forma aguda, sus pliegues se edematizan y la mucosa está sembrada de ulceraciones serpiginosas sangrantes, por lo que hay gran dolor abdominal, diarrea, ascitis, hematemesis, exudación gástrica que produce deshidratación.

El carbunco intestinal, infrecuente en el hombre, aunque es la forma habitual en los animales. En Europa es la causa de menos del 1% de los casos. En cambio en Indonesia (Boer y Djanpedin) es frecuente.

Se inicia con un cuadro subfebril, escalofrío, cefalea, astenia, postración, dolores intestinales generalizados pero con mayor intensidad en la fosa ilíaca derecha, con nauseas, vómitos profusos y diarrea, que puede ser sanguinolenta o coleriforme con pérdida de hasta doce litros de líquido (si se rehidrata) al día, lo que causa masiva melena y hematemesis. La temperatura se eleva a 40ºC en forma continua o en accesos aumentando el dolor abdominal. Hay ascitis intensa y hemorrágica, y edema escrotal que puede ascender al tronco. El abdomen está tenso y mate a la percusión, sobre todo en la fosa ilíaca derecha, haciendo pensar en peritonitis e incluso con perforaciones. Puede aparecer el signo de Picks, consistente en hemorragias conjuntivales.

Las lesiones son úlceras necróticas de diámetro superior a los 5 cm, localizadas en el ciego, en el estómago y sobre todo en la región ileoterminal, es decir se producen varias pústulas malignas en cuyo entorno se produce un masivo edema de mucosa, rodeando a la escara, que puede constreñir el intestino delgado estando las asas llenas con varios litros de líquido.

Los ganglios mesentéricos de la zona están engrosados y hemorrágicos, conteniendo las bacterias. Los microorganismos pueden causar septicemias y tromboflebitis mesentérica. A veces hay adenopatía y edemas submentoniano y cervical. La evolución es imprevisible; en unos casos al cabo de 3 a 4 días de alta gravedad, el proceso puede ir mejorando hasta la curación total. Más a menudo, en ausencia de tratamiento, se agrava y aparece peritonitis o septicemia, cuadros nerviosos, insuficiencia renal, colapso y muerte. La muerte se produce, en la mayoría de los casos como en el cólera, por deshidratación.

El carbunco del endometrio

Es excepcional. Se han señalado algunos casos por dar a luz en establos o por abortos. Pese a los antibióticos, el pronóstico es infausto, muriendo en 24 a 36 horas por hemorragias cerebrales.

La carbuncosis pulmonar. Epidemiología

Es una forma clínica muy rara causada por la inhalación de esporas que solo se conoció, probablemente por no haber existido antes. A comienzos del siglo XIX aparecieron casos en Gran Bretaña en empleados de fábricas que utilizaban como materia prima pelo de cabra y lana de alpaca. En USA entre 1900 y 1980 solo se produjeron 18 casos.(Brachman 1980). A comienzos del siglo XX se declararon algunos casos en la Rusia rural entre las personas que cardaban lana de oveja, en sus viviendas. (Elkina 1971). El Turnbull y cols. (1998) vieron que el viento llevaba esporas de los campos malditos al menos a 20 m de donde se habían enterrado animales muertos por carbunco pero a muy baja concentración de modo que no se produce la enfermedad en los que transitan por esos lugares. El polvo que transmite es el que existe en los locales en los que se trabaja con pieles, cuero crines, lanas o productos contaminados con sangre. Es posible que los bacilos inhalados produzcan la enfermedad. El proceso afecta a trabajadores con productos procedentes de animales que tuvieron carbunco sin tener contacto con animales como peleteros, boteros, guanteros, guarnicioneros, traperos, colchoneros, cardadores de lana y cepilleros. Es la «wool-sorter's disease» la enfermedad de los cardadores de lana de Inglaterra, la de los traperos de Viena, la de los clasificadores de lana ete. Constituyó un problema grave en el siglo XIX en la industria textil, tanería, etc. Aún recientemente era problema en Irán en los tejedores de alfombras. Plotkin y cols. (1960) presentaron cinco casos de carbunco pulmonar en trabajadores de hilaturas de algodón en New Hampshire en los años 50.

Curiosamente la incidencia era mayor en las fábricas bien ventiladas, debido al mayor tiempo en el que las esporas quedan suspendidas en el aire. Olser señaló mayor riesgo cuanto menos grasa tuviera la lana. La baja incidencia se atribuye a que se inhalaban menos esporas que la dosis mínima infectante. Dahlengren y cols. (1966) demostraron en una industria americana en la que no se presentó la enfermedad, que los trabajadores inhalaban diariamente en una jornada de 8 horas entre 620 y 2.200 partículas de polvo con esporas, de las que entre 140 y 690 tenían un tamaño inferior a 5 micras, por lo que podían llegar al alvéolo. La cuarta parte de los cueros importados en Liverpool, en 1958, tenían esporas y, sin embargo, no se daban casos en los trabajadores. Brachman y cols.

(1958) vieron que se podían inhalar en la industria textil mas de 1.400 esporas durante 5 horas sin sufrir la infección. En cambio, una secretaria que trabajaba en un edificio cercano a un taller textil en el que no penetraban esporas, murió de carbunco pulmonar. Es muy posible que la poca frecuencia del proceso se deba también al desarrollo de una respuesta inmune. El 23 % de 72 trabajadores de una industria que utilizaba el pelo de cabra como materia prima tenía anticuerpos, lo cual indicaba que habían sido infectados de modo subclínico.

Se han encontrado esporas en la nariz y en la garganta de personas asintomáticas (Carr y Rew), tal vez por ser una región con alta resistencia local. Las esporas pueden penetrar en el alvéolo, en donde los captan los macrófagos,que los transportan a los ganglios traqueobronquiales, en donde germinan, (Ross 1957). Las esporas pueden quedar retenidas en el pulmón largo tiempo. Gochenour y cols. vieron que las esporas permanecieron en los pulmones del mono expuesto durante 55 a 84 días. No hay entrada por tráquea o bronquios, pues las lesiones que a veces presentan son secundarias a las pulmonares. Los bacilos salen de los macrófagos, producen toxinas que van en gran cantidad a la sangre, y que causan hemorragias masivas, edema y linfadenitis necrótica asi como mediastinitis necrotizante (Dutz y cols. 1971) El bacilo puede pasar a la sangre dando focos metastásicos especialmente meningeos produciendo meningitis hemorrágica. La muerte se debe a fallo respiratorio asociado al edema pulmonar.

Los animales no padecen espontáneamente carbunco pulmonar, tal vez porque es muy poco probable que entren por esa vía suficientes bacilos. Experimentalmente se ha logrado en Cynomolgus y en Rhesus. El macaco es el animal que mejor reproduce la carbuncosis pulmonar humana. Bradman y cols. (1966) introdujeron a 91 monos en una jaula que recibía el aire de un taller, donde se trabajaba con pelo de cabra, muriendo el 25,3 % con neumonía, edema mediastínico, linfangitis hemorrágica al cabo de 5 a 17 días de comenzada la exposición. El cavia que inhala esporas de una cepa virulenta muere en 36 a 48 horas, El conejo blanca de Nueva Zelanda, es muy sensible a los aerosoles de esporas a dosis letales, encontrándose el microorganismo en grandes cantidades en el bazo, ganglios, pulmones, tracto gastrointestinal, y en las suprarrenales muriendo el animal con hemorragias y edemas. (Zaucha y cols. 1998).

El empleo de esporas de carbunco como agresivo por terroristas enviándolas por cartas, paquetes etc. hace que el abrir los envios se contamine la piel pudiendo causar carbunco cutáneo y el aire por la liberación de un gran número de partículas menores de 5 μ, entre ellas de esporas de B. anthracis, pero sigue aunque en mucho menor grado existiendo riesgo por la pulverización secundaria a la movilización del polvo porque sus partículas superan las 5 μ sedimentan pronto y son retenidas por el moco respiratorio, pero en cambio el riesgo susbsiste mientras existan esporas en los ambientes correspondientes.

Clínica de la carbuncosis pulmonar

Se debe a la entrada por vía aerea de esporas que son captadas por los macrófagos alveolares. La dosis infectante es practicamente igual a la letal oscila entre las 8.000 y las 50.000 esporas. Los macrófagos transportan a la bacteria por los linfáticos a los ganglios traqueobronquiales en donde las esporas pueden germinar a partir de 90 minutos y al menos durante 100 días; si hay muchas esporas la probabilidad de que algunas germinen pronto es mayor y por ello la latencia es inversa al número de esporas ingresadas; si este número es bajo, los bacilos germinados podrían ser destruidos lo cual explicaría los pocos casos que se producen en locales en los que se trabajan con productos con esporas. Como la exposición suele ser continua, es difícil delimitar el período de incubación, aunque parece menor que en la forma cutánea, entre 1 a 5 días, pero a veces ha llegado hasta los 60 días. En la epidemia de Sverdlovsk tomando el 2 de abril como la fecha de la explosión a partir de la cual comenzó la exposición el periodo de incubación más largo para el carbunco respiratorio fatal fue de 43 días con moda de 9 a 10 días, mayor que los 2 a 6 días que se había estimado. Curiosamente no hubo casos en los menores de 24 años, no atribuible a una menor representación de ese grupo de edad en la zona, sino a una mayor exposición y tal vez a una mayor susceptibilidad de los mayores fenómenos que se presentan en casos rurales en Rusia. El paso de los macrófagos con esporas a los ganglios, causa linfadenopatía hiliar masiva, mediastinitis hemorrágica pero no una auténtica neumonía a los 2 a 3 días se presenta un cuadro insidioso pseudogripal,que parece benigno, con malestar fiebre, mialgias, fatiga, tos

seca, discreta, opresión torácica. Los cada vez mas raros casos de carbunco respiratorio que se presentan actualmente en el mundo occidental se han dado en pacientes con una enfermedad pulmonar subyacente que aumentaría la suceptibilidad al agente. Los bacilos emergidos de los macrófagos, se multiplican, pasan a la sangre, producen las toxinas. A las pocas horas cae la tensión arterial, aparece distrés respiratorio con hipoxia, disnea, estridor, aumento de la opresión, cianosis, sudoración profusa, hemorragias, shock,a las 24-36 horas, terminando casi siempre con la muerte. La radiografia muestra ensanchamiento del mediastino, broncoalveolitis difusa con engrosamientos pleural y mediastínico. La letalidad es casi 100. Curiosamente es muy rara la neumonía en el carbunco pulmonar por lo que en el esputo no hay bacteridia. Puede haber edema de cuello y de tórax. Por la acción del FE se produce intenso edema hemorrágico en el pulmón.

El diagnóstico solo se hace si se sospecha la posibilidad de infección con anthracis pues la clínica es inespecífica y solo la dilatacion radiológica del mediastino causada por la hemorragia o la coincidencia de derrame pleural o la de meningitis puede hacer sospechar el diagnóstico.

El cuadro clínico suele aparecer de modo brusco, aunque a veces está precedido unos días antes por un cuadro catarral o bronquial con malestar, fatiga, cefalea, mialgia y fiebre. Aparecen escalofríos, la fiebre se eleva, vómitos, tos con expectoración, a veces abundante y hemoptoica, que contiene numerosos bacilos y a veces opresión torácica. Al cabo de una hora o de unos días, periodo en el que puede aparecer una discreta mejoría, el cuadro se agrava con síntomas neumónicos, con disnea intensa, estridor, cianosis, pulso débil, filiforme y taquicárdico, aumenta el dolor torácico debido al edema de torax y de cuello. El distres respiratorio es seguido de sepsis y a menudo de meningitis hemorrágica y rapidamente pasa a shock y a coma produciendose la muerte al cabo de 24 a 36 horas, en casi todos los casos, pese a los tratamientos aplicados. Hay casos fulminantes con fiebre elevada, escalofríos, disnea, colapso vascular y muerte en 48 horas. El hemocultivo suele ser positivo. No hay lesiones en el pulmón ni en los bronquios, pues los bacilos quedaron en los ganglios.En la autopsia puede encontrarse, en las vías respiratorias una pústula maligna, pero en general lo que hay es un edema muy extenso de los pulmones con condensación o bien una extensa hemorragia alveolar (Kohut y

cols.1964). El pulmón, hepatizado, puede presentar focos metastásicos como consecuencia de émbolos sépticos. Hay engrosamientos pleurales con derrame serosanguinolento. El mediastino está en todos los casos ensanchado de modo precoz, pero a diferencia de otras mediastinitis no hay dolor. Se producen infiltrados pulmonares por edema y hemorragia.

La radiografía muestra un enorme ensanchamiento del hilio debido a una masiva hipertrofia de los ganglios hiliares, al edema y a la hemorragia del mediastino, que van seguidos de ensanchamiento mediastínico masivo con bordes netos. Puede haber efusiones pleurales, linfadenia, hipertrofia de ganglios axilares y esplenomegalia dolorosa por la septicemia, que suele ser fatal y hemorragias y edema difusos.

Septicemia carbuncosa

La forma habitual en los herbívoros es la septicemia primaria. En los enfermos puede haber bacteriemia episódica con fiebre y escalofríos, pero puede presentarse una septicemia secundaria a una pústula maligna y más frecuentemente a un edema maligno y sobre todo en las formas gastrointestinal y pulmonar, de las que al menos la mitad, desarrolla sepsis, debido a un descenso de la resistencia. Hay fiebre alta en torno a los 40ºC,casi continua, escalofríos violentos y repetidos, taquicardia, vómitos, diarrea que alterna con estreñimiento, cefalea casi inicial y persistente, oliguria, albuminuria y disnea con ligera cianosis, trastornos nerviosos y mentales con delirio. La multiplicación intravascular de los bacilos origina CID y toxemia con hipotensión.

El hemocultivo es siempre positivo, pues hay más microorganismos que hematíes. Hay bacteridia en todos los órganos, sobre todo en el bazo, que está hipertrofiado; hay bacilos en los sinusoides hepáticos y en las células de Kupfer. Hay también hipertrofia ganglionar, La sangre está negruzca e incoagulable, tal vez por agotamiento de los factores de la coagulación, por CID con hemorragias en el riñón, suprarrenales, bazo, cerebro, meninges, y en la piel (púrpuras). Hay leucocitosis, de 30.000 a 40.000 leucocitos. Secundariamente a la septicemia puede haber una bronconeumonía hemorrágica. La letalidad es muy alta, muriendo los enfermos por fallo renal por necrosis papilar en 4-5 días pero a veces antes de 24 horas. El Rey Lear en la escena IV del segundo acto increpa a su pervesa hija Go-

nerila con estas palabras:» eres un tumor, una úlcera pestífera, un hinchado carbunclo en mi sangre corrompida».Poco antes de morir uno de los pacientes que fallecieron en el brote de New Hampshire sudaba profusamente necesitando que se cambiara la cama cinco veces en un día.

El carbunco nervioso

Es excepcional. Solo se han descrito unos 130 casos. Puede ser una meningitis primitiva a menudo hemorrágica por entrada transetmoidal de la bacteria, pero casi siempre es secundaria al carbunco cutáneo (50% de los casos) al pulmonar (26%) más susceptible o al intestinal (5%) desde cuyas lesiones pasa la bacteridia a sangre y desde esta a las meninges. La clínica no permite diferenciarla de las meningitis por otros agentes, salvo que el LCR es hemorrágico en el 54% de los casos. Comienza bruscamente con cefalea intensa, vómitos, convulsiones, parálisis locomotora y del VI par, y signos piramidales y locales por compresión debidos a hematomas. Puede haber arteritis aguda con hemorragias diseminadas en el cortex, alteraciones mentales y delirio. Se aprecia exudado seroso o serosanguinolento subaracnoideo. El LCR es hemorrágico,en la mayoría de los casos, por la ruptura de vasos que pueden estar trombosados, a veces xantocrómico o purulento con PMN alterados y presencia de la bacteridia. La meningoencefalitis es fulminante y rapidamente fatal; con focos hemorragicos cerebrales que descubre la tomografía computarizada; la glucosa del LCR esta disminuida con presencia del anthracis; la muerte se produce antes de los siete días.

Patogenia

La enfermedad se debe a la penetración del B. anthracis en el organismo, principalmente como espora. Los bacilos y las endosporas son fagocitados por los macrófagos, en el interior de cuyos fagolisosomas las endosporas, germinan al cabo de unos 90 minutos, proceso imprescindible para que se produzca la enfermedad. Tanto el B. anthracis como el thurigiensis tienen genes codificadores de las proteinas de la capa S de la pared, que no tiene el cereus ATCC 14579 aunque si la tienen los ais-

lamientos clinicos, aunque tiene varios CDSs con dominios SLH (Kotiranta y cols. 1998).

La germinación de la endospora es el momento inicial del ciclo biológico del carbunco. Hasta la germinación ha sido necesario que se mantenga la viabilidad de la espora, especialmente la integridad del ADN que depende de su capacidad para repararse en la germinación. El B. anthracis tiene varias pequeñas proteinas solubles en ácido que protejem al ADN. El B. anthracis también tiene una capacidad adicional de reparar al ADN de la lesion causada en el ADN por los UV, debida al gen BA3180, que cataliza una deoxiribodi-pirimidina fotoliasa estrechamente relacionada con enzimas de la roteobacteria y dos endonucleasas dímericas. El B. anthracis dispone de genes que codifican cinco catalasas y tres superóxido dismutasas Fe-Mn, capaces de neutralizar los efectos agresivos de los radicales libres de oxígeno.

El B. anthracis tiene seis paralogos de la familia gerA f de operones tricistrónicos en el cromosoma y uno en el plásmido, utilizados por las endosporas para reconocer la presencia de pequeñas moléculas específicas para inicar la germinación. (McCann y cols. 1996). Para la germinación se requiere que la erosión de sus cubiertas, (experimentalmente por punción con una fina aguja, o manteniéndolas a 100ºC unos minutos, por radiaciones ionizantes o por un pH bajo, o por substancias con sulfhídrilos libres como el mercaptoetanol). La germinación requiere oxígeno, alta humedad relativa, un mínimo de nutrientes y aunque no es esencial, una temperatura relativamente alta, señales que hacen que se expresen los genes de la germinación. En el proceso de la germinación se degradan las macromoléculas. se excretan las substancias específicas de la espora como el ácido dipicolínico, el calcio y péptidos. La membrana interna y el córtex desaparecen, quedando sólo la membrana externa. Se va formando una gruesa pared a base del material de la pared de la espora. El citoplasma se hace electrondensa, aparecen ribosomas, y se borran sus diferencias con el nucleoplasma, el cual ya presenta bandas de ADN. Se reinicia el metabolismo; se sintetizan proteinas utilizando los aminoácidos procedentes de la hidrólisis efectuada por una proteasa específica, la «GRP», que estaba inactiva, entre ellas las «pequeñas proteinas acido-solubles», llamadas «SASP» protectoras del ADN. La nueva bacteria emerge a través de una rasgadura, de las cubiertas polar o ecuatorial dando

con el Gram color rosa, aumenta de tamaño, se divide por amitosis, dando nuevas bacterias que ya son Gram positivas.

La espora aún en criptometabolismo, se activa al reaccionar con un agente químico externo llamado germinante. Actúan como germinantes los iones Mn^{++}, Mg^{++}, la glucosa y otros azúcares, las bases nitrogenadas y hasta aminoácidos como la L-alanina que es germinante para el B. subtilis. El germinante activa a un receptor alostérico situado en la membrana interna que adquiere una capacidad proteolítica que hidroliza específicamente a una proenzima unida covalentemente a la mureina de la corteza. La enzima resultante reconoce la lactama del NAM y comienza a hidrolizar a la mureina cortical con lo que comienza a entrar agua en el protoplasto, haciendo perder a la espora su refringencia, y su resistencia.

Inicialmente el metabolismo sigue siendo endógeno, sin utilizar substratos exógenos. El 3-fosfoglicerato, que quedaba en el protoplasto, es la fuente de energía de la germinación; pasa rápidamente a 2-fosfoglicérico, y este a fosfo-enol-pirúvico, liberándose fósforo que produce ATP, haciendo a la germinación irreversible. El dipicolinato cálcico se descompone, se pierde el ácido dipicolínico y el catión calcio pasa al cortex, donde neutraliza las cargas negativas; este hecho favorece con la contracción del cortex, la rehidratación del protoplasto y su hinchamiento; la mureina cortical se hidroliza por completo.

Los genes de la forma vegetativa, ya sin las SAPS, se transcriben a ARN por medio de la ARN polimerasa. El B. anthracis segrega dos homólogos de la proteina inhibidora de la inmunidad (InhA), que rompe selectivamente los péptidos antibacterianos de los insectos, (Fedhila y cols. 2001) que posiblemente actúen contra péptidos de vertebrados, disminuyendo la carga negativa de la superficie de las bacterias

Se pensó que la enfermedad era debida a las masas de microorganismos que en los capilares agotaban el oxígeno y los nutrientes. Sterne en 1959, encontró que el hígado, puede estar oscuro e hinchado, pese a que sus capilares contienen pocos microorganismos y que los animales inoculados mueren aún estando inmunizados parcialmente o tratados con dosis bajas de antibióticos que eliminan o rebajan mucho la cantidad de bacilos de la sangre.

El bacilo tiene componentes, que contribuyen a la virulencia, encontrados por Welkos en 1991 en ratones. No esta demostrada la intervencion de citoquinas que activan la respuesta inflamatoria en las sepsis; si lo fuera podria intentarse tratar con proteína C. Es posible que las cubiertas del anthracis causen coagulación intravascular diseminada. El bacilo altera el metabolismo oxidativo de los neutrófilos (Alexeyev y cols. 1994) evidenciada por la disminución de su luminiscencia espontanea en seis pacientes con pústula maligna ($p < 0.05$); además el B. anthracis, opsonizado por suero de pacientes con complemento induce la quimioluminiscencia de los neutrófilos de los controles pero no la de los carbuncosos, lo que no ocurre si se descomplementa el suero tanto en pacientes como en controles.

Además de la cápsula y de las tóxinas intervienen en la virulencia una ADN topoisomerasa de tipo 1 codificada por el plásmido pXO1 (Follet y cols. 1996), y proteasas codificadas por genes cromosómicos (Stepanov y cols. 1996).

Toxinas

La enfermedad, pese a lo antedicho se debe básicamente a sus toxinas, como descubrió Koch. Smith y Keppie en 1954 demostraron que la inyección de suero de animales con carbunco mataba a estos. Es muy interesante que la deplección de los macrófagos o el bloqueo de la IL-1 protege de la muerte.

Las toxinas proteicas, son moléculas solubles secretadas por bacterias patógenas que actúan sobre la membrana o sobre el citoplasma de las células blanco en cuyo caso deben modificar las propiedades de permeabilidad de aquella para alcanzar al citoplasma. Las toxinas en general tienen al menos un dominio, por el que se unen a la célula y otro con actividad enzimática y por ello tóxica. La mayoría de las toxinas proteícas adoptan una de estas dos estructuras incompatibles entre sí; una, la que adoptan la mayoría de las proteínas de membrana, a base de hélices alfa hidrofóbicas y anfipáticas o como la toxina alfa estafilocócica, la protoxina antigénica protectora del carbunco, la protoxina CytB, y el antígeno protector soluble heptamérico de la bacteridia que contienen numerosas láminas beta capaces de oligomerizarse generando la suficiente hidrofo-

bicidad para insertarse en la membrana y perforar la bicapa lipídica al igual que lo hacen las porinas bacterianas. En el caso del carbunco, las toxinas atacan inicialmente a los fagocitos permitiendo que la bacteridia se desarrolle y produzca más toxinas.

El bacilo carbuncoso sintetiza y excreta, in vitro e in vivo dos toxinas solubles, con actividad sinérgica, compuestas por tres proteínas, antigénicamente diferentes codificadas por genes plasmídicos. Las proteinas son el Antígeno protector (PA), el Factor letal (LF) y el Factor edema (EF). La toxina letal es la PA + LF que es una metaloproteasa con zinc. La PA reacciona con el LF antes de que se produzca la unión con el receptor celular. La toxina letal se activa por mitógenos, inactiva proteolíticamente a las proteinquinasas activadas por mitógenos, importantes en dar la señal para la transducción. Además destruye a los macrófagos y provoca la muerte súbita de los animales a los que se les inyecta. La toxina edematógena la PA + EF, es una adenilato ciclasa,Ca^{2+}-calmodulina dependiente que induce edema. Las toxinas entran en las células blanco gracias a la PA.

La posibilidad de intercambiar alelos de provocación de mutaciones puntuales específicas o de delecciones “in-frame” en los genes codificadores de las toxinas, o de los dominios funcionales del PA modifica la actividad biológica de las toxinas.

Los pases secuenciales de cultivos a 42,5ºC, como hizo Pasteur para obtener su vacuna, elimina a unos 10 plásmidos (Mikesell y cols. 1983, Ezzeil y cols. 1985) suprimiendo la producción de PA y LF y con ello la virulencia. Las proteinas son: el antígeno protector (PA), el factor letal (LF) y el factor edema (EF).

El FACTOR EDEMA (EF) o factor I pesa 89.000 d, fue encontrado por Watson y cols. en 1947 en el líquido del edema, en el plasma y en los tejidos. Smith y Stanley, en 1955, lo extrajeron de sangre de cobaya en fase terminal. En la sepsis se encuentra, en la sangre, formando agregados, cuyas propiedades biológicas y serológicas dependen de su composición o configuración. Sargeant y cols. demostraron la identidad antigénica de las toxinas obtenidas in vitro e in vivo, pero esta mata más rápidamente y es más difícil de detectar que la obtenida in vitro, tal vez debido a los agregados. El FE, es un adenilatociclasa camaldulin-Ca2+ dependiente, que le suministra la célula blanco así como el ATP, para for-

mar AMPc en el citoplasma de las células eucariotas (Little y cols. 1997) inhibiendo la fagocitosis de los PMN y aumentando la permeabilidad capilar y con ello produciendo edema.

El Factor edema, disminuye la inmunidad por varios mecanismos especialmente inhibiendo la fagocitosis. Baily cols., encontraron en 1911 que la toxina impide la destrucción de la bacteria por los PMN. Este efecto se debe a la inhibición de la quimiotaxis de los PMN (Kashiba y cols. (1959), Leppla y cols.(1982), O'Brien y cols (1985) que causa el FE (O'-Brien y cols. 1985) con supresión de la «explosión» respiratoria en estas células (Wright y cols. 1988). El FE también inhibe la síntesis de la IL-6 y la del TNF de los monocitos, que disminuyen la resistencia. (Hoover y cols. 1994). Pese a que el FE es antigénico no aumenta la respuesta de anticuerpos.

El FACTOR LETAL (FL) o LeTx o factor III es el principal responsable de la virulencia. La molécula tiene 10 nm de alto, 70 de ancho y una masa de 90.000 daltones. Es una proteasa dependiente del Zn es decir es una metaloenzima, activable por mitógenos, con capacidad destructiva de los macrófagos.

Pannifer y cols. (2001) encontraron muy ligeras diferencias en las estructuras terciaria y cuaternaria de los cristales del FL obtenidos en dos ambientes muy diferentes. El FL favorece el desarrollo del bacilo, destruye a los macrófagos, disminuye la inmunidad, favorece el paso del B. anthracis a la sangre. El LF es muy antigénico para la rata; sus anticuerpos protegen de la inyección de esporas y de toxina, aunque al cavia sólo lo protege de la toxina. El FL es citotóxica para los macrófagos (Friedlander 1986) que liberan IL-1 y TNF (Hanna y cols. 1993).

EL FL tiene cuatro dominios funcionalmente activos situados correlativamente en la estructura primaria de la proteina: el dominio I es el de unión al PA; está situado entre la Lys39 y la Met242 y está formado probablemente por una sola unidad plegada, un bucle de 12-hélices (residuos 1- 254),compactada contra una lámina beta de cuatro bandas con una gran asa de 30-residuos; la L1, entre la segunda y la tercera banda beta forma un ala flexible encima de la cara distal de la hoja. No contiene el motivo de la metaloproteasa HExxH pero si la secuencia YEIGK, de modo que no es posible la coordinación del Zn^{2+}.

El dominio II comienza a partir de un ángulo agudo al final de la última hélice del dominio I que conecta con la primera hélice del dominio II (residuos 263 - 297 y 385 - 550). El dominio II tiene practicamente la misma estructura que el VIP2, el dominio de la toxina ribosiladora de ADP del B. cereus, de modo que se pueden superponer ambos, aunque difieren en la secuencia de sus aminoácidos. El VIP2 contiene una bolsa que liga NAD, aunque conserva los residuos involucrados en la unión a NAD que faltan en el dominio II; el ácido glutámico conservado en la familia de las toxinas ribosiladoras de ADP (Carroll y cols. 1984) es reemplazado por una Iisina (K518). Por eso Pannifer y cols. preveen que el dominio II no ribosila al ADP, aunque el sitio activo se haya mutado y multiplicado aumentando el reconocimiento del substrato.

El dominio III es una pequeña asa helicoidal con un centro hidrófobo (residuos 303-382), insertado en un bucle entre la segunda y la tercera hélices del dominio II. Con el dominio II que comprenden desde la Leu517 a la Lys614, estabilizan a la mólecula y al dominio l efector desde la Lys614 a la Lys COOH-terminal; tiene un segmento de los aminoácidos 282 al 382, que comprende cinco tándem repetidos, de los que los segundo a quinto probablemente proceden de replicaciones del primero. La estructura cristalina revela que el tándem 1 realmente forma la segunda vuelta de la hélice del dominio II, considerando que los tándem dos a cinco forman las cuatro hélices. El dominio III es necesario para activar al FL, porque las mutaciones puntuales y las inserciones suprimen su función. El dominio III contacta limitadamente con el dominio II, pero origina una superficie hidrofóbica con el dominio IV. Su situación es tal que restringe enérgicamente el acceso al sitio activo para los substratos potenciales como las asas de una proteína globular; es decir, contribuye a la especificidad para una flexible «cola» de un substrato proteíco. También contribuye la especificidad de la secuencia interactuando específicamente con el substrato. El dominio III, parece que procede de una duplicación de un elemento estructural del dominio II.

El dominio IV comprende los aminoácidos 552 a 776; es semejante al I; consiste en un conjunto de nueve hélices condensadas contra una lámina beta de cuatro hojas. La secuencia no presenta ninguna homologia con otras proteínas con estructura conocida, aparte del motivo HExxH. El modelo de estructura tridimensional de Pennifer y cols. revela que las

láminas y las primeras seis hélices pueden superponerse con las de la termolisina. El dominio IV, está relacionado con la familia de las zinc-metaloproteasas (la termolisina es una metaloproteasa) y es el que contiene el centro catalizador. La existencia de grandes insertos y de delecciones en las espiras que conectan las hélices,modifica mucho la estructura cuaternaria del dominio IV, en particular, la inserción de un asa grande (L2) entre las cintas 4β2 y 4β3 oculta el sitio activo. La estructura es la de una proteína que ha evolucionado a través de un proceso de duplicación del gen, de mutaciones y de fusiones, dando lugar a una enzima con especificidad alta y rara. El dominio IV se introduce en el dominio II y proporciona un apoyo al dominio III. Un ion de zinc (Zn2+) está coordinado tetrahedricamente por una molécula de agua y tres cadenas proteicas laterales, en una disposición típica de la familia de la termolisina. Dos histidinas del motivo de HExxH (His686 y His690) quedan en una hélice (4α4) actúan como coordinadoras, como el Glu 735 de la hélice 4α6. El Glu 687 del motivo de HExxH (lies) activa al zinc ligado a agua durante la catálisis. El grupo hidroxílico se agrupa con la tirosina 728 formando un enlace enérgico de hidrógeno con la molécula de agua, en el lado opuesto al Glu 687, y probablemente funciona como un ácido para protonar la amina.

La toxina letal (LeTx) tiene un papel central en la patogenia del carbunco pese a que es dificil encontrar citotoxicidad in vitro sobre células humanas pero si en las de ratón lo que indica que la lisis celular no es un marcador de la actividad de la LeTx. (Popov y cols 2002). Las células murinas RAW 264 de tipo macrofago tratadas con LeTx o infectadas con esporas de carbunco presentan apoptosis. Tambien las células de sangre periférica humana sufren una proapoptosis similar a la de las células murinas. El método TUNEL detecta una degradación del nucleosoma típica de la apoptosis en los mononucleares especialmente en los macrófagos. La toxina inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias en los PBMC estimuladas con un preparado de la pared del B. anthracis. Un gran número de células PBMC infectadas con esporas de anthracis sufren la apoptosis, lo que reduce la capacidad de eliminar esporas y bacilos. La bestatina, inhibidor de la aminopeptidasa, puede proteger a las células de la LeTx, restaurando la actividad bactericida de las células infectadas. Estos hechos pueden deberse a la expresión de la LeTx dentro de los fagocitos y apoya que la LeTx tenga un gran papel en la inicial virulencia in-

tracelular, contribuyendo a la diseminación del bacilo y a la progresión de la enfermedad.

El ANTÍGENO PROTECTOR (PA) o factor II, fue descubierto en 1904, por Baill. Tiene una masa de 83.000 daltones. Es inmunógeno, protegiendo a la rata y al cobaya de la inoculación de esporas, pero no evita la acción de la toxina en las ratas. La inyección de una cantidad fija de PA y simultáneamente cantidades crecientes del factor letal, mata a la rata tanto más rápidamente, cuanto mayor sea la cantidad de LF inyectada. En cambio, si se inyecta, a ese animal, una cantidad fija de LF y simultáneamente se inyectan cantidades crecientes de PA, disminuye la pervivencia hasta un tiempo mínimo, a partir del cual una dosis mayor de PA prolonga la vida.

El PA es una proteína de 82-000 d que se une a un receptor de muchas células de los mamíferos en donde una proteasa de membrana le quita un fragmento de 19.000 d que deja libre una secuencia en la que se puede ligar competitivamente el FE o el FL. Baillie y cols. (1998) han obtenido PA mediante el fago Phi 105 del B. subtilis. El PA es, como su protoxina, un heptámero provisto de numerosas láminas beta. Dispone de cuatro dominios funcionalmente activos, uno de ellos que comienza con lisina 166 (que tiene un NH2 libre). El PA, se une a un receptor de membrana tipo 1, el ATR (anthracis toxin receptor) acoplándose también un factor extracelular de Willebrand.

Expresión de los genes de virulencia

El operón del anthracis está formado por tres genes plasmídicos el cya, el lef, y los pag (el pagA codifica al PA), que clonaron Fuet y cols. (2000). son muy similares a los que tiene el operón sigB del Bacillus subtilis. Las secuencias nucleotídicas y el orden de sus tres genes,son muy similares a la de los ocho genes que tiene el operón del B. subtilis. El gen codifica un factor de transcipción, que produce el factor sigma (B) del estrés general y dos proteinas de su red reguladora la RsbV y la RsbW.

Esos genes están regulados por un único regulón el atxA (gen cuya misión es optimizar la producción de las enzimas que participan en el cre-

cimiento y en metabolizar substratos no preferentes), (gen que también tiene la E. coli) situado en el plásmido residente pXO1 de 185-kb que codifica a las tres toxinas. Vodkin y cols. (1983) vieron que una cepa curada disminuye, al menos 2.500 veces la producción de PA. La clonación de un fragmento de 6 kb del plásmido pxol por medio del vector EpBR322 hace que la bacteria clonada produzca PA pero la produce en mucha mayor cantidad si se clona en un Bacillus que si se hace en la E. coli. El atxA no se activa por el nivel de la relación CO2/bicarbonato pero si la tasa de CO2/bicarbonato es alta, sextuplica su expresión al pasar de 28 a 37ºC (Dai y cols. 1997). El gen AtxA se expresa por una proteina de 53 kD, que regula a los tres genes codificadores las toxinas y al menos la de un gene necesario para la síntesis de la cápsula. La mutante atxA nulo exhibe fenotipos no relacionados con la síntesis de la toxina y de la cápsula que en medios mínimos crece pobremente, pero en cambio esporula más eficientemente que la cepa original (Hoffmater y cols.1999).

El gene atxA es un importante regulador positivo de la expresión de los tres genes codificadores de las toxinas de virulencia del Bacillus anthracis, entre ellos el gen pagA que codifica al PA el cual se cotranscribe con el pagR de 300bp, codificador de una proteina que tiene algunas secuencias similares a las de los genes reguladores de otros microorganismos. Sin embargo el aumento del número de copias de AtxA no aumenta la activación de los pag, lo que sugiere que existe, al menos, otro factor regulador del pag y que las proporciones relativas de ese o de esos factores y del AtxA son importantes para la expresión óptima de los genes de las toxinas. Hoffmaster y cols. (1999) estudian una mutante atxA-null que presenta fenotipos no relacionados con la síntesis de las toxinas ni con la de la cápsula. La mutante atxA-null crece mal en medio mínimo y esporula mas eficientemente que la cepa original. Numerosas fusiones promoter-lacZ generadas por transposones en varios loci del pXO1 expresan atxA, la cual aumenta por el CO2, similar a lo observado en los genes de la toxina. Hoffmaster y cols. (1999) comunicaron que el gen pagA activado por el atxA (que codifica el PA) es co-transcrito con el gen pagR, de 300-bp. La proteina codificada por pagR tiene una secuencia de aminoácidos similar a los reguladores de transcripción de otros microorganismos. El pagR reprime la expresión de pagA y del atxA.

El pagR reprime la expresión del pagA, del atxA y controla la expresión de varios genes. Un anti-AtxA(His) obtenido inyectando a ani-

males con AtxA procedente de la E.coli permite descubrir el AtxA del anthracis.

El EF se codifica en forma inactiva por un gen procedente según Lepola y cols. (1985), de células eucariotas. El EF activo, solo o con el PA, al unirse a un receptor de la superficie celular, activa a la adenilciclasa Ca2+/calmodulindependendiente produciendo AMPc y calmodulina; solamente la toxina de la B. pertussis activa también a la adenilciclasa.

El B. anthracis tiene un pequeño plásmido, el (pAEX-5E),theta-replicante, no movilizable, que se mantiene estable a través de su multiplicación, sin integrarse en el genoma del B. anthracis, var. New Hampshire. Bowen y cols. (1999) demostraron que en cultivos en caldo, en aerobiosis a 37ºC el plásmido pAEX-5E continuaba estable en la segregación en más de 100 cultivos de las cepas derivadas virulentas, pX01-/pX02+ y pX01-/pX02-, pero fue expelida de las cepas virulentas pX01+/pX02+ y en las parcialmente curadas pX01+/pX02-, determinándose la pérdida total al cabo de 101+/-3,8 y 54+/-6,0 pases, respectivamente. En presencia de la presión selectiva de 5 mg/ml^{-1} de eritromicina no se pierde de pX01 ni pX02 en ninguna de las cepas. La resistencia antibiótica a la eritromicina y a la kanamicina, esta mediada por el plásmido pAEX-5E.

Price y cols. (1999) identificaron cinco mutaciones puntuales, tres sinónimas y dos sin sentido. La ingeniera genética ha logrado, por intercambio de mutaciones puntuales de los genes de los componentes de las toxinas o por deleciones, modificar la LF metaloproteasa, la actividad adenilato ciclasa de la EF y los dominios funcionales de la PA.

Actividad de las toxinas del anthracis

Un dominio del AP que empieza en la Leu663 hasta el COOH-términal (Duesbury y cols. 1998, VitaleTR y cols. 1998. 2000),se liga directamente a su receptor celular, el ATR de «Anthrax toxin receptor». El ATR es una proteína ubicua que se expresa en diversos tejidos incluso en el sistema nervioso central, corazón, pulmón, macrófagos y linfocitos con niveles relativamente altos (10^4 receptores por cada célula hipodiploide CHO-K1 y 3 X 10^4 por cada macrófago obtenido de un cultivo) (Escuyer

y cols. 1991, Friedlander y cols 1993). El receptor tiene la misma estructura cristalina que el factor letal (Bradley y cols.2001, Pannifer y cols.2001). Bradley y cols. trataron células CHO-K1 con ICR-191 un alquilante del ADN que induce pequeñas delecciones y mutaciones (Taft y cols.1994), que matan al 90% de las células. Las células mutadas supervivientes, carecen de ATR y por ello no se destruyen con PA y EL o EF pero si por PA y LF_N-DTA, una proteína producida por la fusión de un fragmento N-terminal de 255 aminoácidos del LF unido a la cadena catalítica A de la toxina diftérica (Milne y cols. 1995). (Bradley y cols. 2001) han identificado a una ATR humana de 368 aminoácidos con un solo dominio extracelular hidrosoluble de VWA/I que sirve como receptor celular de la toxina del carbunco. El clon que codifica a la proteína ATR puede ser uno de los diversos ARN mensajeros alternativamente empalmados entre ellos el TEM8, que resulta de un mRNA primario y que contiene el dominio extracelular de VWA/I que liga directamente al PA. Bradley y cols. predijeron que este clon también puede funcionar como un receptor del PA. Para que se una el PA al ATR se necesita que este contenga MIDAS con la intervención de cationes divalentes, pues el EDTA la impide. La identificación de ATR permite investigar detalladamente el mecanismo de captación por parte de las células, de las toxinas carbuncosas. Se han obtenido cepas recombinantes de B. antracis carentes de PA, que pueden introducir LF y la EF en las células (Pomerantsev y cols. 1997, Broad 1998).

Una vez ligado al receptor célular, el PA se rompe en dos fragmentos por una proteasa de la superficie celular que contiene furina C-terminal (Molloy y cols 1992, Gordon y cols. 1997). La activación del PA es esencial en la génesis de la enfermedad. Se activa, pues como las exotoxinas diftéricas y la A de las pseudomonas por proteasas del organismo infectado. La proteasa, necesita que haya arginina en las posiciones –1 y –4 para poder reconocer al substrato, al que corta en las secuencias RKKR, (LAS RQPR, y RVRR, respectivamente,para las exotoxinas diftérica y para la de las pseudomonas). Como las células furin-deficientes conservan alguna sensibilidad al PA y a la toxina diftérica es evidente que hay otras proteasas celulares capaces de activar a las toxinas. La proteasa PACE4, requiere que haya aminoácidos básicos en las posiciones 1,2, y 4 y puede reconocer RAAR y en menor grado al KR y al RR. La PACE4 está en el exterior de las células y tiene papel en la activación proteolítica de la PA. El fragmento PA_{20} amino-terminal, queda en el medio.El frag-

mento carboxi-terminal, el PA_{63} se heptameriza, es decir forma agregados de siete moléculas, los heptámeros, que tienen gran afinidad para los dominios N-terminales homólogos del LF y el EF, a los que se liga enseguida, constuyendo el receptor especifico del EF o del LF. Los complejos resultantes de $(PA_{63})_7$ con EF o con LF unidos al ATR forman un cauce hidrófobo para que entren LF o EF (Milne y cols. 1994, Eliott y cols. 2000) y se introduzcan por un proceso de endocitosis que lleva a las toxinas a un endosoma ácido (Gordon y cols. 1988). El bajo pH cambia la conformación del $[PA_{63})_7$ haciendo que el heptámero se inserte y forme un poro en la membrana. (Blaustein y cols 1989, Koehler y cols. 1991, Milne y cols.1993), translocándose el complejo de modo que el FE y el FL pasan a través de la membrana del endosoma al citosol, liberándose los factores letal y el del edema en el interior de la célula en donde actúan sobre moléculas, aún no conocidas. (Petosa y cols 1997, Benson y cols 1998). La inyeccion venosa de la combinación de PA con LF basta para matar rápidamente al animal: los inhibidores de las metaloproteasas bloquean los efectos de la toxina in vitro. Así,la inactivación del FL para su unión al PA o la de su actividad catalizadora son posibilidades terapéuticas. Es posible que in vivo se una el PA a los otros dos factores y una vez formado el complejo, una proteasa sérica corte al PA uniéndose el complejo activado al receptor del macrófago. (Brossier y cols. 2000).

El dominio I del FL mantiene la capacidad de unirse al PA y posibilita la translocación de proteínas heterologas de fusión en el citosoI (BalIard y cols. 1996, Goletz y cols. 1997). No se sabe dónde se debe cortar el dominio I del FL para que se una al PA pero es necesario que se mantenga integro el dominio plegado, porque inserciones y mutaciones de residuos ocultos del dominio I (que probablemente rompen el pliegue) anule la unión al PA y la toxicidad. (Quinn y cols 1991, Gupta y cols. 2001).

El complejo formado por la fusión de una proteina de la E. coli, con un marcador de hexahistidina,y otro del T7, con los aminoácidos 41-227 del dominio I del ATR precipita con un anticuerpo policlonal anti PA. Además, una proteina producida por la fusion de glutation S-transferasa (GST) con el dominio 4 ligante del ATR (D4) (Petosa y cols. 1997, Varughese y cols. 1999) (GST-D4) se liga al T7-ATR_{41-227} lo que no hace el GST. El PA - N682S, una mutante de PA en la que se reemplazó al resi-

duo Asn 682 con Ser, pierde su capacidad de ligar y de intoxicar a las células, y de ligarse al T7-ATR_{41-227}. Es decir hay una interacción directa y específica entre el dominio de (V WA/I) VWA/I de ATR y el dominio de ligadura del receptor.

Dada esta interacción directa, Bradley y cols. 2001 deducen que el ATR_{41-227} pudiera proteger a las células CHO-K1 de su destrucción por las PA y LF_N-DTA. Pannifer y cols (2001) prueban esta idea mezclando células con una cantidad creciente de T7- ATR_{41-227} en presencia de una cantidad constante de PA y LF_N - DTA, y midiendo el efecto subsecuente sobre la capacidad de sintetizar proteínas. El T7-ATR_{41-227} a la concentración de 80 nM reduce a la mitad la actividad de la toxina y a la de 500 nM la inhibe por completo, sin que el T7-ATR_{4I-227} inhiba a la toxina de la difteria.

El ratón tiene un gen homólogo al ATR humano que codifica una proteina llamada TEM8 (la AKO 13005 del GenBank) cuyo dominio extracelular comparte con el humano más del 98% de sus secuencias.

El único substrato célular del FL son las proteínas de la familia MAPKK a las que corta cerca de su extremo N-terminal eliminando la secuencia necesaria para activar a la MAP quinasa (MAPK). La unión de los tres dominios el II,el III y el IV produce una profunda ranura de 4 nm de largo en el residuo 16 N terminal de la cola del MAPKK-2 favoreciendo su ruptura.Por eso el LF inhibe el crecimiento del tumor y la angiogénesis, probablemente inhibiendo las vías MAPKK-1 y MAPKK-2 (Duesbery y cols. 2001). La ranura tiene en general un potencial negativo, conteniendo racimos de ácidos glutamico y aspartico, y residuos de glutamina/asparragina. La estructura del FL demuestra que la gran especificidad para los miembros de las familias MAPKK se debe a una bolsa de unión al substrato formada por la fusión de proteinas codificadas por duplicaciones del gen, que reconoce la estructura y la secuencia de su substrato.

Sin embargo, las células primariamente afectadas en la patogenia del carbunco son los macrófagos (Friedlander y cols. 1986,Hanna y cols. 1993). Concentraciones pequeñas de toxina letal rompen el MAPKK-3, inhibiendo la liberacion, pero no la producción de NO y de TNF-α. mediadores de la inflamación (Pellizzari y cols. 1999), de modo que inicialmente en la in-

fección se reduce o retrasa la respuesta inmune, pero niveles altos de toxina letal que ya existen a las pocas horas lisan al macrófago, por un desconocido mecanismo, liberando bruscamente niveles altos de NO y de TNF-α, lo que explicaria que poco antes de la muerte se presentan síntomas semejantes a los del shock séptico. Los componentes aislados no, pero las asociaciaciones de PA + EF y la de PA + LF, a concentraciones inferiores a 1 γg/ml suprimen, el estímulo que los lipopolisacáridos o el muramil-dipéptido ejercen sobre la producción de superóxido en los PMN expuestos a la N-formilmetionil-leucil-fenilalanina. El complejo PA-FL tiene la estructura de las metaloproteasas aunque no tiene actividad enzimática.

El LF altera la proteolisis que ejerce la familia de las proteinquinasas activadas por mitógenos, las MAPKK 1 y 2 claves en la transducción, a las que cortan cerca de su extremo aminoterminal impidiendo la fosforilación y la activación de la protein- quinasa MAPK activada por mitógenos: por eso el FL inhibe la maduración meiótica del oocito de la rana inducida por la progesterona. (Duesbury y cols. 1998,1999, Vitale y cols. 1998, 2000) y determina la lisis de los macrófagos. No se ha encontrado en las células tratadas un marcador de apoptosis.

La adición de inhibidores de la fosfolipasa A2 (PLA2) como la quinacrina, el p-bromofenacil bromuro, la manoalida o la butacaina, inhiben la citotoxicidad de la LeTx de modo dosis-dependendiente (Shin y cols. 1999). Tambien la inhibe la genisteina inhibidor específico de la tirosinquinasa pero no la estaurosporina, ni el inhibidor H7 de la protein-quinasa C. Esto indica que la fosfolipasa A2 y la proteinquinasa intervienen en el mecanismo de la citotoxicidad sobre los macrófagos de la toxina letal.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen a los antígenos derivados de proteinas expresadas endogenamente o presentadas en la superficie celular dentro del complejo del antígeno mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I Como los CTL son antivíricos y antitumorales es importante lograr su estímulo. Las proteinas exógenas no suelen estimular a los CTL porque esos antigenos siguen la via de las MHC de clase II. Varias toxinas se translocan es decir cambian de MHC en el citosol en donde se realiza su citotoxicidad. El conocimiento de estas toxinas y de sus dominios permitirá producir proteinas modificadas, incluso haciendolas portadoras de determinantes antigénicos, que pierdan la tóxicidad pero reteniendo la capacidad de translocarse en el citosol.

El complejo PA-FE es una adenilato ciclasa Ca^{2+}- calmodulina dependiente, que aumenta el AMPc, el cual aumenta la permeabilidad vascular como hace la tóxina colérica termolabil, y causa edema, mientras que la colérica causa diarrea. La asociación de la EF con la LF es sinérgica aumentando la toxicidad. La toxina inhibe la fagocitosis. Ningún componente de la toxina modifica la quimiotaxis, pero la asociación de PA + EF o la de los tres componentes estimulan la quimiotaxis. El aumento de AMPc de los PMN, inhibe la fagocitosis medida por la inducción de la respuesta inmunoluminiscente y por microscopio de fases y electrónica (Ignaro y cols. 1974, 1975). La asociación PA + LF es letal para los macrófagos (Lepla y cols., 1985). El FL actúa por medio de los macrófagos, ya que su eliminación hace insensible al ratón a la LeTx.

Cuando hay bajos niveles de FL se induce la producción de macrófagos y la de las citoquinas TNF y la de la beta III que causan shock y muerte súbita en los enfermos; sin embargo Shin y cols. (1999) no encontraron que los macrófagos del peritoneo del cavia en cultivo primario expuestos al FL sinteticen mucho óxido nítrico. Si los niveles de LF son altos, los macrófagos producen grandes cantidades de intermedios reactivos de oxigeno, aunque el pretratamiento con antioxidantes como la melatonina o con la dehidroepiandrosterona (DHEA) no evita la citotoxicidad, ni la «explosión» de los macrófagos. Cuando hay suficiente cantidad de LeTx los antibióticos no son eficaces.

Diagnóstico

Las técnicas microbiológicas son las clásicas. Se deben tomar muestras de secreciones de la pústula maligna,de esputos, del liquido pleural o del LCR, (en cadáveres el bazo). En el edema maligno se debe tomar con una jeringuilla el infiltrado hemorrágico subepidermico formado en torno de los capilares obliterados, de la capa profunda dela epidermis en donde hay mas posibilidades de encontrar el germen. Las muestras deben ser tomadas antes de iniciar el tramiento microbiológico, pues el bacilo desaparecea a las pocas horas. El examen directo de extensiones teñidas con el Gram reforzado puede resultar negativa en casos recientes o tratados, revela la bacteria así como el Giemsa en las extensiones de sangre. El cultivo de esos productos y de la sangre, en medios ordinarios

suelen ser negativo debiéndose emplear medios enriquecidos, preferentemente la sangre de bóvidos a 37°C; a las 6-24 horas, ya hay crecimiento, pero se debe esperar 48 horas para considerar el cultivo negativo; su sensibilidad es muy elevada y su especifidad es casi 1. Si el material está contaminado (tejidos putrefactos o con tierra o polvo) se puede tratar con detergentes, que además desengrasan o bien se calienta a 100ºC durante cinco minutos. Se cultiva en caldo o en agar comunes, o bien en agar con bicarbonato que da suficiente crecimiento al cabo de 24 horas, o para material contaminado como esputos, o piel en un medio selectivo como el Plet a base de agar con caldo de corazón adicionado por ml con 30γg de polimixina, con 40 (g de lisozima y con 40γg de acetato de talio, que inhibe a los bacillus cereus, mycoides, megaterium, sphaericus, al subtilis etc. Si se necesita sembrar sangre debe evitarse la caida de una sola gota y en caso de que ocurra, debe esterilizar la superficie manchada; se puede sembrar un metacarpiano del animal. La forma de las colonias y la inoculación por picadura dan una segura pista pero para ello debe estar alertado el laboratorio para emplear medios especificos. La tinción de Zottner cuyos reactivos se conservan bien, sin que que sea necesario que el agua destilada tenga un pH determinado. Después de fijacion con alcohol metilico durante 3 minutos se lavan y sumergen los portas durante 10 a 15 minutos en la solucion de Stevenel al 5% (azul al permanganato potásico). Se lavan, seca y se obervan. Sobre un fondo azul violeta, los germenes de la putrefaccion aparecen en azul marino y los B. anthracis en rojo vivo o granate cuando se tiñe la cápsula. Para los tejidos o para los extractos de órganos es preferible la tinción con anticuerpos fluorescentes unidos por ejemplo al isotiocianato.

Mejor que el cultivo es la inoculación de muestras con esporas o bacterias a animales de laboratorio especialmente a ratones y cobayas. Esta en desuso la técnica de Strasburgo, consistente en absorber exudado con un fragmento de loza estéril embebido en caldo que luego se lleva al medio seleccionado.

La identificación del bacilo se hace por la demostración del antígeno protector, por la lisis por el fago específico, por la detección de la cápsula por el anticuerpo fluorescente y por su virulencia en ratón y en cobaya. La PCR permite identificar los genes de las toxinas y los de la cápsula. La determinación del profago gamma específico del anthracis

permite el diagnóstico en 12 horas. La inoculación a animales debe hacerse con enorme cuidado; la major vía de inoculación para material contaminado es la escarificación pues el anthracis penetra más facilmente que otros microorganismos. A los animales se les puede inyectar previamente suero contra clostridium formadores de gas como el welchii,el septicum y el oedematiens, para evitar el desarrollo enmascarador de estas bacterias. Si el inóculo contiene anthracis, los animales mueren en 2-3 días; su bazo esta hipertrofiado y oscuro con muchísimos bacterias en sangre y vísceras; si los animales no mueren se clasifica la bacteria como B. cereus o B. anthracis similis.

Siguen siendo válidas las técnicas clásicas de la microbiología que permiten recuperar al microorganismo pero se abren nuevas perspectivas para hacer un diagnóstico rápido sensible en personas en el caso de agresiones en las que es básico hacer un tratamiento precoz.

Arakawa y cols. (2003) desarrollaron un detector térmico ultrasensible a base de un microcalorimetro con sensibilidad de menos de femtojoule que permite identificar nanogramos de microrganismos y que se pueden emplear para identificar la presencia de esporas de Bacillus subtilis, cereus y anthracis; se dispone de aparatos automáticos como el «LIDAR» que pueden alertar si detectan un agente microbiológico en el aire. La presencia de varios agentes o la dispersión de los mismos en liposomas o en microcápsulas o el empleo de mutantes o recombinaciones puede dificultar la identificación.

Se puede determinarse en el suero la presencia de toxina por inmunoensayo, HPLC, la cromatografía en capa fina, o el análisis secuencial de péptidos.

La serologia permite hacer el diagnóstico retrospectivo útil en la investigación epidemiológica. En el 80 % de los casos cutáneos y orofaringeos y en el 67 al 94% de los que tuvieron carbunco digestivo. se encuentran anticuerpos contra al PA y contra la cápsula (Buchanan y cols. 1971,Turnbull y cols. 1988, Sirisanthana y cols. 1988, Harrison y cols. 1989).

Baltenau y cols. aplicaron la intradermorreacción para hacer el diagnóstico varios años después de la infección, inyectando liquido del edema provocado en el conejo o en el cavia; la respuesta es tanto mas fuerte cuanto mas antigua sea la lesion carbuncosa. Las personas Mantoux

positivas dan una respuesta positiva débil. Los cientificos rusos obtuvieron el antígeno anthracina sometiendo la bacteria a la hidrólisis ácida con la que hacen la prueba intradérmica, que es positivo en antiguos enfermos (Shlyakhov 1994)

La búsqueda de la bacteridia en el medio se hace por las técnicas bacteriológicas clásicas y por inmunfluorescencia y por inmunoradiometría indirecta que permiten diferenciar al B. anthracis del cereus, bacteria común en la tierra.

La reacción miostagmínica o termoprecipitación de Ascoli se ha usado para determinar la contaminación de pieles u otros productos biológicos, incluso putrefactos. Se adiciona en un tubito de precipitados, 0,5 ml de solución de precipitinas contra la bacteridia obtenidas especialmente de asnos inyectados con Bacillus como el cereus, a 0,5 ml de SS en la que se suspende triturado de los órganos, hervido durante cinco minutos y filtrado en caliente y dejado enfriar. Se esperan diez minutos a temperatura ambiente; en caso positivo se forma un anillo en la unión de los dos reactivos.

Para determinar la contaminación con esporas en caso de agresión, se deben tomar muestras de las fosas nasales, de la cara y del cuero cabelludo, lugares en los que se deposita el mayor número de esporas según encontraron Granice y cols. (1999), en monos que expusieron a un aerosol con esporas.

Es importante disponer de pruebas rápidas dada la urgencia de instaurar inmediatamente un tratamiento eficaz, cuando se sospecha que el aire contiene esporas de carbunco o que ya ha entrado en las vías respiratoria o digestiva, pues en su defecto hay que tratar a los afectados ante la menor sospecha. Ramisse y cols. 1999 evaluaron la distribución de la secuencia Ba813 del ADN del cromosoma presente en las especies de Bacillus. La Ba813 estaba sistemáticamente en 47 cepas de B. anthracis, y solo en en el 5% de 60 cepas de Bacillus no anthracis (tres cereus y un thuringiensis), aunque también se encontró el marcador en Bacillus sp aislados que eran abundantes en suelo de lugares en donde habian ocurrido brotes de carbunco.La PCR puede detectar genes plasmídicos de la bacteria y de la espora asi como los amplicones en 10 minutos la PCR-ELISA permite reconocer al Bacillus anthracis del suelo usando placas

recubiertas de streptavidina y nucleotidos, que tiene una sensibilidad cercana a 1 ya que detecta 100 fg de ADN es decir menos de 10 esporas por 100 g de tierra, pero requiere al menos 24 horas. La inmunofluorescencia directa, tratando el material con globulina anticarbuncosa fluorescente, permite demostrar en diez minutos la presencia de la bacteria. El ELISA enzimático es otra posibilidad. La industria ha preparado unas tiras con anticuerpos en una zona transversal, sobre las cuales se aplica una emulsión en agua de la toma de fosas nasales o de otro lugar. En caso positivo se forma una franja de precipitado. Solo requiere 1 a 15 minutosy su sensibilidad es de 0,95

Existen equipos, no comercializados en EE UU, que permiten detectar la presencia de la bacteria en dos horas. Para la vigilancia de agresiones biológicas es útil la cromatografía rápida con anticuerpos monoclonales frente a diversos posibles agresivos biológicos (Hand Held Test Kit). Hay un sistema a base de laser transportado por el aire que detecta las nieblas biológicas analizando y pudiendo el contenido en ADN y en ATP identificando con inmunoanálisis el microorganismo. Estos dispositivos se pueden instalar en vehículos y hasta en aviones no tripulados. Debe haber médicos centinela capaces de identificar rapidamente los primeros casos de enfermedades que pueden ser consecuencia de agresiones.

Las personas que tomen muestras o manejen cultivos o animales inoculados, deben protegerse para evitar el contagio y la dispersión de la bacteria que esporulará en el medio.

Tratamiento del carbunco humano

El tratamiento debe ir dirigido a eliminar a la bacteridia, evitar la diseminación del bacilo, la sepsis y a neutralizar las toxinas. En el carbunco cutáneo están contraindicadas las escisiones o exéresis de las lesiones.Antiguamente se usaba el suero de Sclavo,cuyo efecto era piroterápico, pero desusado después de haberse visto la efectividad de los quimioterápicos (los chinos ensayan suero equino preparado por la inyección de diversas cepas). Después del suero se empleó el neosalvarsán que no es ni antibacteriano ni antitóxico. Los antibióticos son muy efectivos, pero sólo actúan sobre los microorganismos, sin detener, una vez

que se ha producido suficiente toxina, el progreso de la enfermedad, el edema y la toxicidad, por lo que deben administrarse precozmente, atendiendo al estado general. El tratamiento mejora el edema y los síntomas generales sin modificar la evolución de la pústula. El B. anthracis suele ser sensible a la penicilina, introducida en 1944 por Murphy y cols., lo que hizo bajar la letalidad de 15-20 a 0,6. aunque algunas pocas cepas producen beta-lactamasa. La penicilina oral es de elección para el carbunco cutáneo. Ya no son activas las dosis de 10.000 U cada 3 horas y hay que administrar cada 6 horas 2 millones de unidades durante 7 a 10 días por vía venosa. Cuando hay que tratar pocos casos es mejor infundir en vena gota a gota, en los pacientes graves con repercusión sistémica y con toxicidad y para el carbunco digestivo y pulmonar cada 2 horas. El tratamiento con una dosis de 3-5 millones de U de penicilina G, repetida cada 4 horas durante 48 horas, seguidas 3 o 4 días con 1.500.000 U, o 2 millones cada seis horas hasta la desaparición del edema, siguiendo luego con penicilina oral 7 a 10 días da muy buenos resultados. También es útil iniciar la terapia con la inyección intramuscular de 900.000 U de penicilina-benzatina y 300.000 U de benzilpenicilina, y seguir aplicando cada 6 horas 250.000 U de bencilpenicilina, durante 48 horas. Para los menores de 12 años 50.000 U por kilo de penicilina G cada seis horas i.v. Puede usarse 500 mg de amoxicilina cada 8 horas en adultos y niños de más de 20 kg y 40 mg por kg en 3 dosis para los menores de 20 kg. Estas pautas eliminan a los microorganismos de la pústula, y protegen de la septicemia pero no impiden la formación de la escara. Para mayor seguridad se puede seguir con 250 mg por vía oral 4 veces diarias durante 4-5 días más; si hay edema grave, puede asociarse una inyección diaria de terramicina retardada. En pacientes alérgicos a la penicilina o si la bacteria es resistente, deben usarse antibióticos de amplio espectro, como la doxicilina a dosis de 100 mg intravenosa dos veces al día, habiendose demostrado su eficacia en monos. También son eficaces, utilizables en caso de resistencia o sensibilidad alérgica a la penicilina, la eritromicina, a dosis de 0,5 g o más cada 4 horas, el cloramfenicol, la vancomicina, la doxiciclina, la tetraciclina, la estreptomicina, administrables por vía venosa a dosis muy altas. La bacteria es sensible en los antibiogramas a la gentamicina, vancomicina, cefazolina, ceflotins, clindamicina e imipenem (Lightfoot y cols. 1990, Doganay y cols. 1991). El B.anthracus es resistente a las cefalosporinas de tercera generación.

Las quinolonas, y de ellas el ciprofloxacino es el antibiótico de eleccion a dosis de 400 mg iv (10-15 mg/kg) o 500 mg cada 12 horas orales. No se debe administrar fluoroquinolonas a menores de 16 años por la posibilidad de producir artropatía permanente. Si se administra a niños la dosis debe ser la de 20-30 mg/kg/ dia repartida en dos dosis, sin superar el gramo diario, pasando luego a amoxicilina o a tetraciclina si la cepa es sensible. En las gestantes no se debe emplear ciprofloxacino y en su caso pasar a otro antibiótico una vez efectuado el antibiograma. El ciprofloxacino, se puede utilizar en España para tratar el carbunco pero la FDA que no había incluido al carbunco en las indicaciones de este antibótico lo autorizó el día 28 de Julio de 2000, para evitar el carbunco pulmonar en expuestos. Para la carbuncosis pulmonar o gastrointestinal se deben emplear 2 millones de unidades de penicilina G cada dos horas y por supuesto ciprofloxacino.

El tratamiento se completará con la rehidratación en el edema maligno y en las formas gastrointestinal y septicémica, monitorizando los líquidos y los electrólitos y en especial al iniciar los antibióticos por la liberación brusca de toxinas, oxigenoterapia, medidas antishock séptico, vasopresores y corticoides en las formas meníngeas o con gran edema. Se efectuará traqueotomía precoz antes de que aparezca el edema laringeo, que haría difícil la operación. Cuando la producción de toxinas ha alcanzado un determinado nivel, los antibióticos no curan el proceso. Se esta trabajándo intensamente para descubrir agentes antitóxicos. Maynard y cols (2002) construyeron anticuerpos neutralizantes de la toxina incluyendo solo los fragmentos variables de la cadena ligera (scFvs) y el scFvs fusionado con un dominio constante de kappa (scAbs) que se liga a la subunidad del PA cuyas constantes de disociación (K(d)) estaban entre 63 y 0,25 nM. El anticuerpo completo muy estable a la temperatura y a la desnaturalización. El anticuerpo protegió in vitro a los macrófagos de la acción de la holotoxina, protección relacionada con el valor K(d) de las variantes scFv. Hubo gran correlación entre la afinidad del anticuerpo artificial y su vida media con la protección de la rata frente a la toxina: estos anticuerpos podrían ser útiles para el tratamiento y la prevención.

Cuando se haya secuenciado el genoma del anthracis se podrán emplear medicamentos bloqueantes de algunas propiedades del FL como la de unirse al heptámero de PA como el péptido inhibidor de Mourez y cols.

(2001) o bien receptores solubles de la toxina o bloqueantes de la unión del antígeno protector con su receptor. El dominio extracelular hidrosoluble el VWA/I del ATR inhibe la acción de la toxina, incluso si ya está acoplada con el receptor y podría ensayarse en el carbunco sistémico. Se sabe (Sellman y cols 2001 y Singh y cols. 2001) que mutantes atóxicas del PA neutralizan a la toxina y lo mismo harian inhibidores de las proteasas. Watters y cols. (2001) han descubierto una proteína motórica que confiere resistancia a la toxina letal en algunos fagocitos.

Como han podido entrar esporas tetánicas a través de la pústula debe hacerse la prevención del tétanos.

Prevención del carbunco

El riesgo de carbunco animal es mínimo actualmente. Las medidas serían delimitar y en su caso destruir las esporas en los campos malditos; evitar que los animales pasten en ellos; vigilancia veterinaria de animales y su vacunación. Se debe vigilar la importación de productos animales de procedencia sospechosa. El Código Zoosanitario Internacional considera que el carbunco debe ser de declaración obligatoria y que para la exportación de rumiantes, équidos y cerdos y sus productos se debe exigir el Certificado veterinario internacional que esos animales o los animales de los que proceden sus productos, no tenían síntomas durante los 20 días anteriores, que procedian de explotaciones libre de la enfermedad durante 20 días y que habían sido vacunados antes de 20 días y menos de 6 meses.

En los animales, la prevención se rige por los artículos 229-235 del Reglamento de epízootias. España está exenta de carbunco animal, lo cual no quiere decir que esté erradicado el proceso. Curiosamente, Jones (J Appl Microbiol. 87: 189:1999) decía que el carbunco sigue siendo problema en ESPAÑA, Grecia, Turquia, Albania y Rumania. Si aparecieran casos en animales deben declararse a la autoridad sanitaria, por medio del veterinario y hacer la encuesta epidemiológica, investigando los establos, corrales, encerraderos, pastos y terrenos en donde hayan estado animales enfermos.

Es básico, delimitar los focos enzoóticos, cercándolos si es posible, impidiendo que pasten en él los animales salvo tal vez los équidos más

resistentes vacunados. Los animales enfermos y los sospechosos de estarlo deben aislarse por separado vigilándolos tomando la temperatura rectal inmediatamente antes del ordeño, aislando a los febriles y esterilizando, en todo caso, su leche e investigar si los animales que hayan muerto de forma súbita o inexplicada han podido tener carbunco.

Las cuadras, los mataderos, etc., en donde hayan estado animales enfermos, deben desinfectarse; la paja, el estiércol, las vendas y textiles que hayan tocado animales enfermos deben ser quemados en el propio establo, si no representa riesgo de incendio, antes de la desinfección, para evitar que la materia orgánica inhiba a los desinfectantes. Los desinfectantes útiles son los oxidantes como los hipocloritos o el formol. En la isla de Gruinard, contaminada intencionadamente en la Segunda Guerra Mundial, se trataron unas 4,1 hectáreas (el 2 % de la superficie total) con formol al 5 % disuelto en agua de mar.

Se deben sacrificar a los animales enfermos sin abrirlos para evitar la salida de la bacteria. En Inglaterra está penado abrir los cadáveres de esta enfermedad. Los cadáveres deben incinerarse o saponificarse, y, si no es posible, se les debe enterrar a más de 2 m de profundidad, cubriéndolos con cal viva y, en su defecto, con aceite, en lugares donde no se produzca contaminación del agua ni puedan ser sacados por los animales carroñeros. Si algún animal ha sido enterrado superficialmente, debe sacarse y enterrarse profundamente con las precauciones dichas. El mismo tratamiento debe hacerse en las carcasas y otros restos.

La carne no debe ser aprovechada en ningún caso. Solo los cerdos que padecen una forma limitada de carbunco en los ganglios mesentéricos, se podra utilizar su carne y vísceras, en las que la bacteria está ausente, previamente higienizadas.

El Reglamento Español de epizoótias considera extinguido un foco cuando no han ocurrido casos durante 15 días después del último presentado, norma que sólo es válida si no se produjo contaminación del suelo. En los focos enzoóticos, debe vacunarse al ganado lo antes posible, antes de que hayan transcurrido 10 días de haberse declarado la epizoótia. Debe controlarese las pieles, lanas, etc., que solo deben circular si proceden de mataderos autorizados.

Debe efectuarse una vigilancia sanitaria de los animales, pieles, lanas, etc., importadas. La mayoría de los 483 casos humanos ocurridos en Estados Unidos, entre 1945 y 1955, se debieron a materias contumaces importadas sin tratar. Los anglosajones llaman wet-hides (cuero mojado) a los animales sacrificados presumiblemente sanos y dry-hídes (cueros secos) para los que han muerto por enfermedad, a veces por carbunco. En 1921 se abrió en Liverpool la primera estación para tratar las balas de lana y pelos, que persistió al menos hasta 1971.

Las pieles se deben desinfectar manteniendolas siete días en cubas con lechada de cal adicionada con sales arsenicales o con el método de Seimour-Jones con sublimado y ácido fórmico, o con el de Schttfroch a base de clorhídrico diluido, técnicas que no alteran el curtido. También pueden tratarse con vapores de formol o con inmersión en formalina o con hipoclorito. La beta-propiolactona es un buen esporulicida, pero es cancerígeno. Mejor resultado daría el óxido de etileno que destruye las esporas. La depilación con sulfitos y sales arsenicales es también un método aplicable. En algunos lugares, como Melbourne, se aplican radiaciones ionizantes usando una fuente de cobalto 60, que produce 150.000 curios. Las lanas, crines y pelos se pueden esterilizar una vez lavadas durante 10 minutos en carbonato sódico al 0,27 % a 40º'C. Se escurren con rodillos y se lavan nuevamente durante 10 minutos con una solución al 6,6 % a 40ºC. Se escurren de nuevo y se pasan dos veces a un baño de formol al 2 % a 40ºC. Se enjuagan con agua fría durante 3 minutos y se secan en el horno a 120ºC durante 7 minutos, sacándolos enseguida para evitar que se chamusquen.

También se pueden esterilizar en el autoclave a 120ºC durante 3 horas, pero este tratamiento estropea mucho el material.La harina de carne y huesos «verdes» deben someterse a 150º'C.

Los animales enfermos pierden rápidamente su secreción láctea, pero los bacilos y las esporas pueden contaminar a otros animales. La esterilización de la leche destruye a las esporas (la pasteurización solo a la forma vegetativa).

Se debe impartir la adecuada educación sanitaria del personal que, por razones profesionales, está en riesgo, sobre el modo de manejar los materiales y en todo caso debe trabajar protegido con mascarilla, guantes y mono cuidando especialmente que no se contaminen las heridas que

pudieran existir. Los locales en los que haya animales enfermos y en las industrias que manejen productos animales que pudieran contener esporas o en los que se han manjeado esporas o se han contaminado con fines terroristas, deben ser desinfectados con hipoclorito usando lejia comercial 5 g de cloro por litro distribuida por personal competente y protegido, especialmente los ojos, dada la toxicidad de este producto.

Estos locales deben ventilarse con presión negativa y captación de polvo; se deben descontaminar suelo y paredes por lo que deben ser fácilmente lavables y se debe disponer de lavabos y duchas en número suficiente y los trabajadores utilizarlos después de la jornada.

Los animales enfermos y el material contaminado deben destruirse sin abrir aquellos.

Se deben aplicar las medidas sanitarias apropiadas en los mataderos y fábricas lecheras para que esté garantizada la inocuidad de los productos de origen animal destinados al consumo humano.

La aplicación en el RU del «Anthrax Prevention Act» de 1919 disminuyó enormemente el carbunco industrial.

En España la OM conjunta de Sanidad y Agricultura de 9 de diciembre de 1952 implantó un marchamo que garantiza la sanidad y procedencia de cueros y pieles; clasifica estas en aptas cuando proceden de reses sanas señalando las que deben ser tratadas. Una OM publicada en el BOE del 19 de octubre de 1964, regula las traperías.

Si se presentara algún caso humano debe hacerse:

a) La declaración de la enfermedad con comunicación al veterinario.

b) Establecer un aislamiento relativo, pues no se produce la transmisión de hombre a hombre, evitando la contaminación del personal y la entrada de artrópodos.

c) Tratamiento de los enfermos lo cual reduce la contagiosidad.

El carbunco es una enfermedad profesional. Está incluida en los Anexos de los Decretos de Enfermedades Profesionales de 1947 y 1961. Por ello, el empresario debe comunicar antes de 10 días a la Inspección Provincial del Trabajo la baja del operario, y el médico de empresa lo ha de hacer a la Caja Nacional de Accidentes del Trabajo y Enfermedades Pro-

fesionales. La Reglamentación Nacional del Trabajo en Curtidos de 1946 estableció medidas para sus afiliados. La OM, del 12-1-1963 de Trabajo estableció las normas para el reconocimiento, diagnóstico y calificación de enfermedades profesionales; en el caso del carbunco, da derecho a reparación por el seguro cuando haya sido adquirido por contacto durante el trabajo con animales enfermos o sus cadáveres, por manipulación de sus restos, por comercio y manufactura de pelos, lanas y pieles, sea cual fuere el cuadro clínico. En las normas figura el examen de pieles o pelo, por la reacción de Ascoli en tenerías y fábricas de brochas y pinceles, donde haya habido algún caso.

Prevención en contactos; aunque no se ha descrito ningún caso de transmisión interpersonal se deben tener ciertas precauciones con los enfermos y utilizar mascarillas y mejor filtros HEPA. Es preferible incinerar a los cadáveres y en su defecto introducir en el ataud hipoclorito y cubrir la sepultura con cal viva.

Las personas que hayan estado en contacto directo con una sustancia sospechosa deben lavar abundantemente la zona expuesta con agua y jabón.

Vacunación de animales

En 1950 se llego a tener vacunados el 96,2% de las cabras y ovejas de Francia a partir de cuya fecha dejaron de presentarse casos hurnanos y a partir de 1968 ninguno animal, pero se siguió vacunando hasta 1973 de forma restringida para impedir la reaparición de casos. La vacunación logró erradicar el carbunco en Chipre. En esta isla con unas 500.000 cabezas de ganado lanar y cabrío, que pastaban dispersos por la isla generalmente en lugares apartados, la enzootia mataba anualmente a unas 50.000 cabras y ovejas debido al abandono de los cadáveres de los animales a los buitres y otros animales, pues enterrarlos era un trabajo pesado, ya que el suelo es rocoso.

La vacuna anticarbuncosa animal se puede mezclar con la antibrucelósica. También se puede aplicar simultáneamente con la vacuna contra el carbunco bacteridiano producido por el C. chauveii, pero usando jeringas diferentes e inyectándola en otro lugar, para evitar que el formol de la antichauveií altere las esporas de la vacuna carbuncosa.

Vacunas anticarbuncosas

La vacuna ideal sería la que protegiera de las proteinas que intervienen en la germinación de la espora, de las estructurales, y de forma especial contra el PA, para provocar inmunidad antitóxica a la que contribuyen en menor grado, los factores letal y el del edema como lo confirmaron Tvins y cols. (1966) en cepas carentes del plásmido pXOl o del pXO2. Brossier y cols. 2000 encontraron que el complejo LF-PA era necesario y suficiente para producir una buena respuesta de anticuerpos contra el LF, sin que se necesite que el LF esté activado, ni unido a la superficie de la bacteria. La seroconversión por ELISA, se define como una concentración de IgG anti PA igual o superior a 25 γg/ml, pero no se ha establecido una correlación precisa entre el título de anticuerpos y la protección frente a la infección. (Turnbull y cols. 1986,Broster y col 1990). Hay que tener en cuenta que los anticuerpos antitóxicos no tienen efecto sobre las bacterias cápsuladas. Es deseable que la vacuna estimule la inmunidad humoral y la celular. La vacuna no debe aplicarse hasta haber transcurrido sl menos 15 días, de haber aplicado la antitoxina.

Las vacunas anticarbuncosas pueden ser:

1) **Atenuadas.** Al parecer fue Henri Toussaint el primero que obtuvo una vacuna, con bacteridia atenuada, pero fue Louis Pasteur, quién al aplicar al B.anthracis su descubrimiento de que la Pasteurella séptica, agente del cólera aviar, envejecido unos 15 días perdía su virulencia, abrió la vacunación anticarbuncosa. Pasteur con Chamberlan y Roux en 1881, encontraron que una cepa de anthracis, virulenta, cápsulada, microaerófila, no proteolítica y anesporulada, mantenida 15 días en la oscuridad a 42,5ºC, perdía la patogenicidad, que luego se supo era debido a la eliminación de unos 10 plásmidos (Mikesell y cols. 1983, Ezzeil y cols. 1985) con pérdida de la producción de PA y LF; en 1881 inyectaron varias dosis de 0,25 ml a vacas y de 0,15 ml a 24 ovejas y a 1 cabra, comenzando por los cultivos más atenuados de un redil de la granja de «Puilly le Fort», cerca de Paris dejando otro grupo igual sin vacunar, ante muchos ganaderos de la Sociedad Agrícola de Melun. Al mes inocularon estos animales con una cepa virulenta de anthracis y solo murió uno, mientras que en el grupo control murieron todas las ovejas y la cabra. Este éxito llevo a vacunar al año siguiente masiva-

mente a los animales en Francia; la vacuna fue ensayada por Gregorio Arroz, veterinario de Obanos (Navarra), al año siguiente. La vacuna protegía, pero si la atenuación era insuficiente, mataba al animal y aumentaba la diseminación del proceso, y si era excesiva, no inmunizaba. Soberheim aumentó la seguridad adicionando a la segunda dosis suero anticarbuncoso. En 1927 se sustituyó la vacuna de Pasteur con la cepa atenuada 34 F2.

Shlyakhov y cols. (1994) vacunaron a 2.596 personas con una vacuna viva humana (HLAV) por vía hipodérmica, por escarificacion, y por aerosol que positivizó a los 2-6 días la intradermoreacción con anthraxina, sensibilización que fue aumentando exponencialmente hasta el día 15 manteniendose constante hasta el vigésimo día, a partir del cual disminuyó mucho la positividad tal vez por destrucción de macrofágos por el factor letal quedando positivos al cabo de un año solo el 22 al 35 %.

Se han logrado diversas vacunas recombinantes. Una de ellas utiliza una cepa de anthracis desprovista de los genes codificadores de la cápsula, el FL y el FE quedando el AP puro en un 98% (Farchaus y cols. 1998). Se han transformado las cepas DeltaANR y la DeltaSterne, no cápsuladas no toxigénicas de Bacillus anthracis, con cuatro diferentes plásmidos recombinantes que expresan el PA con varias intensidades con las que se obtienen vacunas protectoras con una sola dosis cuya eficacia es paralela a la del título de anti-PA logrado.

Brossier y cols. (2000) obtuvieron mediante ingenieria genética una cepa cuyos FL y FE eran atóxicos, isogénica con la actual vacuna viva Sterne considerándola candidato seguro para ser usada como vacuna.

El USAMRIID, (Instituto de Investigaciones Médicas sobre Enfermedades Infecciosas del Ejercito de Estados Unidos) obtuvo una vacuna a base de una mutante, de la cepa Sterne, dependiente de cuerpos aromáticos inexistente en los tejidos humanos, por lo que no se puede difundir en ellos. Otra vacuna recombinante del USAMRIID, se obtuvo clonando el gen del AP a bacterias de baja patogenicidad como el B. subtilis. También se ensaya el Lactobacillus, comensal intestinal, en el que se han clonado genes codificadores del AP, inmunógeno, atóxico, seguro, administrable por vía oral, productora de IgA. La vacuna STI utiliza esporas procedentes de bacilos acapsulados.

Las vacunas atenuadas producen anticuerpos anti LF PA-dependientes. Brossier y cols. (2000) encontraron que la unión del LF al PA in vivo era necesaria y suficiente para obtener una fuerte respuesta de anticuerpos contra LF, sin que se necesitara el LF para la unión de la toxina letal a la superficie de la células. El PA mutado es cortado en el suero del ratón.

2) **Vacunas basadas en esporas procedentes de bacilos acapsulados**. A causa de las reacciones adversas debidas a las vacunas atenuadas se introdujeron las vacunas de esporas, llamadas atenuadas, por proceder de bacilos atenuados por el calor a 42,3ºC, por suero anticarbuncoso (Soberheim) o por la saponina, (Personeus y cols. en su vacuna Carbazoe). El Instituto Pasteur de París produjo una vacuna de esporas, para bóvidos, cuya atenuación es semejante a la de las bacterias de la segunda dosis de Pasteur. Las vacunas con esporas, suponen manejar estas con riesgo para los laborantes y de contaminar la tierra, por lo que no deben fabricarse. El Pasteur obtuvo una vacuna de esporas procedentes de una bacteria avirulenta, utilizable para varias especies animales mediante una sola inyección de 0,50 ml para los bóvidos y de 0,25 para los demás animales a partir de la tercera semana de vida y en los potros a partir de los dos meses; los animales deben quedar en reposo unos cuatro días después de la vacunación. No deben vacunarse las hembras gestantes; la vacuna produce una ligera disminución de la secreción láctea. La vacuna más utilizada en la actualidad es una suspensión de esporas vivas de la cepa Sterne, que ha perdido el plásmido pXO2 codificador de la cápsula. que conserva cierta virulencia pues conserva el pXO1 que codifica el AP (Anaisimov y cols. 1996) el FL (Annas 1992), y el FE (Anthony y col 1997), por lo que ha causado la muerte de algunas cabras, llamas y a veces de otras especies (Ivins y cols. 1988,1990,1992,Welkos y cols. 1988).

La URSS, usó una vacuna de esporas de la cepa Sterne que carece de LF, para vacunar animales (bóvidos) y para el hombre, vacunando por escarification, por inyección subcutanea o por aerosol cuya actividad valoran con la anthraxina. Los trabajadores de la factoria militar de Sverdlovsk estaban protegidos con una vacuna atenuada pues Jackson y cols. (1998) recuperaron ADN de 11 trabajadores que habían fallecido en la epidemia de 1979 en el que la PCR encontró genes de la toxina y del an-

tígeno cápsular de una capa de vacuna atenuada y de la bacteridia silvestre lo cual parece indicar que la protección fue insuficiente tal vez por la entrada masiva de esporas.

La vacuna con esporas recombinantes parece ser más eficaz que la obtenida con las formas vegetativas; todas ellas protejen a los cobayos de aerosoles de esporas (Ivins y cols. 1986). Cohen y cols. (2000) obtuvieron varias vacunas de esporas, procedentes de bacilos no cápsulados muy atenuados no toxinogénicos que expresaban distintos niveles de AP recombinante (rAP), el cual conservaba las caracteristicas del PA original y que eran capaces de esporular, Una sola dosis de 5 x 10^7 esporas de la cepa MASC10, que expresa al menos 100 microgramos por ml de rPA, inyectados al cobaya, determina altos titulos de anti PA que persisten al menos 12 meses, protegiendo al animal de la inyección de esporas de la cepa Vollum letal. Esta vacuna fue aplicada a las tropas americanas desplazadas a la península arábica de cuya seguridad y eficacia respondió en 2002, el «Institute of Medicine of the National Academy of Sciences»;algunos informes internacionales (Schumnn y cols. 2002) atribuyeron a esta vacuna el «síndrome del Golfo».

c) **Vacunas muertas**. Chamberland y Roux probaron tres tipos de vacuna anticarbuncosa con bacilos muertos que protegieron por varias vías al 80% de los vacunados frente a la inoculación de la bacteria, La vacuna muerta causa reacciones adversas, aunque de pequeña importancia, respecto a los animales a los que se administró placebo.

d) **Vacunas químicas**. La vacuna química clásica fue obtenida por Schlingman y cols a partir del filtrado estéril exento de proteinas, del supernadante rico en AP, el mas importante inmunógeno del B. anthracis cada vez mas purificado y concentrado, con alguna cantidad de los factores letal y del edema. Las vacunas con AP purificado son las que dan mejor resultado. Wright y cols. (1954),Darlow y cols. (1956), Ivins y cols.(1995, 1998),Pitt y cols. (1995). Friedlander y cols. (1999) encontraron que protegia al rhesus de la inhalación de esporas. Williamson y cols. (1999) obtuvieron una vacuna con el PA, como principal inmunógeno capaz de inducir mas de 10^4 IgG, la mayoría IgG1 en ratones C57B16 y Balb/c lo que indica que la respuesta se debía predominante a los linfocitos Th2. Gaur y cols. (2002) vieron que la administración al ratón de tres dosis los días 0,15, 28 de una vacuna con AP purificado in-

tranasal o subcutáneo provoca títulos altos principalmente de IgG1 por ELISA y en los vacunados por vía nasal se produjeron además altos títulos de IgA y el suero protegió a las células J774A, de la toxicidad que habría causado concentraciones tóxicas del FL, lo que sugiere utilidad de esta vía.

La inmunización de macacos rhesus con una sola dosis de 50 microgramos de PA recombinante con diversos adyuvantes, causa la proliferación de los linfocitos y anticuerpos IgG e IgM neutralizantes de la citotoxicidad con títulos máximos a las 2 y 45 semanas respectivamente. A las seis semanas la exposición a aerosoles con 93 DL_{50} de esporas virulentas demostró una protección superior al 90%. (McBride y cols. 1998).

Beznosov y cols. (1997) extrajeron una proteína de superficie de 92 kD de bacterias vegetativas de B.anthracis cepa STI-1 atenuada, con 3% de lauril-sarcosilato sódico a 4ºC, que purificaron por cromatografía de adsorción en hidroxiapatita; inyectada con el adyuvante de Freund, en ratones blancos, reveló buenas perspectivas para su uso como vacuna química.

Se ha demostrado en diferentes modelos animales, incluso el macaco, utilizando diferentes vías de administración (Wright y cols. 1954, Auerbach y cols. 1955, Darlow y cols. 1956, Ivins y cols. 1986, Little y cols. 1986) su eficacia incluso frente a la exposición pulmonar.(Ivins y cols. 1995; Pitty cols. 1995; Ivins y cols. 1998; Friedlander y cols. 1999).

Las vacunas químicas están indicadas para proteger a profesionales muy expuestos. Se administran 0,5 ml con la pauta clásica de 0, 2, y 4 semanas repetidas a los 6, 12 y 18 meses seguida de dosis de refuerzo anual mientras dure la alta exposición, pero la protección es pequeña. Ensayos en rhesus indican que protege, pero se ignora si será eficaz ante la inhalación de esporas. En caso de agresión con esporas, después de dar la quimioprofilaxis, se puede administrar una serie vacunal a las 0, 3 y 4 semanas.

USA dispone desde 1970 de la Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA), producida por la Bioport Corporation, Lansing, Michigan. Se absorbe en hidróxido de aluminio, (no más de 0.83 mg por dosis) como adyuvante más 0.0025 a 0,004% de cloruro de benzetonio y 0,01 a 0,0037% de formaldehído como conservantes. Algunos lotes contienen algo de FL y aún menos del FE que tal vez contribuyan a aumentar la respuesta. Es la que es-

timula la inmunidad humoral pero no la celular que se administra en 6 dosis (semanas 0, 2 y 4 y a los 6, 12 y 18 meses.

Todas estas vacunas necesitan adyuvantes entre ellos el hidróxico alumínico o el monofosforil-lípido o la Bordetella pertussis o el Corynebacterium ovis, lo que aumenta las reacciones vacunales. Se ha ensayado como adyuvante para el PA en animales el Detox que contiene el esqueleto de paredes del Micobacterium phlei o del M. bovis, que tienen muramil dipéptido (MDP), y un 10% de monofosforil lípido A (MPL) en escualeno al 2%. El Triple mix o Tri-Mix es el Detox mas dimicolato de trealosa, y emulsión de MPL unido a escualeno-lecitina-tween 80. Aunque estos adyuvantes son inmunogénicos no son peligrosos aunque pueden causar uveitis, y artritis (Bussière y cols. 1995). La inyección de PA con treonil-MDP em im emulsionante mató a los carias a los 1 a 5 días. Estos adyuvantes no estan autorizados para ser usados en vacunas humanas y no se han añadido en las vacunas empleadas en la Guerra del Golfo pero en varios cientos de afectados por el síndorme del Golfo Asa y Garry,encontraron anticuerpos anti-escualeno y en unos pocos controles, haciendo pensar en su uso secreto (Nass 1998).

Mahland y cols. (1966),Turnbull y cols.(1986), vieron que protegía a mamíferos de lo que dedujeron que dos inoculaciones protegerían al hombre 1-2 años. Esta vacuna se puede liofilizar haciendo innecesaria la cadena de frío. Las vacunas de USA y del RU son toxoides muy purificados obtenidos de filtrados ricos en AP, de la cepa V770-NP1-R de anthracis no proteolítica, aislada de una vaca carente de pxO2 y por ello acapsulada (Ivins y cols. 1988, 1990, Turnbull y cols. 1990).

La vacuna inglesa con más FE y FL, es para Jones y cols. (1996) ligeramente mejor que la americana, está adsorbida en alumbre (Tumbull 1991).

La vacuna MDPH-PA obtenida de la cepa Vollum, era producida hasta febrero de 1998 por el Michigan Department of Public Health, y por el Michigan Biologic Product Institute [MBPI]), contratadas por el Departmento de Defensa rDOD]) o MDPH-AVA (carbunco vaccine adsorbed). Las inspecciones efectuadas por la FDA no iban siendo satisfactorias y en 1998 se vendió la patente a BioPort, que es hoy el único fabricante autorizado de USA. La potencia de los lotes de las vacunas UK o MDPH-PA es muy variable (lvins y cols. 1994, Nass 1998). Esta vacuna se inyecta a

dosis de 0,5 ml subcutáneamente, las semanas 0, 3, 6 y 32, con recuerdos anuales. (Greenfield 1980), o bien tres dosis, las semanas 0, 2 y 4 que cuatriplica en el 95% de los vacunados el título de IgG anti PA seguida de tres dosis de recuerdo cada seis meses y luego un recuerdo anual. La respuesta protectora de anticuerpos solo se desarrolla a los siete días después de la segunda dosis. La vacuna es bien tolerada. En la zona de inyección pueden producirse, aunque infrecuentemente, eritema y sensibilidad. Raramente se ha producido fiebre y escalofríos. Indicada en veterinarios, personal de laboratorio y en caso de amenaza de agresión con las esporas, al ejército. Tiene una eficacia protectora superior a la de la vacuna atenuada, Protege a los animales durante 2 años frente a una dosis infecciosa. Se puede liofilizar. En España, no esta comercializada.

Se ha obtenido AP atóxico utilizable como vacuna, en el Lactobacillus casei y en el B. subtilis lisogénizado por el fago phi 105 induciéndolo por el calor. La proteina recombinante producida por este sistema proteje a los animales de la inyección de esporas de B. anthracis. Pero solo se consiguen unos 2 mg por $l0^{-1}$ l de proteina en el supernandante del cultivo, debido a la inestabilidad del gen y a la proteasa del bacilo huésped.

Cobayas vacunados con tres dosis de PA con B. pertussis y una dosis del adyuvante completo de Freund, desarrollaron un síndrome de envejecimiento, con caída de pelo, anorexia y consunción. Rook y cols (1997) señalaron que la vacuna podría contribuir a la producción de un proceso de autoinmunidad.

Causa reacciones locales, en el 20% de lo casos, menos si se inyectó im., y curiosamente, más frecuentes en las mujeres. En el 20% son ligeras (enrojecimiento, edema, prurito e induración menor de 3 cm, en el lugar de la inoculación); moderadas (edema e induración entre 3-12 cm) en el 3%, e intensas (edema, extenso, o induración superior a 12 cm) en el 1%,y rara vez nódulos. El 2,5% de los vacunados tienen reacciones sistémicas (malestar, mialgias, cefaleas y naúseas y el 0,2 % fiebre, escalofríos. Se han comunicado dos reacciones anafilácticas entre casi dos millones de dosis administradas. No hay estudios sobre efectos a largo plazo. (Brachman y cols. 1962; Wright y cols. 1954).

Los resultados de esta vacuna son favorables (Gladstone 1946, Mahlandt y cols. 1966; Johnson-Winegar 1984; Turnbull y cols 1986; CDC 2000). 0

e) **Vacunas de plásmidos**. La inoculación del plásmido codificador del AP al ratón Balb/c produce IgG a títulos cuyo log es menor de 10, pero que aumenta ligeramente con una inyección de recuerdo pero es grande y rápido si se inyecta rPA. Es decir que el plásmido aumentar la respuesta al PA. El USAMRIID ha diseñado una vacuna de plásmidos ADN uno de cuyos genes es el del AP, que como otras preparadas por este organismo protege al cobaya de la inhalación de aerosoles de esporas (Ivins y cols. 1988).

Política vacunal

El único estudio de campo fue efectuado en los trabajadores de una industria que trabajaba con pelo de cabra en New England,vacunados por Brachman y cols (1962); en los 4 años del estudio se presentaron 5 casos de carbunco inhalatorio y 21 cutáneo uno de ellos en una persona que habia recibido todas las dosis de vacuna y dos que habían sido vacunados parcialmente. Al existir poco riesgo de infección natural no se recomienda vacunar a la población general dada la rareza del proceso ni siquiera a las personas que trabajan con muestras clínicas.salvo para aquellas personas que profesionalmente puedan estar expuestas a elevadas concentraciones del bacilo o de esporas sobre todo si se forman aersoles o polvo, como puede ser el personal de laboratorio que trabaja con nivel 2 de bioseguridad. Además son caras requieren varias dosis y pueden causar efectos colaterales aunque en su mayoria transitorios y su protección no es completa contra todas las cepas de anthracis.

La vacunas anticarbuncosas están contraindicadas en las personas que hayan sufrido anafilaxia con alguna dosis anterior, o hayan padecido una infección por carbunco, y debe posponerse en personas con enfermedad aguda hasta la curación; no se recomienda en gestantes, salvo que los beneficios sean mayores que los riesgos; no existiendo problema durante la lactancia.

En marzo de 1998 se determinó vacunar a los 2,4 millones de las FAS de USA en activo o en reserva con el lote FAV 020, de la MDPH- PA lote que en febrero la FAD habia considerado caducado, pero que fue cambiada la etiqueta,para seguir utilizandolo como prevención de una agresión; Canadá y el R. U. también vacunaron a algunas tropas. Aunque

los lotes se evaluaron en cuanto a potencia para seguir usándolos después de la fecha de caducidad no se estudió la estabilidad antes de 1997.Tampoco se estudió la estabilidad del adyuvante Newman y Powell (1995) señalaron que los adyuvantes, como el alumbre, se desnaturalizan y degradan con disminución de su capacidad adyuvante. Hasta 1990 solo se había vacunado a unas 2.000 personas pero lógicamente se ignora la eficacia y no hay datos sobre su seguridad (Little y cols. 1986, Hambleton 1990, Coulson y cols. 1994, lvins y cols. 1995 1996). Esta vacuna no demostró satisfactoria protección para animales de laboratorio frente a cepas virulentas especialmente si se comparan con las nuevas vacunas (Ibrahim y cols. 1999).

En octubre de 1998, 6.879 miembros de las fuerzas americanas destacadas en Corea, cumplimentaron un cuestionario sobre su estado de salud de los que el 37% lo completaron después de la vacunación. Las reacciones fueron ligeras, locales, de pequeña intensidad, que desaparecieron espontaneamente Solo el 1.9% informaron que las reacciones le habian dificultado en algun grado su trabajo; el 0.3% señaló que habían perdido un día de trabajo el 0.5%, consultó a un médico y 0.02% fue hospitalizado por una reacción local.

Hay que tener en cuenta que es posible que se hayan desarrollado con fines de agresión variantes del B. anthacir frente a las cuales no protegen las vacunas actuales.

PROBLEMA SANITARIO ACTUAL DEL CARBUNCO

El carbunco como agresivo

El carbunco natural si se mantienen las medidas preventivas que tanto éxito ha proporcionado a la veterinaria, puede ser considerado como una enfermedad en vía no de erradicación es decir imposible de producirse por ausencia del agente causal, pero si de su extinción, por la ausencia de condiciones para la transmisión. El empleo de las esporas de anthracis como agresivo, ha adquirido una inquietante realidad.

Las esporas del B. anthracis son candidatas para ser empledas como agresivo, con el único punto crítico de que quienes efectúen aquellas ope-

raciones deben estar protegidos. El organismo independiente llamado «Escorpión» con 21 expertos, considera que las esporas del carbunco, con la toxina botulinica son los agentes que con más probabilidad podrían ser usados en cualquier parte y en cualquier momento, por terroristas o en hostilidades clandestinas. Una agresión de este tipo en poblaciones no podría ser atendida por la Sanidad Militar dado su volumen.

Las esporas de carbunco se producen fácil y rapidamente; se pueden congelar, liofilizar, transportar y diseminar con un bajo coste resistiendo a condiciones desfavorables del medio como la desecación, los ultravioleta e incluso a los desinfectantes; y se pueden dispersar como líquidio o como polvo. La DL_{50} es de 8.000 a 10.000 esporas, de modo que si llegan a los alveolos unas 7.000 esporas causarian carbunco pulmonar a menudo mortal (del virus de Marburgo bastarian unos dos viriones). Un gramo distribuido equitativamente podría matar a 10 millones de personas en una semana. Se ha calculado que con 100 kilos se podría arrasar el area metropolitana de Washington de forma más eficaz que un megaton. Con una inversión de 20.000 euros, se puede obtener un kilo de esporas. Varios países están trabajando, desde hace mucho, con este microorganismo para atacar al hombre y a los animales e incluso al medio.El Office of Technology Assessment (OTA) estimó que con 300 kg de un gas neurológico como el sarin se podría matar a 60-200 personas situadas en un área de 0,22 km^2, que un bomba nuclear de 125 kilotones afectaría un área de 7,8 km^2, matando a 23.000-80.000 personas mientras que una cabeza de misil con 30 kg de esporas de Bacillus anthracis podría matar entre 30.000 y 100.000 personas, en un área de 10 km^2.

Se atribuyó a saboteadores los brotes de carbunco animal aparecidos en Argentina los años 1917 y 1918). Los alemanes en la IGM probaron la efectividad entre otros agresivos biológicos, de las esporas de anthracis para causar epizootias en los renos noruegos.

Broad en el New York Times del 24 de junio de 1998 describió como en 1918 en Noruega se contaminaron terrones de azucar con esporas para contagiar a animales. También se atribuyó a los alemanes infecta a las ovejas rumanas que se exportaban a Rusia, y (con el B. mallei), contra los bóvidos argentinos.

El War Research Service de USA, creado en 1942, lanzó entre 1951 y 1954, Bacillus globigii y Serratia Marcescens en ambas costas de América para demostrar la vulnerabilidad ante ataques microbiológicos, experimento que se continuó con la dispersión de Bacillus globigii,en el metro neoyorquino. Un informe del Medical Research Council, sirvió de base al Subcomité creado en 1936, por el Consejo de Seguridad inglés para dictaminar que era util investigar sobre armas microbiológicas ofensivas y defensivas y en su virtud se puso en marcha en 1940, un Centro experimental en Porton Down al suroeste de Londres que fue llamado Unidad BDP, a cargo del Dr. Fildes.Los estrategas ingleses habían previsto utilizar agresivos microbiológicos contra Alemania y habían calculado que unas 40.000 bombas con B. anthracis lanzadas sobre Berlín, Hamburgo, Francfort y Stuttgart,deberían causar tres millones de muertos. Es posible diseminar aerosoles de concentrados de esporas carbuncosas para causar carbunco pulmonar en animales y en el hombre que mataría al 70% de los contaminados con muchas esporas. Los ingleses construyeron en 1940, un laboratorio en Porton Down, la Unidad BDP, dirigida por Fildes en la que Estados Unidos,Gran Bretaña y Canadá, prepararon en 1941 la «Bomba-N» de unos 250 kg que contenía cien pequeñas bombas de casi 3 kg, que liberaban un aerosol rico en esporas. Se probó en la islita de Gruinard, (Escocia), en 1942-43 en plena Segunda Guerra Mundial, que mató a las 600 ovejas utilizadas como objetivo. En 1947, la densidad de las esporas se mantenía constante y en 1984 aún se encontraban muchas y solo a partir de 1985 hubo una disminución importante por lo que se desinfectó la tierra con formaldehído en 1986 mediante una operación llamada la «Quinta plaga» en recuerdo a la padecida por los egipcios en la época faraónica, que fue bombardeada con granadas artesanales repletas de Bacillus anthracis efectuadas en 1941 y 1942. Esta experiencia demostró su utilidad militar, ya que produjo la muerte rápida de 600 ovejas. Sin embargo se desaconsejó su empleo, por la persistencia y resistencia de las esporas, que convirtieron a la citada isla en un «campo maldito» que solo se logró solucionar en 1986 mediante lanzallamas, formol y lavado con agua de mar a presión. Este experimento se mantuvo secreto y solo se conoció parcialmente en 1981 y de forma completa en 1986. Estimamos que es posible que aún queden esporas mas o menos profundas en un número escaso y por lo tanto dificilmente demostrable. De todos modos son 46 años como mínimo de pervivencia.

Rex Watson, jefe del departamento de defensa química y biológica británico, afirmó en 1981 que, si se hubiera bombardeado Berlín en 1942 con las esporas del anthracis, la ciudad seguiría contaminada. Inglaterra preparó cinco millones de «pasteles» de carne con esporas de anthracis para el ganado,que se destruyeron en 1945. Sin embargo el RU hizo otras cinco pruebas con esporas carbuncosas, la última en 1955 en las Bahamas y se sabe que la URSS habia ensayado la diseminación de bacterias saprofitas.

No es previsible que se utilize como agresivo microbiológico las esporas de carbunco a diferencia de los agresivos químicos para obtener efectos inmediatos como romper el frente,desmoralizar al enemigo etc., ya que requieren tiempo para actuar por lo que son menos útiles pero más utilizables contra la población civil y con fines estratégicos. Aparte de la diseminación por agua o mediante animales de compañía infectados, el sistema más probable y temible sería la dispersión de esporas del carbunco en el aire mediante aerosoles o polvo de la talla deseada, lograda por diversos artificios (los aspersores agrícolas originan partículas de 100 micras que caen enseguida al suelo). Los aerosoles menores de 5_, se mantienen mucho tiempo suspendidos y al ser inhalados llegan a los alveolos, siendo mucho mas peligrosos que los aerosoles secundarios cuyas partículas mayores de 5_ debidas al polvo sedimentado como el que existia en las fábricas de cueros o después de haberse diseminado polvo con esporas, pués esas partículas son retenidas por la defensa mucociliar y aunque pudieran causar carbunco cutáneo, es poco probable que originen carbunco pulmonar, cuya letalidad sin tratar es casi de 100. Tjaden y cols. (2002), advierten que la aparición de una epidemia de neumonía o de muertes, en animales de compañía pudiera ser debida, a una agresión terrorista con carbunco; los animales podrian haber sido contagiados con piensos contaminados. La diseminación de las esporas por el aire puede llevar las esporas a gran distancia así como al suelo en el que persistiría muchos años originando riesgo (Nass 1992). Es previsible que se utilizen las cepas más virulentas, resistentes a quimioterápicos y a las defensas inmunes (Preston 1998) y sobre todo mezclas de cepas (Jackson y cols., 1998) o añadiendo a las esporas agresivos químicos o microbiológicos buscando, asegurar la entrada de una dosis eficaz, o su potenciación con virus que ataquen las mucosas para facilitar la entrada de otros, y para dicultar el diagnóstico y la profilaxis.

Episodios del uso del B. anthracis como arma microbiológica

En 1942 se produjo una epizootia de carbunco que causó estragos en el ganado del Manchukuo. Se sorprendió a un extranjero con medios de cultivo conteniendo gran cantidad de bacilos. El individuo se suicidó sin haber dado ninguna información.

En la Guerra de Corea (1950-1952), una comisión científica internacional, señaló la presencia de B. anthracis en aves de caza, así como la del V. colérico en moluscos.

Es posible obtener en el laboratorio microorganismos derivados de los existentes mejor dotados para ser utilizados como agresivos; parece que USA ha obtenido una cepa de Bacillus anthracis, llamada «Ames» cuyas esporas son pequeñas y más difusibles, muy semejante a la que se empleó en los ataques terroristas de 2001.

Todas las esporas del género Bacillus, basan su extraordinaria resistencia a los agentes fisicos y químicos en tres componentes, el dipicolinato cálcico, la extremada sequedad que puede ser del 5 al 10 por ciento de humedad, en lugar del 80 por ciento de la forma vegetativa y la cubierta protectora de la espora de carácter queratinico muy resistente a los agentes químicos. Por tanto la espora, cualquier espora, liberada del material orgánico vegetativo y desecada en su superficie puede contaminar por vía aerógena, que es la más peligrosa.

El RU preparó cinco millones de «pasteles de carne» para el ganado con esporas, que se destruyeron al terminar la IIGM, pero sin embargo el RU llevó a cabo cinco ensayos con esporas de anthracis, la última en las Bahamas en 1955 según Carter (1992)

Japón instaló durante la IIGM en el Sur de China una factoría en la que trabajaban 3.000 personas en la que obtuvieron «la bomba del anthrax» o «Ha» que contenia 1.500 cilindros cargados con esporas de carbunco o de toxina tetánica (Williams y cols. 1989), que podría haber sido utilizada contra los chinos, fábrica que fue desmantelada al terminar la guerra; algunos cientificos y muestras fueron llevadas a Fort Derrick. Las esporas fueron empleadas en Rodesia en la guerra civil de 1978 contra el ganado de los negros.

El episodio de Sverdlovsk

Los soviéticos capturaron las instalaciones y a los científicos alemanes de Poznan que investigaban sobre agresivos microbiológicos. En Ekaterinburg, ciudad de 1,2 millones de habitantes a 1.369 km al este de Moscow, en la región industrial de los Urales, bautizado por los soviéticos como Sverdlovsk y hoy nuevamente Ekaterimburg, cerrada a los extranjeros, los soviéticos disponían de un complejo militar, la ciudad número 19, en la que se efectuaban desde los años veinte, experimentos de guerra biológica a través de un enorme consorcio —la empresa Biopreparat, creada en 1973 que empleaba a muchos miles de personas que trabajaban en unas 40 instalaciones de investigación, fabricación y defensa, pese a que la URSS había firmado la Convención de Armas Biológicas de 1972.

Las pruebas al aire libre las hacían en la isla «del Renacer» en el mar de Aral, en la que murieron muchos animales y quizá algunos humanos. Curiosamente la comunidad internacional desconocía esta actividad. La URSS disponía de amplias reservas de Y. pestis, de B anthracis cepa Alibekov, de la cepa «U» del virus de Marburg, y al menos 20 toneladas de viruela liofilizada almacenadas en búnkeres. No se puede decartar que parte de esos depósitos salieran al extranjero, en manos de cientificos, exiliados al derrumbarse la URSS.

El 2 de abril de 1979 se produjo una explosión en el Instituto de Microbiología y Virología, situado en el número 4 de la calle Zwezdnaya, cuando preparaba esporas carbuncosas liofilizadas, que hizo que 10 kg de polvo conteniendo millones de esporas salieron del edificio contaminando un área de unos cinco km de radio; la explosión habia sido fotografiada por los satélite americanos. Otra versión atribuye el escape a no haber repuesto un filtro que se quitó por haberse atascado en la planta, en la que los fermentadores, cultivaban bacterias de las que obtenían esporas, que luego secaban para utilizarlas en aerosoles. El responsable del turno olvidó dejar instrucciones para que se reemplazara el filtro, de modo que durante varias horas, hasta que se detectó el fallo, el potente sistema de secado, estuvo arrojando esporas de carbunco.

A los siete días de la explosión murieron varios obreros de una cerámica vecina a la ciudad número 19 (los trabajadores de la planta estaban

vacunados con vacuna atenuada), y muchos casos en la villa de Kachino, cercana al centro de investigación militar que se continuaron en abril y mayo de 1979.

La mayoría de los casos vivian y trabajaban en una estrecha franja en el area de Chkalovskiy que comenzaba en el establecimiento militar, y se extendia en la dirección de los vientos predominantes hacia el Sur de la ciudad. De 66 pacientes que se sabía donde vivían y trabajaban, 57 lo hacían en el area; cinco habían asistido a clases de la reserva militar en la primera semana de abril en el complejo de edificios número 32, y en un caso se supo que las clases habian comenzado el lunes 2 de abril a las 8,30 los demás tenian ocupaciones tales como conductores que permitían pensar qque habian tenido relación con la zona. En la parte norte de esta zona de alto riesgo estaba situado el complejo de edificios número 19, contiguo al complejo de edificios número 32. En ambos complejos había numerosos bloques de viviendas en las que vivian unas 5.000 personas en el 19 y unas 10. 000 en el 32.

El carbunco habia sido enzootico en el distrito de Sverdlovskaya desde antes de la Revolución de 1917; pero las esporas llegadas al suelo, en 1979 causaron una epizootia en el ganado que pastaba al sur de la ciudad en una zona a mas de 50 km de la fábrica (Abramova y cols.1993, Walker y cols. 1994) a continuación de donde aparecieron la mayoría de los casos humanos, en la dirección de los vientos dominantes. En el pueblo de Abramovo, de unas 100 casas situadas a 50 km al sudeste del complejo de edificios número 19, el 5 de abril de 1979, enfermó de carbunco una oveja; en los dos dias siguientes se dieron sendos casos y un séptimo el día 8, lo que daba una tasa de ataque de un 2% y el 10 de abril enfermó una vaca de otra granja. El 25 de abril de 1979, se informó que habían muerte o se habían sacrificado a siete ovejas y una vaca con carbunco; varios animales de seis pueblos vecinos dieron positivos los tests bacteriológicos y se produjeron brotes animales en seis pueblos situados en la zona considerada de alto riesgo para el hombre. El 10 de abril se comenzó a vacunar, poner antitoxina o ambas cosas a 298 ovejas. Las ovejas enfermas dieron lugar a un segundo brote de carbunco ahora intestinal. Esta distribución de los casos hizo pensar en la influecia del viento dominante en los dias anteriores.

Se dijo, exageradamente que se habían producido mil casos de carbunco humano, lo que no parece cierto, pero en las dos semanas siguientes, al accidente hubo un incremento claro en el número de defunciones en la ciudad, y bastantes por carbunco pulmonar y cutáneo. Pese a las múltiples peticiones del gobierno de los EEUU para que se explicara este hecho. Boris Yeltsin, a la sazón, máximo responsable del Partido comunista en la región y las autoridades comunistas locales, atribuyeron la epidemia al consumo de carne infectada con carbunco, aserto que mantuvieron en un comunicado el 20-3-1980.Las agencias americanas lo atribuyeron a esporas liberados de la empresa militar. El estudio epidemiológico mostró que muchos afectados trabajan o vivian en una zona que se extendia desde la empresa militar hacia el sur zona que recibia el viento del norte que predominó antes del brote; en esa zona en la que se produjeron muertes de animales domesticos. Al episodio de Sverdlorsk, se le ha llamado el Tchernobil biológico. A finales de 1981 varias revistas soviéticas de medicina, de veterinaria y de derecho, mencionaron que se produjo un brote de carbunco en el ganado del sur de la ciudad en la primavera de 1979 y un pequeño número de casos de carbunco intestinal, debido a la ingesta de carne y de pústula maligna por contacto con animales enfermos. Esas publicaciones permitieron que se conociera el episodio en Occidente. En 1988, dos médicos soviéticos manifestaron en una visita a USA que hubo un foco epizoótico al sur de Sverdlovsk en marzo de 1979,que había provocado entre el 4 de abril y el 18 de mayo, 17 casos de pústula maligna y 79 de carbunco intestinal con 64 defunciones, sin mencionar casos pulmonares, lo cual señalaba que los casos humanos se debian a contacto y sobre todo a la ingesta de carne de animales contaminados. Cuando se reconoció que los casos humanos eran de la forma pulmonar se achacó al esquileo de los numerosos rebaños de ovejas que habrian diseminado las esporas, explicación improbable ya que en abril en los Urales hace mucho frío y no se esquila al ganado.

En unos pocos días, los médicos de la ciudad atendieron al menos a 200 personas, la mayoria de las cuales trabajaban o vivían en una estrecha área en la que se encontraba la base militar, afectados con un cuadro inicialmente de gripe, pero que rápidamente, sufrían hemorragias cerebrales y pulmonares con alta letalidad. Hay más de 60 casos documentados y posiblemente haya varias decenas más que podrían haber sido archivados como victimas de afecciones gripales. Durante abril y mayo de 1979, mu-

rieron al menos 66 personas por inhalar esporas de carbunco. Los medicos y sanitarios visitaban en sus casas a los enfermos sospechosos y confirmados, dando tetraciclina como profiláctico, desinfectando la cocina y las habitaciones de los enfermos. Los cadáveres se introdujeron en ataúdes con pasta de hipoclorito y enterrados en una zona aparte del cementerio.

La distribución de los casos es consistente con la del aerosol de las esporas liberadas por el Complejo de edificios número 19 en las condiciones atmosféricas del 2 de abril de 1979. Se estimó que el aerosol liberado estaba formado por partícules menores de 5 (m, con una tasa de caida de la infecciosidad menor de 0,001 min^{-l}) con una velocidad deposición menor de 0,5 cm/s^{-l}, insuficiente para reducir de modo substancial la concentración en 50 km.

A comienzos de los 90 aparecieron en la prensa rusa varios artículos sobre aquel brote epidémico en los que se cuestionaba la explicación de un contagio alimentario. El portavoz oficial del gobierno respondió diciendo que, en 1979, se había estado trabajando en el desarrollo de una nueva vacuna contra el carbunco, pero que no se tenían noticias de que hubiera habido accidente alguno.

La doctora Faina Abrámova, a la sazón forense de Sverdlovsk, autopsió el cadáver de un enfermo, de 36 años, que había participado en unos entrenamientos militares en la ciudad numero 19. El enfermo ingresó con fiebre muy alta, trastornos respiratorios y pérdida del conocimiento. Abrámova, en 2001, ya con 80 años, dijo que se habían pedido camas para atender a enfermos de carbunco; ella había visto enfermos de este proceso, pero a diferencia del carbunco habitual en este caso afectaba a los órganos internos, sobre todo a los pulmones. A la autopsia acudieron muchos colegas que sentían curiosidad. En los hospitales de la ciudad habian aparecido enfermos con cuadros clínicos semejantes y la ciudad era un hervidero de rumores. Abrámova recuerda que una de sus ayudantes le sususrró al oido que la noche anterior había participado en la autopsia de un cadaver con síntomas parecidos. Abrámova comprobó que las lesiones eran semejantes a las de un hombre mayor de 60 años que trabajaba en los laboratorios de Biopreparat. La doctora Abrámova y el doctor Lev Gridberg participaron en 42 autopsias y lograron guardar la documentación de su trabajo, pese a que que debían entregar todo el material relacionado con las autopsias, (las historias clínicas fueron re-

quisadas), gracias a la complicidad de los médicos, incluido el académico Nikíforov, especialista en carbunco, uno de los dos altos funcionarios-comisarios, quién autorizó que se describieran las lesiones, pero sin que se sacaran conclusiones pues el origen de la epidemia era secreto, pues revelaba que se estaba estudiando el empleo de aerosoles con fines militares. Estos médicos pudieron burlar a los representantes del Ministerio de Defensa y del Comité de Seguridad del Estado y publicar con Grinberg en 1991 los resultados de su investigación.

Así como los brotes naturales del carbunco se deben a una sola cepa, en los preparados para uso militar puede haber mezcla de varias. En el brote de Yekaterinburg de 1979 había cuatro de las seis cepas de carbunco conocidas. Los soviéticos habían obtenido una variante genética muy virulenta del Bacillus anthracis, probada por la CIA, que muy probablemente hayan conseguido grupos terroristas.

Nadia Mákova hija de Vera Koslov, entrevistada por Pilar Bonet (Pais 4 de Noviembre de 2001) dijo «que al volver Vera del trabajo el día 10 de abril de 1979, se sintió mal; tenía 40ºC y tos y murió antes de transcurridas 24 horas. Las autoridades sanitarias no permitieron que su hija Nadia Málkova viera a su madre muerta, El mismo día murieron varios compañeros de trabajo.

A los entierros sólo dejaron ir a un varón de cada familia. En la casa de los fallecidos y en los edificios cercanos a la ciudad número 19, técnicos protegidos con máscaras y trajes especiales recogían la tierra, limpiaban las fachadas, y hasta asfaltaban la calle sin dar explicaciones. A Málkova le confiscaron la carne y las verduras de la nevera, y las sábanas de su madre. Unas enfermeras le dieron unas tabletas de tetraciclina, y dos misteriosos funcionarios le obligaron a firmar un documento por el que se comprometía a no contar nada de lo sucedido. Aquello hizo sospechar a Málkova que la versión de la carne contaminada no era verdad. «Mi hijo Andrei que entonces era pequeño, había dormido en la misma cama que mi madre y no se había contagiado, afirma Mákova que no puede contener las lágrimas cuando recuerda aquello. El certificado de defunción, que tardó en obtener, atribuía la muerte de su madre a «una infección no identificada».

En la zona de Chkalovskiy en la que hubo muchos enfermos los bomberos lavaron las fachadas y los árboles: la policia mató a los perros va-

gabundos y se asfaltaron las calles que no lo estaban. Carteles y periódicos informaron a la población del riesgo de carbunco. Se requisó e incineró la carne procedente del sur y a mediados de abril se comenzó a vacunar con STI a las personas de 18 a 55 años residentes en la zona de riesgo, de forma voluntaria llegándose a vacunar al 80% de las 59.000 personas al menos con una dosis.

El régimen, mejor diriamos el sistema comunista tiene como principio negar los sucesos negativos aunque pongan en peligro a la población como ha sucedido en China con el SARS y naturalmente negaron la existencia de la epidemia y desde luego de su origen. Meselson recibió confidencialmente información de los médicos locales que habían desechado el origen alimentario, consiguiendo datos de antiguos enfermos, la direccion de 68 fallecidos de una lista de la KGB y notas de autopsias que dejó la KGB que había requisado los informes médicos. Meselson y cols. solo pudieron publicar sus investigaciones en 1999 en Science que recoge datos de 66 pacientes que murieron y de 11 que sobrevieron.

En 1991 Boris Yeltsin, presidente de Rusia, que en 1979 había sido el Jefe del Partido Comunista de la Región encargó al Consejero de Ecología y Salud, determinar el origen de la epidemia sin que se conociera el resultado. En mayo de 1992, Yeltsin comunicó que «la KGB había admitido que la causa del brote fueron los programas de investigación militar». Pero posteriormente el Jefe del Comité nombrado por Yeltsin par vigilar el desarme quimico y biológico, expresó dudas respecto al origen y en el mismo 1992, un equipo de científicos rusos y americanos establecieron que se había producida una liberación accidental de B. anthacis de una istalación militar matando a muchas personas y animales que habían inhalado la bacteria. En 1992, aparecieron en la prensa rusa varios artículos cuestionando el origen alimentario y se promulgó un decreto que prohibía los experimentos biológicos con fines militares. Meselson y cols. publicaron en Science (266;1202:1994) un estudio epidemiológico que confirmaba que la epidemia se había transmitido por el aire. Ken Alibek, uno de los jefes de Biopreparat, que en 1992 huyó a Estados Unidos y asesoró al Pentágono en temas biológicos confirmó el origen de la epidemia.

El laboratorio de Sverdlovsk, donde se produjo el accidente de 1979, siguió funcionando y formando parte de la red de Biopreparat al menos

hasta el fin de la guerra fría. Se sabe que la URSS hizo ensayos, diseminando bacterias saprofita.

Las esporas de carbunco en Oriente Medio

Entre 1985 y 1991, Irak desarrolló la producción de esporas de carbunco (y las del Cl. perfringens, cuya bacteria ocasiona gangrenas e intoxicaciones alimenticias, así como toxina botulínica, y aflatoxina) para ser empleados como armas de guerra. El ejército iraquí desplegó 200 bombas y 25 proyectiles balísticos cargados de agentes biológicos durante la operación «Tormenta del desierto» aunque no las usaron y en todo caso hubiera sido poco eficaz por la enorme extensión de terreno a cubrir, porque no disponian de mecanismos de dispersión eficaces y porque las tropas americanas estaban vacunadas y disponian de filtros tipo HEPA. El Gobierno de Sadam Hussein reconoció haber probado armas microbiológicas y en 1995 admitió a los Inspectores de UN que habia preparado armas con esporas de carbunco, antes de la Guerra del Golfo habiendo montado en la ciudad de Salman Pak, un laboratorio de investigación microbiológica con fines militares que había producido 6.000 litros de cultivo de bacilo carbunco, 14.000 de toxina botulínica y 16 bombas con aflatoxina.

En diciembre de 1990 un mes antes del inicio de la Guerra del Golfo Irak había desplegado en aeropuertos y en bases militares unas 200 armas biológicas incluyendo misiles Scud y bombas de aviación con cabezas conteniendo esporas de carbunco, toxina botulínica y aflatoxina.

En 1991, en vísperas de la guerra del Golfo, se convocó en el Pentágono un debate sobre el carbunco al que acudió Bill Patrick, de 71 años, uno de los dos o tres científicos vivos que quedaban en Estados Unidos con conocimiento técnico directo de las armas biológicas. Patrick se mantuvo en silencio, sentado, mientras un grupo de analistas de espionaje, hombres y mujeres jóvenes y bien trajeados, hablaban del "ántrax" con aire de entendidos. «Llegué a la conclusión de que esa gente no sabía de qué estaban hablando», recuerda Patrick. Les dijo: «¿Alguno de ustedes ha visto el ántrax?»; metió la mano en el bolsillo, sacó un bote con polvos de color ámbar y lo empujó sobre la mesa que botó y rebotó hacia los analistas, que retrocedieron inmediatamente. El bote contenía simulador de esporas, un polvo biológico esencialmente idéntico a la bacteria, excepto que no mata. Por cierto, lo he pasado por seguridad», añadió Patrick a sus aterrorizados interlocutores.

Posteriormente, Patrick fue el miembro de mayor edad del equipo de inspectores de armas de Naciones Unidas en Irak. Los iraquíes sabían exactamente quién era. Los miembros de los servicios de inteligencia del país llamaban por teléfono a la habitación de su hotel de Bagdad a medianoche, susurraban «Patrick, hijo de puta», y colgaban. Era una especie de honor, pero me desvelaba».

En previsión de un agresión con estos agresivos se vacunó a parte de las tropas de la Coalición Internacional contra algunos microorganismos entre ellos el B. anthracis.

La inteligencia israeli dijo que se habían hospitalizado enfermos iraquíes con carbunco según fuentes iraníes. En el aereopuerto de Tel Aviv se proveyó a los viajeros de máscaras antigas ante la eventualiadad de un ataque químico o microbiológico por parte de Irak. Sadam Hussein se comprometió a la destrucción de estos agresivos (así como los químicos) pero el presidente de la Comisión de NU Rolf Ekeus informó al Consejo de Seguridad de NU el 26 de agosto de 1995 su gran preocupación de que «algunos agentes biológicos pudiera estar escondidos". Aunque Irak siguió negando durante varios años que tenia un programa de agresivos biológicos reconoció en 1995, como consecuencia de la defección del yerno de Saddam Hussein Kamal, a cuyo cargo estaban los programas de armas especiales, que en los años anteriores a enero de 1991 cuando empezó la «Tormenta del Desierto» había producido en Al Hakan, Daura Foot, en el Salman Pak y en el Instituto Mouth Disease 8.575 litros de carbunco (más 11.800 litros de concentrado de toxina botulínica); en diciembre de 1990 Iraq ya habia llenado mas de 150 bombas y 50 cabezas de proyectiles con esos agentes, las cuales se guardaron en almacenes dispersos sin que llegaran a ser usadas en la guerra.

Pese a la derrota de la Guerra del Golfo, a las resoluciones de la ONU y a la inspección internacional Saddam Hussein dispuso de un importante arsenal biológico que fueron destruidos por UN en 1996.

El Departamento de Defensa de USA anunció el 15 de diciembre de 1997, que se iba a comenzar a vacunar en coordinación con el «Anthrax Vaccine Immunization Program» a todos los militares para tener sus FAS protegidos en 2004 contra el carbunco dado el posible uso bélico de este microorganismo El 12 de abril de 2000, 425.976 personas habían recibido

1.620.793 dosis de vacuna adsorbida (AVA). Algunos militares expresaron reticiencias en cuanto a eficacia y seguridad para justificar su negativa pese a la posibilidad de ser castigados. Bajo los auspicios de la Cruz Roja se montó en Kabul dependiente del Ministerio talibán de agricultura una instalación para producir vacuna para proteger al ganado del carbunco, pero la CIA no creyó que la Cruz Roja estuviese controlando esta planta. El temor a una agresión microbiológica explica la alarma desencadenada el 18 de agosto de 2003 al encontrarse un sobre con un polvo blando en la oficina de comunicaciones del Departamento de Estado en Washington.

Además de los efectos sobre el hombre hay que tener en cuenta los referentes al ganado y a animales silvestres asi como la contaminacion del medio.

Despliegue del carbunco como agresivo

Se calcula que en el mundo hay unos 25.000 laboratorios que trabajan con unos 40 microorganismos altamente patógenos, entre ellos el carbunco, pero además en cualquier laboratorio microbiológico puede producir esporas con una inversión de unas 500.000 ptas. Las esporas se diseminarian en el aire por aviones fumigadores, bombas, misiles etc. 1 g de suspensión purificada de esporas de B. anthracis contiene unos 10.000 millones de esporas suficientes para contagiar a 1 millón de personas. El riesgo de infección tras una diseminación de esporas se produce durante el tiempo que estas están en el aire, lo cual depende de las condiciones meteorológicas y de las propiedades del aerosol, pero el depósito en el suelo reduce notoriamente su concentración en el aire, de modo qie dejan de ser peligrosas al cabo de 24 horas. Asi como basta que lleguen a los pulmones de un mono uno a cinco viriones de la variante U del virus de Marburgo se necesitan 8.000 esporas alojadas en los pulmones para garantizar la infección y la muerte.

A primeros de Septiembre de 2001 EE.UU. a través del Proyecto Baco desarrolló una zona de acceso restringido, en el Desierto de Nevada, donde además de experimentar con armas nucleares, trabaja con fines «defensivos» en agresivos biológicos contraviniendo el tratado internacional de 1972 sobre armas bacteriológicas que se iniciaron con el Gobierno de Bill Clinton, y que George Bush proclive a cuestionar la

vigencia de muchos Tratados que limitan el desarrollo y el uso de agresivos químicos y microbiológicos internacionales, tiene la intención de ampliar el desarrollo de esos agresivos. Hay que tener en cuenta que la ingenieria genética puede crear fácilmente cepas resistentes a antibioticos y a vacunas.

Terrorismo

Aunque no como arma terrorista, pero si asesina hay antecedentes literarios del uso del carbunco como agresor. En la citada novela «El Zueco», Henry Murguer cuenta que un campesino ambicioso, para no perder una herencia debía eliminar a su criada a la que había comprometido con su hijo. Con este fin metió en una caja moscas de la cuadra en la que habia dejado un caballo muerto tres dias antes, protegiendose cara y manos para no ser contaminado con ellas y las soltó en el dormitorio de la criada, cuya colcha habia untado con miel; de madrugada rompe los cristales de la ventana para que salieran las moscas que habrían picado a la joven para no dejar huellas. «Baja gritó Derizelles a la criada, que tengo que hablarte. Me visto y voy, respondió esta. Al meter el brazo en la manga de su blusa, le pareció sentir en el hombro un entumecimiento doloroso, pero no se preocupó y se dio prisa para vestirse y reunirse con Derizelles. —Ahora, muchacha, ya has vuelto y pasado mañana, en la misa mayor, podras si quieres, darte el gusto de oir tus amonestaciones. Pero mi hijo y yo pensamos, que no debes dejarte ver todavia. Asi, pues, si alguien viniera a llamarnos no debes abrir a nadie. —¿Se marcha usted?, preguntó la sirvienta, llevandose la mano al hombro.—Voy a despachar algunos asuntos, y no volveré hasta la noche, ya tarde; mi hijo probablemente tampoco estará, pues hoy se cierra la veda. Confio en que agregó familiarmente, cuando seas su mujer harás cuanto esté en ti para moderar un poco esa pasión ¿Qué te pasa, te encuentro un poco pálida? ¿Has dormido mal? No —respondio la Lizón, pasandose la mano por los ojos, pero me siento un poco entumecida pero se pasará en cuanto tome el café. La Lizón se puso enseguida a arreglar la casa; pero al cabo de una hora tuvo que dejarlo, debido al dolor del hombro, que parecía extenderse por el brazo. Se quitó la blusa y examinó el sitio, donde no vio mas que una especie de mancha negra y redonda, que parecia sangre coagulada, a consecuencia de un golpe o de una caida. Pensó, tal como le habia dicho su futuro suegro,

que aquella mancha era resultado del violento vaivén que habia estado a punto de arrojarla del vehiculo, y como en el mismo instante se sintiese dominada por un mareo que la obligó a apoyarse para no caer, atribuyó este otro sintoma, que desde hacia algún tiempo no era en ella raro, a su embarazo. Sin embargo, de hora en hora el mal iba progresando; el dolor se hacia cada vez mas intenso y la hinchazón mas visible. La Lizón pensó lavarse con agua salada, pero cuando, no sin dificultad, se sacó la manga de la blusa, que se le habia quedado algo estrecha, lanzó un grito al ver que la mancha negra que había notado se había extendido ya a las proximidades de la muñeca. En menos de un minuto Mélie estaba junto a la sirvienta, que antes de que hubiera podido explicar por que motivo la habia llamado tuvo que sufrir por parte de la muchacha un tropel de interrogaciones y reproches. —¿Qué quieres? ¿Por que me llamas?— pregunto por fin Melie. La Lizón contóle entonces, con palabras entrecortadas y gestos febriles el sufrimiento que experimentaba desde aquella mañana y que iba aumentando, y al terminar, descubrióle el hombro y el brazo. —¿Que es esto?. ¿Que es esto? ¿Que mal es este Melie? —¿Lo sabes tú?, dijo. Mientras balbuceaba aquellas interrogaciones, una especie de susurro de alas se dejó oir en el cuarto, y una de las moscas que había quedado en la alcoba casi rozó el rostro de Melie, en el momento en que esta se inclinaba para examinar el brazo de la Lizón. La muchacha hizo un movimiento de espanto y se echó hacia atras. —¿Que te pasa?—Le pregunto la Lizón. Melie, sin contestar, cogió su pañuelo, lo retorció y golpeando contra la vidriera donde la mosca agitaba sus alas, retenida por esa especie de atracción que el vidrio ejerce sobre estos insectos, la hizo caer al suelo. La sirvienta la miraba con asombro hacer aquello. Melie, viendo que la mosca permanecia inmovil sobre el suelo de la habitacion, la recogió y la examinó atentamente. Si murmuró, como hablando para si, igual a la del otro día. Se volvió luego hacia la Lizón, que la veia obrar sin comprender, pero, sin embargo instintivamente asustada. —¿Me preguntas que te pasa? Pues bien, tienes la muerte ahi dentro, —dijo Melie, tocando el brazo, sobre el cual los progresos de la hinchazon habian llegado a ser casi visibles. —Y aqui está lo que te mata, agregó, aplastando la mosca con el pie.—¡Melie! ¡Melie gritó Lizón temhlorosa, estoy envenenada exclamó de nuevo la Lizón, dando un salto hacia la puerta. Pero Melie lo habia previsto, y antes de que hubiese podido franquearla se habia colocado delante, después de haber echado la llave, que se metió en el bolsillo.-Oye Li-

zón, dijole en voz baja, pero apresurada. Juro ante Dios que tienes la muerte dentro de las venas, no obstante, quizá pudieras verte a salvo si eres socorrida enseguida. Pues bien, júrame ante Dios que renuncias a mi primo». «Al cabo de veinticuatro horas, pese a la asistencia médica quiso hacer un esfuerzo supremo para hablar, pero sus ojos comenzaron a girar dentro de sus órbitas, con una rapidez pavorosa, al mismo tiempo que convulsionaba su lengua, retorcia su boca abierta por el siniestro rictus de la agonia».

Kaufmann y cols. (1997) determinaron mediante un modelo, que un ataque terrorista con carbunco en el suburbio de una gran ciudad causaría un perjuicio económico de 478 a 26.200 millones de dólares por cada 100.000 personas expuestas. (de 477,7 millones si la agresión fuera con B. melitensis).

La Secta japonesa Aum Shinrykyo que quiere decir «Verdad Suprema» fundada por el visionario gurú Shoko-Asahara, que habia atacado el 20 de marzo de 1995 a pasajeros del metro de Tokio con Sarin matando a doce personas y afectando a 5.500, gracias a que el sarín era muy impuro. Ikuo Hayashi, por cierto médico, de 51 años, uno de los máximos dirigentes, fue condenado en mayo de 1998, por su papel decisivo a cadena perpetua, escapando a la de muerte por la colaboración prestada para resolver los delitos perpetrados por los fanáticos seguidores de la secta como el haber esparcido en 1994 en nueve ocasiones bacterias patógenas desde edificios altos y desde convoyes de camiones al Parlamento Japonés, el Palacio Imperial y los alrededores de la ciudad de Yokosuka donde se halla el cuartel general de la Séptima Flota de los EE.UU (BROAD). sin que se produjeran victimas los que llevó a buscar otros agentes en diversas partes del mundo. Shoko Asahara, fue en octubre de 1992 con cuarenta de sus seguidores al Zaire, supuestamente para socorrer a las víctimas del virus Ebola. Pero, según el informe del 31 de octubre de 1995 del Subcomité permanente de investigaciones del Senado de los Estados Unidos, su intención era probablemente obtener muestras del virus Ébola para cultivarlo y emplearlo en ataques biológicos para provocar una guerra apocalíptica.

El 5 de mayo de 1995, seis semanas después del incidente en el metro de Tokio, Larry Harris, técnico de laboratorio en Ohio, solicitó a una empresa de suministros biomédicos de Maryland la Y. pestis. La compa-

ñía, American Type Culture Collection de Rockville, le envió por correo tres envases con muestras de Yersinia pestis que pagó con tarjeta. Harris sólo levantó sospechas cuando telefoneó a la empresa a los cuatro días de haber hecho su pedido para preguntar por qué aún no la habían satisfecho. Los encargados de la compañía se sorprendieron de su impaciencia y de su falta de familiaridad con las técnicas de laboratorio, por lo que decidieron ponerse en contacto con las autoridades federales. Se descubrió que pertenecía a una organización en pro de la supremacía de la raza blanca. Harris sostuvo que quería la bacteria para eliminar ratas iraquíes y en noviembre se declaró culpable de fraude postal ante un tribunal federal. Harris no precisó más que de una tarjeta de crédito y un membrete falso para hacerse con la bacteria. Debido en parte a este hecho, se aprobó en abril de 1996 una ley que obliga a los centros de prevención y control de las enfermedades a verificar con mayor detenimiento los envíos de agentes infecciosos.

Entre abril de 1997 y junio de 1999, se enviaron en USA unas 200 cartas o llamadas telefónicas, que señalaban que se les estaba atacando con esporas de carbunco lo que obligó a descontaminar seguramente de forma innecesaria la piel y los vestidos con lejía a más de 13.000 víctimas potenciales.

El «Federal Bureau of Investigation» de USA tiene documentados 47 incidentes of posible exposición a carbunco de 5.664 personas durante un periodo de 14 meses entre 1998 and 1999 de los que Swanson y cols. (2000) describieron dos en Salt Lake City.

En marzo de 1998 el espionaje británico detectó un plan de Bagdad para introducir esporas en el RU en botellas de alcohol o de perfume que obligó a poner estado de alerta en puertos y aeropuertos. El 30 de octubre de 1999 se recibieron cartas que decían contener esporas en varias clínicas de Indiana, Kentucky, y Tennessee. En diciembre, una carta que decia contener carbunco fue enviada a una oficina privada y se avisó en tres ocasiones por teléfono que se habían contaminado los sistemas de ventilación de edificios publicos y privados.

Es posible que la gran información, a menudo espectacular, que con fines preventivos se daba en el país, fuera el estimulo para su empleo real por terrristas, por paranoicos u otros anormales psqiucios. Por ej el «Acta

de Defensa contra las Armas de Destrucción Masiva» de 1997, llevó al Departamento de Defensa a establecer un programa para mejorar la defensa a nivel local, estatal y federal para responder a incidentes biologicos. Durante 1998 y 1999, se lanzaron múltiples bulos entre ellos el de que se habían producido ataques con carbunco en el país, que obligaba a descontaminar y a dar quimioprofilaxis a las víctimas.

Terrorismo Postal en USA. El 4 de octubre de 2001, el Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas informó que se había presentado un caso de carbunco pulmonar en un fotógrafo de un periódico de Florida. Fue el primero de una cadena de ataques bioterroristas con esporas de «Bacillus anthracis», introducidas en cartas. En los primeros días de octubre de 2001, una o varias personas cursaron en USA una serie de cartas y paquetes postales que contenían esporas del carbunco, más restos del medio de cultivo, que produjeron casos de carbunco cutáneo y pulmonar con 7 defunciones. La primera defunción se produjo el 5 de octubre en el editor de la American Media en Boca Ratón (Florida) cuyo médico el Dr. Omeñaca, se dio cuenta que la neumonía de su paciente con un fuerte edema pleural y mediastinitis no correspondia a otras etiologías y pensó que podria tratarse de carbunco. En la Amedican Media trabajaba la tercera víctima, una mujer de 35 años. En el edificio de la American Media, se encontraron el 10 de octubre esporas de carbunco; esta empresa publicaba revistas sensacionalistas a las que curiosamente estaban subscritos, al menos dos de los «kamikaze» involucrados en el atentado del 11 de septiembre.

El Presidente del Senado Tom Daschle, recibió el 9 de octubre en Trenton (Nueva Jersey), la carta mas peligrosa de las enviadas a politicas y periodistas, que contenía dos gramos de polvo con esporas; si el preparado hubiera sido puro contendría 20.000 millones de esporas suficientes para contagiar a 2 millones de personas. Como consecuencia de este envio hubo que administrar ciprofloxacina a 120 empleados.

El día 20 de octubre ya se habian encontrado esporas en el metro, en las oficinas de la NBC, en el Senado y en la Cámara de Representantes. Hubo tres casos de carbunco en una cadena de TV de Nueva York y otros tres en otro edificio con un total de siete casos.

El FBI encontró esporas el 20 de octubre en una máquina distribuidora de correo, situada en un edificio de la Cámara de Representantes, cer-

cano al Capitolio así como en una oficina de correos del Departamento de Justicia de Landover (Maryland). Dos empleados de Correos de esa oficina murieron fulminantemente por carbunco pulmonar el 22 de octubre, pese a haberseles administrado dosis elevadas de antibióticos. Se observó a los empleados de la oficina de Correos del Capitolio a la que había llegado una carta con esporas, encontrándose esporas en cinco personas expuestas; también había esporas en una oficina postal del Pentágono y el 5 de noviembre se hallaron en un paquete enviado por la NBC a la alcaldía de Nueva York y en la oficina de correos de un hospital de veteranos de Washington por carta dirigida desde la Central de distribución de Brentwood en Washington que se ocupa de la correspondencia dirigida al Congreso por donde había pasado la carta dirigida al senador Tom Daschle que fue abierta el 15 de octubre. Thomas Morris empleado en dicha oficina de correos comunicó que habia pasado por sus manos una carta que le pareció sospechosa el 13 de octubre; la carta contenía polvo que habian tenido contacto con la carta del senador no se informó del riesgo a los empleados de correos. El 21 de octubre tuvo que ingresar con gran disnea y dijo «tengo 55 años, me cuesta mucho respirar y apenas puedo moverme.No estoy seguro, pero creo que he estado en contacto con el carbunco. Siento que voy a morir»,y efectivamente murió a las pocas horas El 28 de Octubre ingresó en el Hospital Lenox Hill de Nueva York, Katy Nguyen de 61 años quien trabajaba en el almacén en donde se había depositado correspondencia; la enferma murió el 1 de noviembre; sin que se encontraran esporas en su casa ni en el almacén del Hospital. Se encontró posteriormente entre el correo puesto en cuarentena una carta dirigida al Senador demócrata Patrick Lealy. El 31 de octubre se diagnosticó en New Jersey en un empleado de correos una pústula maligna. Dos de los tres fallecidos hasta ese momento trabajaban en la oficina de correos de Brentwood, en la que se dieron seis casos. La Fiscalía de Estados Unidos anunció el 10 de Octubre de 2001 que la investigación sobre los casos de contagio de «ántrax» señaló un origen «criminal». Se encontró un número exigüo de esporas en una oficina postal de Raleigh lo que indica que al menos una carta con esporas pasó por ella. La inmigrante vietnamita Kathy Nguyen falleció de carbunco a comienzos de noviembre, sin que hubiera tenido contacto directo con sobres sospechosos.

El Gobernador de Nevada confirmó el 13 de Octubre que Microsoft de Reno había recibido una carta, procedente de Malaisia con un cheque y fotos pornográficas, una de las cuales habia sido impregnada con la es-

pora que contaminó a diez personas a las que hubo que administrar ciprofloxacino.

Richard Boucher, portavoz del Departamento de Estado americano, ordenó el 10 de octubre, a sus embajadas y consulados de todo el mundo que tuvieran suficientes reservas de ciprofloxacino para tratar a todos sus empleados durante tres días ante el temor de un atentado bacteriológico. si bien «no se tiene ninguna información que indique que existe una amenaza inminente».

El 17 de octubre de 2001 se clausuró el Congreso de USA hasta el día 22 por haberse encontrado esporas en el sistema de ventilación de la oficina que recibe el correo, a la que probablemente llegaron desde una carta recibida por el Senador demócrata Tom Dash. Se encontraron esporas en 27 trabajadores de la oficina del Senador y en otros cuatro empleados del Congreso; se administró a más de 200 empleados ciprofloxacino. El 18 de octubre en USA apareció un caso de pústula maligna en una ayudante del presentador del principal informativo de la CBS Dan Rather y otro caso en el asistente de Tom Brokaw otro presentador de la NBC en Nueva York. El bebé de una mujer que trabajaba en la MBC desarrolló una pústula maligna El producto contenido en la carta dirigida a este eran gránulos gruesos inadecuados para dispersarse por el aire, mientras que el de la American Media de Boca Ratón en Florida en donde enfermaron tres (o cinco según otra información) empleados con carbunco pulmonar con el fallecimimiento el 5 de octubre, del editor gráfico de uno de sus semanarios; la carta al parecer fue escrita por la misma persona,que la enviada a Brokaw aunque en este caso el vehículo era un polvo finísimo se encontraron esporas en una empleada de la oficina postal de Trenton en Nueva Jersey 18-X-2001. El séptimo caso de carbunco (el 4º de Nueva York) se dio en un empleado del «New York Post» que tuvo una pústula. El Director de la Oficina de Seguridad Nacional Tom Ridge recordó que de las 1.400 personas analizadas solo cinco desarrollaron la enfermedad. El 27 de octubre habían tomado ciprofloxacino 10.000 personas. El 6 de diciembre se registró un nuevo envio a una importante institución americana.

El 21 de noviembre falleció una anciana de 94 años con carbunco pulmonar en Washington, es la quinta víctima del carbunco.

También recibieron misivas con esporas, el periódico New York Post y el presentador de la cadena NBC, Tom Broka procedente del mismo re-

mitente, el cual, para James Fitgerald especialista del FBI, intentaba encubrir su identidad utilizando frases como «Alá es grande» «muerte a Israel» y »muerte a América» en inglés que un musulmán lo hubiera escrito en árabe. El FBI rebuscó entre toneladas de correspondencia que se habia puesto en cuarentena desde mediados de octubre entre las que, encontró el día 16 de noviembre, una carta enviada al senador demócrata Patrick Leahy,con esporas de carbunco.

En este atentado por medio del corrreo, solo se produjeron 22 casos de carbunco pulmonar, 4 sospechosos de pústula maligna y 5 muertes debidas a carbunco inhalatorio, pero se declararon 10.000 posibles expuestos; hubo que inspeccionar 300 oficinas de correos y otros edificios para descartar que se hubieran contaminado, se administró a más de 3.000 personas quimioprofilaxis, de las que al menos 19 han presentado efectos secundarios,algunos graves.

Además de los casos americanos hubo en diversos paises declaraciones de ataques postales semejantes que causaron alarma mundial, que el Presidente Bush atribuyó, el 2 de noviembre, al paso directo de esporas de una carta a otra o través de las máquinas clasificadoras del correo, pero estos casos quedaron sin confirmar adecuadamente y revelan fallos técnicos o intencionalidad política; así el presidente de Pakistán, Pervez Musharraf, confirmó el 3 de noviembre de 2001 en Islamabad que se había encontrado en una carta dirigida a una oficina del diario «Jang», en Karachi, un polvo blanco en el que había esporas de anthracis. El 18 de octubre de 2001 el Ministro de Sanidad de Kenia informó que una carta dirigida a un empresario de la ciudad de Nyeri, desde Atlanta, tenia polvo con esporas, que contaminaron a 4 familiares a los que se dió quimioprofilaxis y que se habían detectado otras dos cartas con esporas. A Argentina llegó una carta, enviada desde Miami, que no fue abierta; el sobre no estaba contaminado, pero el folleto turístico de su interior, habia sido impregnado con esporas (se dieron quimioterápicos a seis personas que habían contactado con la carta). También se encontraron esporas en la correspondencia enviada a la embajada de USA en Perú. El corresponsal del «The New York Times» en Río de Janeiro, había recibido en los primeros días de octubre una carta que tenía las temidas esporas que no se llegó a abrir. En Cuba se detectaron 116 cartas sospechosas, veinticinco de las cuales estaban dirigidas a Fidel Castro, que no

confirmó el laboratorio. Ante una situación de alarma, los dedos se hacen huéspedes. El ministro de Interior y Vicepresidente primero del Gobierno español, Mariano Rajoy, declaró el 2 de noviembre de 2001 que en España se habían recibido 200 cartas sospechosas de contener «polvos de ántrax»; la casa Siemens de Tres Cantos, (Madrid) recibió una carta cuyo sobre era pegajoso, lo que llevó a someter a vigilancia y a darles quimioprotección a las personas que la manipularon, debiendo descartar el 17 de octubre la Dirección General de Salud Pública de Madrid que se hubieran dado casos de carbunco en la provincia de Madrid todos los análisis, practicados en el laboratorio de referencia nacional establecido en Valdehorras (Madrid) fueron negativos.

A partir del 6 de diciembre de 2001 dejaron de encontrarse envíos con esporas en el correo de EE.UU pero en 20 cartas comerciales con matasellos de abril y mayo de 2002, sin aspecto sospechoso, dirigidas a la Reserva Federal de EE.UU en Washington, algunas a Alan Greenspan presidente de la Reserva, se encontraron esporas que podrían ser falsos positivos o contaminación cruzada. Al trascender esta noticia el 9 de abril, las Bolsas bajaron, los mercados financieros reaccionaron negativamente y el índice industrial Dow Jones, de la Bolsa de Nueva York, bajó unos 70 puntos, aunque después se recuperó.

Que sepamos no se ha llegado a capturar al autor o autores ni descubierto el origen de la bacteria (una sola cepa), pese a la recompensa de un millón de dólares (185 millones de pesetas) y otra el 17 de noviembre ofrecida por Bush de 280 millones de dólares a quién ayudara a resolver los ataques. Se detuvo a un solitario técnico de laboratorio de Trenton, New Jersey, que fue acusado de la agresión basandose en la similitud del genoma de las esporas de carbunco encontradas en su apartamento, y las de las cartas, aunque para Paul Keim de la Universidad de Flagstaff en Arizona del Norte los conocimientos científicos no permiten asegurar esa identidad.

La cepa utilizada en este atentado es diferente de la que se había aislado en 1997 en la India, resistente a la penicilina, cefuroxima y cefotaxima,ya que la cepa usada por los terroristas era sensible a esos antibióticos. Al haberse producido la agresión, pocos días despues de la terrible matanza y destrucción de las Torres Gemelas el 11 de septiembre de 2001, se pensó que podría tratarse de otro atentado de los fundamentalistas is-

lámicos. En Octubre de 2001, un anónimo experto israelí señalo al The New York Times que los servicios de inteligencia esperaban, antes y despues del 11 de septiembre, que el Sr. Bin Laden utilizara agresivos químicos y biológicos y que los intereses americanos en Europa occidental serian los blancos mas lógicos. El FBI descartó el 8 de noviembre «casi por completo» que la ola de ataques con carbunco hubiera sido obra de Osama Bin Laden o de Irak. Todo apunta a un terrorista del tipo del lobo solitario, o a grupos neonazis antijudios o de simpatizantes de la causa palestina o que se trataran de actos irracionales de algún perturbado, de algún «eróstrato» o de un despechado que quisiera vengarse de un agravio real o imaginario, ya que las cartas fueron dirigidas a senadores y a tres medios de comunicación de Florida y Nueva York; el terrorista debería tener cierta formación científica, que hubiera visto en los atentados de septiembre la oportunidad para perpetrar los suyos. Se barajó la posibiliodad de que se hubiera efectuado para azuzar el odio al fundamentalismo islamista.

El 29 de octubre de 2001 se reveló que el agente era la cepa Ames, que solo presentaba ligeras diferencias con las Ames manenidas en cultivos en laboratorios. Hoffmaster y cols. (2002) con el MLVA vieron que pertenecían al genotipo 62. La secuenciación del gen del PA (pagA) de 42 cepas representativas de las aisladas en el episodio demostraron que la secuencia de su pagA era indistinguible de la de la cepa Ames (PA genotype I). El MLVA y la secuenciación de la pagA aplicados al ADN de muestras clínicas permitó subtipar al B. anthracis sin necesidad de aislar al gérmen. El empleo de de la subtipificación de alta resolución molecular demostró que todas las cepas del ataque eran indistinguibles y probablmente procedentes de un solo origen. El subtipado identifica además rapidamente posibles contaminaciones de laboratorio y la de cepas no causantes del brote.

La cepa Ames fue obtenida en la Universidad de lowa durante la década de los cincuenta,en un programa militar que fue clausurado más de 30 años antes; aislada de una vaca muerta por carbunco en 1981 en Texas. La cepa Ames había sido enviada al Instituto de Investigación Médica del Ejército en Fort Detrick (Maryland), y posteriormente se distribuyó a catorce laboratorios americanos para realizar experimentos, La cepa Ames fue obtenida por el Instituto Médico Militar de Investigacion

de USA, el USAMRIID de Maryland desde los primeros 80, de donde obtuvieron esporas al menos cinco centros entre ellos el Dugway en Utah que ha trabajado en concentrar esporas para uso militar (pese a que USA firmó el Tratado de prohibición de armas biológicas de 1970, lo que hace pensar que las esporas procederían de algunas de estas fuentes. Esta cepa fue utilizada por la CIA para buscar antídotos y para preparar la defensa frente a un eventual ataque de la URSS, aunque cabe también la posibilidad de que hayan sido obtenidas de forma independiente

Los científicos del Instituto de Investigación Genómica en Rockville (Maryland), especializado en el estudio de genomas de bacterias y de virus, que estaba secuenciando el genoma de la cepa Porton del B.anthracis encontraron que el genoma completo de la bacteria aislada de una de las víctimas de Florida, correspondía al de la cepa Ames, con 53 regiones diferentes y solo 11 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) diferentes al de las cepas de B. anthracis mantenidas en los laboratorios militares americanos (Read y cols. 2002). Se descartó que el bacilo de Florida procediera de una cepa aislada en 1997 de una cabra afectada en 1997 ni que la cepa de Florida estuviese manipulada genéticamente para aumentar su peligrosidad. Hay que tener en cuenta que los pases por cultivos y condiciones diferentes pueden provocar diferencias de cierta importancia y era factible que hubieran acumulado mutaciones distintas a medida que se hubieran multiplicado.

Alarma y pánico

Hay que tener encuenta que la finalidad de la guerra BQ puede ser simplemente la de causar alarma y pánico. El ataque terrorista de 2001 en Florida determinó innumerables falsas alarmas en diversas ciudades de USA e incluso en Canadá. Entre ellas espigamos las siguientes: el día nueve de octubre en Covington (Kentucky) fueron evacuados mil empleados y se cerró temporalmente la oficina dedicada a procesar las declaraciones de Hacienda en Kentucky, por haberse abierto una carta con polvos blancos, que luego se vió que eran inocuos. Por la alarma de la población en el suburbio de Hialeah, en Miami, los equipos de tratamiento de materiales peligrosos ocuparon dos viviendas el día siete cuyos inquilinos, se daban por muertos tras abrir dos sobres con un misterioso polvo blanco. El FBI detuvo a dos personas en Las Vegas al

encontrar en el maletero de su coche un polvo que creyeron era de esporas de carbunco.

En Nápoles, en el Golfo de Florida, la policía cerró dos edificios tras hallar una sustancia blanca en contenedores de correo y 80 persanas fueron descontaminadas.

En un suburbio de Washmgton, se clasuró el dia nueva una estación de Metro durante seis horas, porque un hombre, que se demostró era un perturbado lanzara a la vía un «spray» que luego se demostró que era un limpiador de alfombras. En Manassas (Virginia) cientos de personas acudieron en busca de máscaras antigás después de que se especulara con la posibilidad de otro brote al enfermar una persona por lo que luego se demostró era una gripe. Se desencadenó la alarma en un avión en el que se encontró debajo de un asiento un periódico que contenia un poco de polvo blanco. Un Boeing 757 fue escoltado el 10 de octubre por dos F-16 hasta aterrizar en Louisiana al avisar el piloto a la torre de control que se estaban produciendo dtsturbios, causados por un pasajero al que se descubrió fumando en el lavabo del aparato. Las reservas de ciprofloxacino se agotaron en Nueva York. Bayer triplicó la producción de este medicamento y se racionó dando solo 10 tabletas por persona en riesgo. Se hicieron sospechosos todos los envios postales y cualquier pequeño incidente, El Gobierno federal no contribuyó a calmar los ánimos; el fiscal general. John Ashcroft, repetía «Hay que estar vigilantes».

La alarma se extendió por todo el mundo. En lo que hemos podido determinar, dado el sigilo con el que se llevan a cabo estas acciones, en gran parte para no aterrar más a la población, la mayoría de los paises adoptaeon medidas defensivas y de vigilancia. Asi, en Berlín el dia 10 de octubre de 2001 la policía acudió a un almacén en el que se sospechaba que había un paquete con carbunco. Francia activó los planes «biotox», que incrementan a medio plazo el dinero dedicado a la prevención de riesgos biológicos, a formar a especialistas y a dotarse de antídotos y el Piratox contra las amenazas. Las medidas adoptadas por el RU se mantienen secretas. Italia ha obtenido cinco millones de dosis de vacuna antivariólica y ha activado un número de emergencia que funcionará 24 horas al dia en el Ministerio de Sanidad. Incluso el Vaticano ha dado instrucciones para evitar el contagio por la correspondencia. El líder del partido unionista del Ulster David Trimble recibió quimioprofilaxis ante la

posibilidad de haberse contagiado durante su estancia en Washington en el mes de octubre. Las autoridades de Qatar ante la cumbre de la Organización Mundial de Comercio los días 8 al 10 de noviembre de 2001 extremaron la vigilancia de la correspondencia. George W. Bush, presidente de Estados Unidos en su discurso radiofónico semanal del 2 de noviembre de 2001 intentó calmar las tensiones y críticas acumuladas contra la actuación de su Gobierno en la crisis del carbunco, comprometiéndose a una transparencia y amplia comunicación, extendiendo el patriotismo y el consenso nacional generados por el ataque a las Torres Gemelas, al ataque de carbunco.

La alarma ha causado una recesión de las actividades y por tanto de la economia; por ej. el episodio del carbunco causó al Servicio Postal de USA una disminución del 10% de su actividad con una pérdida de 500 millones de dolares estimada al 5 de noviembre de 2001.

La amenaza biológica y las bromas

Apoyados en el miedo las situaciones de alarma pueden producir una respuesta estúpida intentando asustar a personas haciéndolas creer que son a van ser víctimas. Se han hecho chistes, de muy mal gusto y bromas absurdas que pueden tener consecuencias graves. El presidente Bush en noviembre de 2001 advirtió contra los «bromistas» que envían sustancias sospechosas a través del Servicio Postal y en USA fueron detenidas más de veinte personas acusadas de perpetrar falsas alarmas, hecho que puede ser castigado con cinco años de cárcel. En USA fue detenido Jordan Arizmendi, estudiante de periodismo, hijo de un vasco, quién había enviado por broma, por correo electrónico una misiva de despedida a sus ex compañeros de «The Sum» (en cuyo edificio se habían encontrado esporas, que habian causado la muerte de un fotógrafo), en la que les decía «que había dejado sorpresas en la oficina» aunque fue liberado a las pocas horas al aclararse el caso.

Otra de esas «bromas» tuvo lugar en Marruecos. El 15 de octubre, Hicham Qadiri, un empresario de Agadir, quiso gastar una broma a su amigo Abdelkader Alj; ambos están, a su vez, unidos por una estrecha amistad, al príncipe Mulay Hicham, primo carnal de Mohamed VI, pero enemistado con este desde su entronización, 27 meses antes, y vetado en palacio. Para ello le envió una carta que recibe, Abdelkader Alj que con-

tenía un polvo blanco, y un escrito en árabe que decía «Somos un grupo islamista que lleva a cabo la yihad contra los musulmanes depravados. Usted está asociado a un judio sionista que ha concedido ayudas sustanciales al Estado de Israel» Como esos datos eran ciertos, al leer la carta Abdelkader Alj presa del pánico se desnudó y pidió a sus empleados que le arrojaran agua. En el lnstituto Pasteur de Casablanca, le comunicaron al día siguiente,que el polvo era pegamento seco. Ante ello hizo la denuncia pertinente e informó a sus amigos entre ellos a Hicham Qadiri el cual confesó la autoria. Abdelkader Alj quiso, pero no pudo retirar la denuncia, e incluso la policía quiso que firmara una acusación contra a Mulay Hicham. Preocupado ante esto, Hicham Qadiri se presentó en la comisaria de Casablanca, en donde la policía le sometió a ocho horas de interrogatorio dirigido a hacerle confesar la responsabilidad del principe. Quedó detenido preventivamente durante tres días, durante la cual logro hablar por teléfono celular con el príncipe, dejando abierto el teléfono lo que le permitió a este oir a la policía decir: «Di que ha sido Mulay Hicham y todo volverá a la normalidad. Mulay Hicham, rogó al monarca que cesase la persecución y que detuviese las actuaciones; la intevención del rey, suavizó la presión sobre Mula que el principe, atribuye al general Laanigri.

Prevención del carbunco como agresivo. Profilaxis en preexposición

La prevención frente al terrorismo debe basarse, aparte de la lucha contra este fenómeno en la vigilancia y protección de instalaciones en las que se trabaje con esta bacteria teniendo en cuenta que es fácil conseguir cepas virulentas de anthracis. Hay que disponer de reservas de quimioterápicos y de vacunas; formar a escala nacional, y local Comités de expertos. En España el Gobierno constituyó en mayo de 2001 una comisión formada por miembros de la Secretaría General de la Presidencia del Gobierno y de los Ministerios de Interior, Defensa y Sanidad.

La agresión de 2001 determinó la movilización sanitaria, ademas de la social frente al bioterrorismo; hubo que revisar los sistemas de prevención entre otros los criterios frente a los síndrome neumónicos a las tecnicas de identificación de microorganismos, potenciacion de atención a catástrofes etc.

Vacunación en personas en riesgo. Si se estima conveniente es adecuado vacunar a los más expuestos. Inmediatamente antes de la Guerra del Golfo, ante la posibilidad de que se pudieran emplear esporas de anthracis, los ingleses vacunaron a sus tropas contra varias infecciones entre ellas contra el carbunco usando como adyuvante, una vacuna con Bordetella pertussis muerta. (Butler 1997, Miller 1998, Norton-Taylor 1997). El «Department of Defense» de USA anunció el 15 de diciembre de 1997, la vacunacion contra el carbundo de sus efectivos militares, medida coordinada por el «Anthrax Vaccine Immunization Program (AVIP)» que espera conseguir la vacunación de todos en 2004, comenzando por el personal desplegado en áreas de riesgo. El 12 de abril de 2000, 425,976 personas habían recibido 1.620.793 dosis de vacuna adsorbida (AVA). Algunos se negaron a ser vacunados, pese a la posibilidad de ser arrestados según informaba el 9 de abril de 1998 el Washington Post.

La prevención personal frente a esporas dispersas en el aire, se puede hacer por mascarillas, tipo HEPA que cuestan casi 300 euros y trajes de protección cuyo precio oscila entre los 80 y los 5.000 euros cuyo uso requiere tener constancia del ataque y disponer de esos medios en ese momento y lugar lo cual exige una amplisima e inasumible generalización de esos recursos.

Ante la probabilidad del empleo militar o terrorista hay que establecer normas aplicables a la situación concreta. En el año 2001, debido a la amenaza terrorista internacional, el Gobierno constituyó una comisión de la que forman parte miembros de la Secretaría General de la Presidencia del Gobierno y responsables de los Ministerios de Interior, Defensa y Sanidad, que a nuestro juicio debería funcionar de modo permanente. El Consejo Interterritorial de Salud ante el ataque postal de USA establecio un protocolo de actuación consistente en: Informar clara y de forma completa a la población de la situación y de las medidas que debe adoptar según la situación. En caso de temerse un ataque por carta, paquetes etc. se debe informar de las características que permitan sospechar que contengan esporas: si los envios postales están bien cerrados es poco probable el contagio. Las cartas y paquetes sospechosos deben, sin abrirlos, ser recogidos por personas protegidas, introduciendolos en un contenedor con cierre hermético, adecuado a su tamaño, o es su

defecto en varias bolsas de plástico y trasladado a laboratorios microbiológicos adecuados.

Profilaxis en postexposición

Es imprecindible hacer un diagnóstico sensible y específico para que no requiera cultivo para diferenciar al Bacillus anthracis de otros Bacillus esporógenos. El estudio de las secuencias del ARNr que como el de todas bacterias pesa 16S permite esa diferenciación Sacchi y cols. (2002) vieron que todas las cepas estudiadas de anthracis 107, procedentes del ataque terrorista postal de 2001, secuencias de tipo 6 mientras que todos los B. thuringiensis eran del tipo 10, y los B. cereus pertenian a otros seis tipos.

Descontaminación de fómites, superficies, locales etc. que pudieran estar contaminadas, deben desinfectarse mediante hipoclorito o con formol. En 1999 los laboratorios nacionales «Sandía» de USA obtuvieron una espuma formada por una combinación de peróxido de hidrógeno u otros oxidantes que forma miles de mínimas burbujas que rompen los enlaces químicos de los fosfatos y de los sulfatos (utilizables para descontaminar de agresivos químicos) así como las cubiertas de esporas (probada sobre las del Bacillus gobigi), similares a las del anthracis. La espuma es inocua para el hombre. Se deben lavar por personal adiestrado protegido mecánicamente las superficies contaminadas, lavándose enseguida las manos.

Se debe identificar a las personas expuestas, someterlas a vigilancia y si es oportuno deberían ingresar en centros sanitarios, descontaminando su piel y mucosas, para evitar la transmisión al personal sanitario. Weber y cols.(2003) con el «Standard Test Method for Evaluación of the Effectiveness of Health Care Professional Handwash Formulacións» de la «American Society for Testing and Materials E 117494» simularon la contaminaron de las manos con anthracis, con una suspensión de esporas del Bacillus atrophaeus, en voluntarios sanos sin eczema, psoriasis ni otros procesos crónicos de la piel ni alergias a ningún producto y lavando durante 10, 30 y 60 segundos con diversos antisépticos encontrando las siguientes reducciones del número de esporas del B atrophaeus expresadas por el logarítmo decimal del CFU por ml.

Antiséptico	*10 segundos*	*30 segundos*	*60 segundos*
Gluconato de clorhexidina al 2 %	2,1 (2,0 a 2,3)	1,8 (1,5 a 2,0)	1,7 (1,5 a 1,9)
Agua y jabón	2,4 (2.2 a 2,5)	2,3 (2,2 a 2,4)	2,1 (1,9 a 2,4)
El lavado con toallitas de microfibra con hipoclorito sódico	1,3 (1,1 a 1,5)	1,6 (1,2 a 2,0)	2,2 (2,1 a 2,2)
Etanol al 61%	0 [0.1 a 0,1]	0,2 [0,3 a 0,1]	0 [0,2 a 0, 2]

Es decir el etanol es ineficaz, siendo mejor el agua y jabón, que curiosamente da mejor aplicado 10 segundos y las toallitas aplicadas 60 segundos.

Quimioprotección en expuestos a la inhalación de esporas

Las personas contaminadas por vía aerea enfermarán y morirán casi inevitablemente, si no se administran precozmente quimioterápicos.La profilaxis tras la exposición cutánea o inhalatoria (no a los contactos de los enfermos),se basa en la administración de quimioterápicos. Friedlander y cols. (1993) demostraron que el tratamiento con penicilina, ciprofloxacino o doxiciclina, comenzado 1 día después de la exposición a un aerosol conteniendo esporas, daba una alta protección frente a la muerte.

La quimioprevención debe iniciarse inmediatamente, pues si se espera a que aparezca la clínica sistémica, los antibióticos son poco eficaces.

Puede hacerse con 300.000 U de bencilpenicilina o con 900.000 U. de benzatina, o mejor con 100 mg de doxiclina dos veces al día o con 500 mg de amoxicilina o 40 mg por kg si pesa menos de 20 kg (si la cepa es sensible a los beta lactámicos). Altboum y cols. (2002) inocularon intranasalmente a cobayas con 6.605 esporas de B. anthracis de las cepas Vollum o ATCC que representan 75 y 85 DL_{50} respectivamente. A partir de las 24 horas administraron a los animales tres veces al día durante 14 días ciprofloxacino, tetraciclina, eritromicina, dos dosis diarias de 100 mg orales de doxiciclina evitan la muerte mientras se les administraba el producto, sin que

la cefazolina y el TMPSMX los protegieran. El quimioterápico más aconsejable es el ciprofloxacino, pero se pueden utilizar ofloxacino, doxiciclina, penicilina o amoxicilina. La mejor pauta es iniciar la quimioprotección con 250 mg de ciprofloxacino o de otra fluoroquinolona, dos veces al día, pauta recomendada por el Grupo de trabajo sobre Biodefensa Civil de Estados Unidos.La FDA autorizó el día 28 de Julio de 2000, el ciprofloxacino para expuestos a esporas por vía aérea. Las fluorquinolonas no alteran la pared bacteriana, pero bloquean a la ADN girasa (topoisomerasa II) enzima responsable de actividades necesarias para la integridad del ADN, y especialmente la síntesis de ADN para la transcripción o replicación.

El ciprofloxacino origina muy pocas reacciones adversas graves. Caso de usarla en los niños se aconseja 20 a 30 mg por kilo en dos dosis diarias sin pasar del gramo. En la operación «Desert Shield» (escudo del desierto) se recomendó tomar 1 g de ciprofloxacino, seguido de 0,75 g oral dos veces al día o comenzar con 200 mg de doxicilina intravenosa, continuada con 100 mg cada 12 horas.

Hay que tener en cuenta que el B. anthracis puede ser resistente a las fluorquinolonas y cabe esperar que si se emplea como agresivo que se empleen cepas resistentes a los beta lactámicos, terraciclinas y quinolonas.

Los quimioterápicos solo actúan sobre la forma vegetativa del anthracis y no sobre la espora, de modo que hasta que todas estas hayan germinado sigue existiendo riesgo. Los quimioterápicos al destruir a los bacilos germinados, impiden la respuesta inmune de modo que si cesa la administración de quimioterápicos quedan esporas sin germinar, estas lo hacen posteriormente produciendo la enfermedad. Esto exige seguir con la quimioprotección al menos 60 días.

En 1956 Henderson y cols vieron que la supresión del tratamiento a los 10 días de haber inoculado esporas a monos no evitaba su muerte. Friedlander y cols. (1993) administraron a grupos de 10 monos, una dosis letal de B. anthracis en aerosol, durante treinta dias seguidos y después de forma discontinua. Ninguno de los 10 controles murió; 8 de 10 animales a los que solamente se vacunó los dias 1 y 10 murieron. Los antibioticos protegieron completamente a los monos mientras se les estaba administrando; la protección continuó mientras se les daba de forma discontinua, alargando la superviencia con la penicilina a 7 de 10 animales ($P<0,02$);con la ciprofloxacina a 8 de 9 ($P< 0,002$); con la doxici-

clina, 9 of 10 (P< 0,002) y con la doxiciclina y la vacunación sobrevivieron a los 9 (P < 0,0002). En el experimento citado de Altboum y cols. (2002), al cesar la administración murieron todos a los que se había dado eritromicina, dos de los ocho tratados con tetracicilina inoculados con Vollum y uno de los nueve infectados con ATCC. Los animales inoculados con 46 DL_{50} de Vollum, durante 30 días pervivieron 8 de los 9 que habían recibido ciprofloxacino y los nueve que recibieron tetraciclina; al cesar los medicamentos 4 de ocho y cinco de nueve animales respectivamente siguieron vivos. La inyección intramuscular a los supervivientes de 30 DL_{50} de esporas de Vollum, no afectó a los que se habian tratado con ciprofloxacino ni con tetraciclina.

Para mejorar los resultados de la quimioprotección y sobre todo acortar la duración de la misma, a los 30-40 días, se debe asociar con el quimioterápico la vacunación, con al menos tres dosis. Los investigadores rusos obtuvieron una vacuna con esporas cuya bacteria era resistente a los antibióticos (Pomerantsev y cols. 1996) aplicables con la administración de estos. Altboum y cols. (2002) vieron que la combinación de vacuna de PA con el tratamiento con ciprofloxacino o con tetraciclina, evitó la muerte del 88% de los animales tratados con ciprofloxacino y de los 9 que lo fueron con tetraciclina, pero al cesar el antibiótico sobrevivieron el 87% de 8 y el 100% de 8 respectivamente, de los que el 86% de siete y el 100% de ocho resistieron la inyeccion i.m. de esporas. Así pues parece útil la combinacion de la vacuna con PA y el empleo de tetraciclina o de ciprofloxacino durante al menos 30 días. Nosotros recomendaríamos poner tres dosis de vacuna separadas unos 10 días y luego otras dos o tres seperadas un mes.

La aplicación práctica de la quimioprofilaxis supone importantes problemas; de un lado si no se administra y de modo precoz a un contaminado por vía aérea el resultado, casi inevitable, es la muerte y de otro un exceso de precaución o por miedo hace que se administren quimioterápicos innecesariamente a un gran número de personas. Si la quimiprotección se hace con ciprofloxacino hay que tener en cuenta el riesgo de artritis en los menores de 16 años. Hay que tener en cuenta en la quimioprofilaxis que nuestro Código Penal establece el delito de coacción «para quien sin estar legitimamente autorizado impidiera a otro con violencia, hacer lo que la ley no prohibe o lo que no quiere». La larga duración de la quimioprotección,

hace que bastantes personas la abandonen.Shepard y cols (2002) vieron que solo el 44% toma los comprimidos los 60 días debidos, porcentaje que fue del 21% en los expuestos en la oficina de correos de Morgan en New York al 64% de los que estuvieron expuestos en la oficina de Brentwood en Washington D.C. Los que abandonaron los quimioterápicos no lo hicieron por haber tenido reacciones adversas. Williams y cols. (2002) seleccionan a 100 funcionarios de correos en los veinte dias siguientes a haber estado expuestos a una mujer que enfermó de carbunco en Connecticut el 20 de noviembre de 2001; se recomendó la quimioprotección para los trabajadores postales de la zona de la paciente, pese a que los analisis ambientales fueron negativos. El 94% obtuvo antibióticos, pero empezaron a tomarlo el 68%, y lo completó la pauta el 21%, alegando para el abandono gastroenteritis, cefaleas o a que los cultivos iniciales habían sido negativos.

Si en los expuestos aparecen síntomas debe administrarse por via venosa cada 8 horas una dosis de 400 mg de ciprofloxacino durante al menos 30 días.

SITUACIÓN EN ESPAÑA

España dispone de un incipiente mecanismo de defensa NBQ iniciado por Sanidad Militar y especialmente por los Profesores Piédrola Gil y Amaro, que posteriormente pasó a ser gestionado por Armas mas eficaces logísticamente pero no en en cuanto a doctrina. La dedicación del antiguo Instituto de Higiene militar a otros fines y la parquedad de sus recursos minimizan mucho la posible defensa contra agresiones biológicas por parte de Defensa. Hay tres unidades de defensa NBQ (nuclear, biológica y química), situadas en Torrelodones, Valencia, y Burgos. Además el Hospital militar Gómez Ulla, de Madrid, tiene unas 1.500 camas, de las 2000 de que consta disponibles. El Ministerio de Defensa puso en marcha un plan de emergencia ante un posible atentado del integrismo islámico. Se han concertado un número no publicado de camas en los hospitales públicos y se ha establecido una linea permanente de comunicación con el Ministerio de Sanidad. Hay que añadir a esos escasos recursos las mínimas unidades NBQ del Cuerpo Nacional de Policia y de la Guardia Civil. El 9 de octubre de 2001 altos mandos militares y del Ministerio de Sani-

dad celebraron la primera reunión para coordinar un plan de prevención contra posibles atentados bacteriológicos. Como primera medida se ha lanzado una alerta epidemiológica a las comunidades autónomas para que se extreme la vigilancia en todos los centros sanitarios ante la hipotética aparición dé casos relacionados con este tipo de ataques. Esta medida se une a las adoptadas por Medio Ambiente en la red de suministro de agua. En Sanidad, la coordinación del plan de acción corresponde a la directora general de Relaciones lnstitucionales y Alta Inspección, Regina Muzquiz. Parece (País 21 de octubre de 2001 que el Gobierno no desea que se haga cargo de la prevención el Ministerio de Sanidad. En una circular interna, los servicios de prensa de Sanidad comunicaron a los directores de hospitales que no ofrezcan expertos a los medios de comunicación y que desvíen todas las peticiones a Presidencia.

Entre el 10 y el 25 de octubre, los bomberos y la Policia de Barcelona efectuaron más de 50 servicios para retirar sobres y paquetes que conenian azúcar, polvos de talco o harina. Hasta ahora todos los sobres sospechosos por contener un polvo blanco han sido negativos. El artículo 561 del Código Penal castiga a quién con ánimo de atentar contra la paz pública afirme falsamente, la existencia de aparatos, explosivos u otros que puedan causar el mismo efecto será castigado con la pena de prisión de seis meses a un año o al pago de una cuota diaria durante durante seis a dieciocho meses en función de la alarma o de la alteración del orden producido. El artículo 172 estipula una pena de seis meses a tres años por un delito de coacciones y el 173 seis meses a dos años, para el que inflingiera a otra persona un trato degradante, menoscabando su integridad moral.

Si las bromas con envios postales son execrables, la condena moral debe ser máxima para aquellos que utilizan una amenaza real para conseguir sus fines; el que reclama el importe de un secuestro, sin haberlo realizado es aún más repugnante que quién lo realizó. Varios años antes de 2001 se habían recibido en clínicas americanas en las que se hacian abortos criminales misivas que contenian un polvo blanco con escritos que señalaban «anthrax» y el 5 de diciembre de 2001 se descubrió que Clyton Lee Waagner, evadido de prisión en febrero, delincuente activista contra el aborto, había enviado más de 280 cartas a clínicas antiabor-

tivas de la costa este de USA en la segunda semana de octubre y al menos otras 270 en la primera semana de noviembre que contenían un polvo con supuestas bacterias de carbunco.

El Ministerio de Sanidad el 17 de octubre recomendó que toda carta sospechosa (exceso de sellos, no tener remite, contenido irregular etc.) sin agitar ni abriri el sobre que se meta en una bolsa de plástico; quien haya tocado el sobre o paquete se debe lavar las manos con agua y jabón y si cree que se pudo contaminar su ropa, debe quitársela y ducharse. Se informará a Sanidad y a la Policía. Si se abrió el sobre o si se derramó polvo se debe avisar a los Servicios NBQ, identificar con nombre y dirección a las personas que se hayan podido contaminar con el contenido de la carta y en su caso enviarlos al laboratorio (toma de muestras e inicar quimioprotección). La Dirección de Correos de España, dirigió a sus trabajadores el 22 de octubre de 2001 una circular con instrucciones para evitar el contagio por envios postales.

Pedro Gallardo, jefe de los 1.584 bomberos del Ayuntamiento de Madrid, aseguró que no están ni «preparados, ni formados, ni capacitados, ni equipados» para socorrer en caso de ataques químicos o bacteriológicos. «Si alguien mete gas en el metro, tampoco tenemos equipo. Los primeros intoxicados seríamos nosotros. Considera que seria enormemente caro equipar a los bomberos para una situación de guerra, que a su juicio, no es función de un bombero. Se han dado cursillos en Madrid al SAMUR impartidas por el Ministerio de Defensa.

Prevención. Postexposición al carbunco inhalatorio, provocado por terroristas

Ante la posibilidad de una agresión es fundamental difundir información entre los médicos y la población, sobre pautas de actuación. El Centro de Control de Enfermedades de EEUU difundió un Aviso Oficial con relación al manejo de dichos paquetes y cartas, aconsejando evitar pánico, ya que el contagio no es tan fácil y existen medidas de prevención.

No se puede desinfectar el interior de los envios postales por el seguro deterioro del contenido. Se aconsejó esterilizarlos con radiación

gamma. Stickle y cols. (2003) vieron que la exposición a 18 kG (100 horas x 18.000 rad/h) dosis letal para el Bacillus pumilus no modifica la ciclosporina ni el tracrolimus, contenidos en tubos para monitorizar esas substancias pero degrada la fenilalanina, la hemoglobina, la biotinidasa la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, tiroxina y tirotropina incluidas en gotas de sangre de recién nacidos, enviadas para el diagnósito precoz de enfermedades metabólicas, de modo que el test puede dar falso negativo para la fenilcetonuria obliga a ampliar el test para variantes de la hemoglobina. Auslender y cols. (2000) aconsejaron esterilizar el correo con un acelerador de partículas.

Se deben esterilizar las superficies contaminadas o sospechosas de haberlo estado. En cuanto a los alimentos contaminados deben someterse a una esterilización prolongada o incinerados.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ABRAMOVA, F. A.; GRINBERG, L. M.; YAMPOLSKAYA, O. V.; WALKER, D. H.;(1993) *Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. Proc Natl Acad Sci USA. 190*:2291-2294.

(2) AGAISSE, H.; GOMINET, M.; OKSTAD, A.; KOLSTO, A. B.; LEREDUS, D.;(1999) *PlcR is a pleiotropic regulator of extracelular virulencia factor gene expression in Bacillus thuringjensis. MoL MicrobioL 32*, 1043-1053.

(3) ALTSCHUL, S. F. Y COLS.;(1997) *Gapped BLAST and PSI-BI.AST: a new generación of protein database searcb programs. Nucleic Acids Res. 25*: 3389-3402.

(4) ALEXEYEV, O. A.; MOROZOV, V. G.; SUZDALTSEVAM T. V.; MISHUKOV, A.. S.; STEINBERG, L. A.; (1994) *Impaired neutrophil function in the cutaneous form of anthrax. Infection 4*:281-282.

(5) ALEXEYEV, O. A.; MOROZOV, V. G.; SUZDALTSEVA, T. V.; MISHUKOV, A. S.; STEINBERG, L. A.; (1994) *Impaired neutrophil function in the cutaneous form of anthrax. Infection 4*:281-282.

(6) ALTBOUM, Z.; GOZES, Y.; BARNEA, A.; PASS, A.; WHITE, M.; KOBILER, D.; (2002) *Postexposure prophylaxis against anthrax, evaluación of various treatment regimens in intranasally infected guinea pigs. InfectImmun. 70*: 6231-41.

(7) ANAISIMOV, T. I., PIMENOV, T. V.; KOZHUKHOV, V. V. Y COLS.;(1996) Development of method for preparation and maintenance of the anthrax strainsn-1. and test strain Zenkovsky. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):122.

(8) ANNAS, G.; (1992) Changing the consent rules for Desert Storm. N Engl J Med 326:770.

(9) ANTHONY, B. F.; SUTTON, A.;(1997) *The role of the FDA in vaccine testing and licensure. En Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, y cols (eds): New Generation Vaccines 2º ed. New York, Marcel Dekker,* p 1185

(10) ANÓNIMO; (1994).*Anthrax control and research, with special reference to national programme development in Africa: Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO. 72*:13-22.

(11) AUSLENDER, V. L.; VEDERNIKOV, V. A.; GRACHEV, M. A. Y COLS.;(2002) *Sterilization of mail by means of an electron beam accelerator. Dokl. Biol. Sci*. 385: 3069.

(12) ARAKAWA, E. T.; LAVRIK, N. V.; DATSKOS, P. G.;(2003) *Detection of anthrax simulants with microcalorimetri c spectroscopy: Bacillus subtilis and Bacillus cereus spores. Appl Opt. 42*: 1757-62.

(13) AUERBACH, S.; WRIGHT, G. G.; (1955) *Studies on immunity in carbunco. VI. Immunizing activity of protective antigen against various strains of Bacillus anthracis. J Immunol 75*: 129-33.

(14) BACON, D. J.; ANDERSON, W. F.;(1988) *A fast algorithm for rendering space-filling molecule pictures. J Mol Graphics 6*; 219-220.

(15) BAIL, O.; WEIL, E.; (1911) *Beiträge zum Studium der Milzbrandinfektion [in German]. Arch Hyg Bacteriol. 73*:218-264.

(16) BAILLIE, L. W.; (1999) *Presentation of protective antigen to the mouse immune system: immune sequelae. J Appl Microbiol. 87*: 31-57.

(17) BAILLIE, L. W.; MOORE, P.; MCBRIDE, B. W.; (1998) *A heanducible Bacillus sublis bacteriophage phi 105 expression system for the producon of the protective antigen of Bacillus anthracis. FEMS Microbiol Lett.*163: 437.

(18) BALIARD, J. D.; COLLIER, R. J.; STARNBACH, M. N.; (1996) *Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope in vivo. Proc. Natl Acad. Sci. USA 93*:12531-12534.

(19) BARTKUS, J. M.; LEPPLA, S. H.; (1989) *Transcriptional regulation of the protective antigen gene of Bacillus anthracis. Infect Immun. 57*:2295-2300.

(20) BEALL, F. A.; TAYLOR, M. J.; THORNE, C. B.; (1962) *Rapid lethal effects in rats of a third component found upon fractionating the toxin of Bacillus anthracis. J Bacteriol. 83*:1274-1280.

(21) BENMANN, A. Y COLS.;(2001) *Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of Corynebacterium glutamicum. Microbioloy 147*, 1765-1774.

(22) BENSON, E. L.; HUYNH, P. D.; FINKELSTEIN, A.; COLLIER, R. J.; (1998) *Identification of residues protective antigen channel. Biochemistry 37*;3941-3948.

(23) BERNSTEIN, B. J.; (1987) *The birth of the US biological warfare program. Sci Am* 256:116.

(24) BERNSTEIN, B. J.; (1987) *Churchill's secret biological weapons. Bull At sci 43*:46.

(25) BHATNAGAR, R.; SINGH, Y.; LEPPLA, S. H.; FRIEDLANDER, A. M.; (1989) *Calcium is required for the expression of anthrax lethal toxin activity in the macrophagelike cell line J774A.1. Infect Immun. 57*:2107-2114.

(26) BLAUSTEIN, R. O.; KOEHJER, T. M.; COLLIER, R. J.; FINKELSTEIN, A.; (1989) *Anthrax toxin: Channel-formingactivity of protective antigen in planar phospholipid bi1ayers. Proc. Natl Acad. Sci. USA 86,* 2209-2213.

(27) BOUDGHENE STAMBOULI, O.; MERAD BOUDI, A.; AISSA MAMOUN, A.; (1999) *Charbon: une lesion escarroque inhabituelle. Ann Dermatol Venereol. 126*: 71-89.

(28) BOWEN, J. E.; QUINN, C. P.; (1999) *The native virulence plasmid combination affects the segregational stability of a theta-replicating shuttle vector in Bacillus anthracis var. New Hampshire. J Appl Microbiol. 87*: 270-8.

(29) BRACHMAN, P. S.; (1980) *Inhalation anthrax. Ann N Y Acad Sci. 353*:83-93.

(30) BRACHMAN, P. S.; FRIEDLANDER, A. M.; (1994) *Anthrax. In Plotkin SA, Mortimer EA (eds): Vaccinesi ed 2. Philadelphia, WB Saunders,* p 729

(31) BRACHMAN, P. S.; GOLD, H.; PLOTKIN, S. A.; FEKETY, F. R.; WERRIN, M.; INGRAHAM, N. R.; (1962) *Field evaluación of a human carbunco vaccine. Am J Public Health 52*: 632-45.

(32) BRACHMAN, P. S.; PLOTKIN, S. A.; BUMFORD, F. H.; ATCHISON, M. M.; (1960) *An epidemic of inhalación carbunco: the first in the twentieth century. II. Epidemiology. Am J Hyg 72*:6-23.

(33) BRADLEY, K. A.; MOGRIDGE, J.; MOUREZ, M.; MINERO, R. I.; JOVEN, J. A. T.; (2001) *Nature 414*, 225-229.

(34) BROAD, W.; (1998) *Gene-engineered anthrax: ls it a weapon? New York Times*, Feb 14.

(35) BROAD, W.; (1998) *Norway's 1918 lump of sugar yields clues on arithrax in war. New York Times June 25: A11*.

(36) BROSSIER, F., WEBER LEVY, M.; MOCK, M.; SIRARD, J. C.; (2000) *Role of toxin funconal domains in anthrax pathogenesis. Infec Immun. 68*: 178-16.

(37) BROSTER, M. G.; HIBBS, S. E.; (1990) *Protective efficacy of anthrax vaccines against aerosol challenge. Salisbury Medical Bulletin 68(Suppl):91*.

(38) BRUNGER, A. T. Y COLS.; (1998) *Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallogr. D 54*:905-921.

(39) BUCHANAN, T. M.; FEELEY, J. C.; HAYES, P. S.; BRACHMAN, P. S.; (1971) *Anthrax indirect microhemagglutination test. J Immunol. 107*:1631-1636.

(40) Burns, J. C. y cols.; (1993) *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 90,* 8033-8037.

(41) BUSSIÈRE, J. L.; MCCORMICK, G. C.; GREEN, J. D.; (1995) *Preclinical safety assessment considerations. Pharm Biotechnol 6:61*.

(42) BUTLER, D.; (1997) *Admission on Gulf Warvaccines spurs debate on medical records. Nature 390:3*.

(43) CARLSON, C. R.; GRONSTAD, A.; KOLSTO, A. B.; (1992) *Physical map or the genomes of three Bacillus cereus strains J. BacterioL 174*:3750-3756.

(44) CARTER, G. B.; (1992) *Porton Down: 75 Years of Chemical and Biological Research. London: HMSO.*

(45) CARROLL, S. F.; COLLIER, R. J.; (1984) *NAD binding site of diphtheria toxin: identification of a residue within the nicotinamide subsite by photochernical modification with NAD. Proc. Natl Acad. Sci. USA 81*: 3307- 3311.

(46) CATALDI, A.; LABRUYERE, E.; MOCK, M.; (1990) *Construction and characterization of a protective antigen-deficient Bacillus ahracis strain. Mol Microbiol. 4*:1111-1117.

(47) CDC. (2000) *Use de carbunco vaccine in the United States. Recommendacións of the Advisory Committee on Immunización Practices. MMWR 49 (RR15);* 1-20.

(48) CDC. (2000) *National Institutes of Health*, 88-89.

(49) CHRISTOPHER, J. A.; (1998) SPOCK: The Structural Properties Observation and Calculation Kit (Program Manual) (The Center for Macromolecular Design, Texas A M University, College Station.

(50) CHRISTOPHER, G. W.; CIESLAK, TH. J.; PAVLIN, J. A.; EITZEN, E. M.;(1997) *Biological warfare. A historical perspective. JAMA 278*: 412-417.

(51) COHEN, S.; MENDELSON, I.; ALTBOUM, Z.; KOBILER, D.; ELHANANY, E.; BINO, T.; LEITNER, M.; INBAR, I.; ROSENBERG, H.; GOZES, Y.; BARAK, R.; FISHER, M.; KRONMAN, C.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A.; (2000) *Attenuated nontoxinogenic and nonencápsulated recombinant Bacillus anthracis spore vaccines protect against anthrax. Infec immun. 68:* 4549-58.

(52) COKER, P. R.; SMITH, K. L.; FELLOWS, P. F.; RYBACHUCK, G.; KOUSOULAS, K. G.; HUGHJONES, M. E.; (2003) *Bacillus anthracis virulence in Guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plásmido quantities and clonality. J Clin Microbiol. 41*: 121-28.

(53) COMMITTEE ON GOVEMMENT REFORM AND OVERSIGHT; (1997): Gulf War veterans' illnesses: VA, DOD continue to resist strong evidence linking toxic causes to chronic health effects. HR 105—388. Washington, DC, US Government Printing Office.

(54) COMMITTEE ON VETERANS' AFFAIRS, STAFF REPORT, US SENATE; (1994): ls military research hazard- ous to veterans' health? Lessons spanning half a century. S. Prt. 103-97, December 8.

(55) COSSART, P.; (2002) *Molecular and cellular basis of the infección by Listeria monocytogenes: an overview. lnt J. Med. Microbiol 291,* 401-409.

(56) COULSON, N. M.; FULOP, M.; TITBALL, R. W.; (1994) *Bacillus anthracisprotective antigen, expressed in Salmonella typhimurium sL 3261, affords protection against anthrax spore challenge. Vaccine 12:*1395.

(57) DANDO, M.; (1990) *Biological Warfare in the XXI Century Ed Brassey Londres 1994 de Vos V. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Salisbury Med Bull Suppl. 68*:19-23.

(58) DARLOW, H. M.; BELTON, F. C.; HENDERSON, D. W.; (1956) *The use of carbunco antigen to immunise man and monkey. Lancet* 476-9.

(59) DAVIES, J. C.; (1985) *A major epidemic of anthrax in Zimbabwe. Cent Afr J Med.* 28:291-298 1982, 29:8-12; 1983 31:176-180: 1985

(60) DIRCKX, J. H.; (1981) *Virgil on anthrax. Am J Dermatopathol.* 3:191-195.

(61) DIXON, T. C.; MESELSON, M.; GUILLEMIN, J.; HANNA, P. C.; (1999) *Anthrax. N. Engl. J. Med. 341*, 815-826.

(62) DOGANAY, M.; AYDIN, N.; (1991) *Antimicrobial susceptibility of Bacillus anthracis. Scand J Infect Dis. 23*:333-335.

(63) DONG, S. L.; (1990) *Progress in the control and research of anthrax in China. salisbury Medical Bulletin 68(suppl):104.*

(64) DUESBERY, N. S. Y COLS.; (1998) *Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. Science 280*; 734-737.

(65) DUESBERY, N. S.Y COLS.; (2001) *Suppression of as-mediated transformation and inhibition of tumour growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of mul Acad. Sci. USA 98;*4089-4094.

(66) DUESBERY, N. S.; VANDEWOUDE, G. F.; (1999) *Anthrax lethal factor causes proteolyc inacvaon of mitogen activated protein kinase kinase. J Appl Microbiol. 87*: 289-93.

(67) DUESBURY, N. S.; WEBB, C. P.; LEPPLA, S. H. Y COLS.; (1998) *Proteolytic Inactivation of MAP-kinase- kinase by anthrax lethal factor. Science* 280:734.

(68) DUTZ, W.; KOHOUT, E.; (1971) *Anthrax. Pathol Annu*. 209-248.

(69) EKÉUS, R.; (1992) The UN. Special Comissionm on Iraq. Stockholm International Peace Research Institute. Univr.Press.

(70) ELIOTT, J. L.; MOGRIDGE, J.; COLLIER, R. J.; (2000) *A quantitative study of the interactions of Bacjl1us anthracis edema factor and lethal factor with activated protective antigen. Biochemjstry 39,*6706-6713.

(71) ELKINA, A. V.; (1971) *The epidemiology of a pulmonary form of anthrax. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 48*:112-116.

(72) ESCUYER, V.; COLLIER, R. J.; (1991) *Anthrax protective antigen interacts with a specitic receptor on the surface of CHO-KI cells. Infect. Immun. 59*,3381-3386.

(73) EZZELL, J. W.; ABSHIRE, T. G.; (1988) *Immunological analysis of cell-associated antigens of Bacilllls anthracis. Infect Immun 56*:349.

(74) EZZELL, J. W. JR.; ABSHIRE, T. G.; (1992) *Serum protease cleavage of Bacillus anthracis protective antigen. J Gen Microbiol. 138*:543-549.

(75) FARCHAUS, J. W.; RIBOT, W. J.; JENDREK, S. Y COLS.; (1998) *Fermentation, purification,and charatterization of protective antigen from a recombinant, avirulent strain of Bacillus anthracis. J Appl Environ Microbiol 64*:982.

(76) FARRAR, W. E.; (1994) *Virulence and vaccines. Ann Intern Med* 121:379.

(77) FARRERAS, P.; ROZMAN, C.; (1987) Patología médica. Doyma, Barcelona.

(78) FEDHILA, S.; NEL, P.; LERECLUS, D.; (2001) *The InhA2 metalloprotease of Bacillus thuringiensis strain 407 required for pathogenicity in insects infected via the oral route. J. Bacteriol 84*: 3296-3304.

(79) FOUET, A.; SMITH, K. L.; KEYS, C.; VAISSAIRE, J.; LEDOUJET, C.; LEVY, M.; MOCK, M.; KEIM, P.; (2002) Diversity among French Bacillus anthracis isolates. J Clin Microbiol. 40, 47324.

(80) FRANZ, D. R.; JAHRLING, P. B.; FRIEDLANDER, A. M. Y COLS.; (1997) *Clinical recognición and management of pacientes exposed to biological warfare agents. JAMA 278*:399-41.

(81) Friedlander AM y cols. Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. Infect. Immun. 61,245-252:1993.

(82) FRIEDLANDER, A. M.; (1986) *Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process.J Biol Chem 261*;7123-7126.

(83) FRIEDLANDER, A. M.; (2001) *Tackling anthrax Nature 414*; 160.

(84) FRIEDLANDER, A. M.; WELKOS, S. L.; PITT, M. L. M.; EZZELL, J. W.; WORSHAM, P. L.; ROSE, K. J. Y COLS.; (1993) *Postexposure prophylaxis against experimental inhlalation anthrax. J Infect Dis. 167*:1239-1242.

(85) FOUET, A.; NAMY, O.; LAMBERT, G.; (2000) *Characterizaon of the operon encoding the alternave sigma (B) factor from Bacillus anthracis and its role in virulence. J Bacteriol. 182*: 5036-45.

(86) FOX, J.; (1998) *ASM News. May*, p 255.

(87) FRIEDLANDER, A. M.; PITTMAN, P. R.; PARKER, G. W.; (1999) *Carbunco vaccine: evidence for safety and efficacy against inhalaciónal carbunco. JAMA 282*: 2104-6.

(88) FUJIKURA, T.; (1990) Current occurrence of anthrax in man and animals. Salisbury Med Bull Suppl. 68:1.

(89) GAUR, R.; GUPTA, P. K.; BANERJEA, A. C.; SINGH, Y.; (2002) *Effect of nasal immunización with protective antigen of Bacillus anthracis on protective immune response against anthrax toxin. Vaccine. 20*: 28369.

(90) GEHR, P.; (1984) *Respiratory tract structure and funetion. J. Toxicols. Environ. Heafth, 12*, 235.

(91) GEISON, G. L.; (1995) The private science of Louis Pasteur. Princeton,NJ, Princeton University Press.

(92) GEISSLER, E.; (1986) BiologicaI and Toxin Weapons Today. Stockholm InternationaI Peace Research Institute. Oxford, Oxford University Press.

(93) GEISSLER, E.; (1990) Strengthening the Biological Weapons Convention by Confidence-Building Measures. Oxford: Oxford University Press.

(94) GINBURG, Y.; (1998) Sailors refuse vaccine. Navy Times ApriI 20.

(95) GOHAR, M. Y COLS.; (2002) *Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of Bacillus cereus reveals the importance or the PlcR regulon. Proteomics 2*:784-791.

(96) GOLD, H.; (1935) *Studies on anthrax. J Lab Clin Med 21*:134.

(97) GLADSTONE, G. P.; (1946) *Immunity to carbunco. protective antigen present in ce11-free culture filtrates. Br J Exp Pathol 27*: 394-418.

(98) GLASER, P. Y COLS.; (2001) *Comparative genomics of Listeria species. Sdence 294*, 849-852.

(99) GLASSMAN, H. N.; (1958) World incidence of anthrax in man. Public Health Rep. 73:22-24.

(100) GOLD, H.; Unit 731 Testimony. Tokyo: Yenbooks.

(101) GOLETZ, T. J. Y COLS.; (1997) Targeting H\V proteins to the ma;or histocompatibility complex of processing pathway with a novel gp 120-anthrax toxin fusion protein. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94; 12059-12064.

(102) GORDON, V. M.; LEPPLA, S. H.; HEWLITT, E. L.; (1988) *Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of Bacillus anthracis adenylate cydase toxin but not that of Bordetel/a pertussis adenylate cyclase toxin. Infect. Immun. 56*,1066-1069.

(103) GREENFIELD, W. S.; (1880) *Lectures on some recent investigacións into the pathology of infective and contagious diseases. Lecture m. Part 1. Carbunco and anthracoid diseases. Lancet 1*: 865- 7.

(104) GU, M. L.; LEPPLA, S. H.; KLINMAN, D. M.; (1999) *Protección against carbunco toxin by vaccinación with a DNA plasmid encoding carbunco protective antigen, Vaccine 17*: 340-4.

(105) GUPTA, P.; SINGH, A.; CHAUHUN, V.; BHATNAGAR, R.; (2001) *Involvernent of residues 147VYYE1GKI53 in binding of lethal factor to protective antigen of Bacillus anthracis. Biochem Biophys Res Comm. 280*:158-163.

(106) GUTTMANN, D. M.; ELLAR, D. J.; (2000) *Phenotypic and genotypic comparisons of23 strains from the Bacillus cereus complex for a selección ofknown and putative B. thuringiensis virulence factors. FEMS MicrobioL Lett. 188*, 7-13.

(107) HAIL, A. S.; ROSSI, C. A.; LUDWIG, G. V.; IVINS, B. E.; TAMMARIELLO, R. F.; HENCHAL, E. A.; (1998) *Comparison of noninvasive sampling sites for early detecon of Bacillus anthracis spores from rhesus monkeys after aerosol exposure. Mil Med. 164*: 833-7.

(108) HAMBLETON, P.; CARMAN, J. A.; MELLING, J.; (1984) *Anthrax: the disease in relación to vaccines. Vaccine 2*: 125-32.

(109) HAMBLETON, P.; CARMAN, J. A.; MELLING, J.; (1984) *Anthrax: The disease in relation to vaccines. Vaccine. 2*:125-132.

(110) HAMBLETON, P.; TURNBULL, P. C. B.; (1990) *Anthrax vaccine development: A continuing story. Adv BiotechnoI Processes 13*:105.

(111) HANNA, P. (1998) *How carbunco kills. Science 280*. 1671-3.

(112) HANNA, P. C.; ACOSTA, D.; COLLIER, R. J.; (1993) *On the role of macrophages in anthrax. Proc. Natl Acad. Sci. USA 90;* 10198-10201.

(113) HANNA, P.; (1999) *Lethal toxin acons and their consequences. J Appl Microbiol. 87*: 28-57.

(114) HARRISON, A. B.; (1987) Medicina Interna. Interamericana, Madrid.

(115) HARRISON, L. H.; EZZELL, J. W.; ABSHIRE, T. G.; KIDD, S.; KAUFMANN, A. F.; (1989) *Evaluation of serologic tests for diagnosis of anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay. J Infect Dis. 160*:706-710.

(116) HEEREN, R. H.; (1947) *Anthrax in Louisin. New Orleans Medical and Surgical Journal 99*:545.

(117) HELGASON, E. Y COLS.; (2000) *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Baci1lus thuringiensis-one species on the basis of genetic evidence. App1. Envjron. Microbiol. 66*, 2627-2630.

(118) HENDERSON, D. W.; PEACOCK, S.; BELTON, F. C.; (1956) *Observacións on the prophylaxis of experimental pulmonary carbunco in the monkey. J Hyg 54*:28-36.

(119) HOFFMASTER, A. R.; KOEHLER, T. M.; (1999) *Control of virulence gene expression in Bacillus anthracis. J appl Microbiol. 87*: 279-81.

(120) HOFFMASTER, A. R.; FITZGERALD, C. C.; RIBOT, E.; MAYER, L. W.; POPOVIC, T.; (2002) *Molecular subtyping of Bacillus anthracis and the 2001 bioterrorismassociated anthrax outbreak United States. Emerg Infect Dis., 8*, 111-16.

(121) HOLMES, R. K.; (1998) Anthrax. JII Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, y cols (eds): En Harrison's PrincipIes of InternaI Medicine, ed 14. New York, McGraw-Hill p 897.

(122) HOOVER, D. L.; FRIEDLANDER, A. M.; ROGERS, L. C.; YOON, I-K.; WARREN, R. L.; CROSS, A. S.; (1994) *Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. Infect Immun. 62*:4432-4439.

(123) HUNNINGHAKE, G. W.; KAWANAMI, O.; FERRANS, V. J. Y COLS.; (1981) *Characterization of the inflammatory and immune effector cells in the lung parenchyma of pacientes with interstitial lung disease. A Respir Dis. 123*; 407.

(124) HUXSOLL, D. L.; PATRICK, W. C.; PARROTT, C. D.; (1987) Veterinary services in biological disasters. J Am Vet Med Assn 190:714.

(125) IBRAHIM, K. H.; BROWN, G.; WRIGHT, D. H.; ROTSCHAFER, J. C.; (1999) *Bacillus anthracis: medical issues of biologic warfare. Pharmacotherapy. 19(6)*: 690-701.

(126) INGLESBY, T. H. V.; HENDERSON, D. A.; BARTLETT, J. G.; ASCHER, M. S.; EITZEN, E.; FRIEDLANDER, A. M. Y COLS.; (1999) *Anthrax as a biological weapon. Medical and public health management. JAMA 281:* 1735-45.

(127) IVINS, B. E.; (1998) Anthrax vaccines. How stable is the potency? Presented at the ASMth ifc, General Meeting, Atlanta, May 18.

(128) IVINS, B. E.; EZZELL, J. W. JR.; JEMSKI, J.; HEDLUND, K. W.; RISTROPH, J. D.; LEPPLA, S. H.; (1986) *Immunización studies with attenuated strains of Bacillus anthracis. Infect Immun 52*. 454-548.

(129) IVINS, B. E.; FELLOWS, P. F.; NELSON, G. O.; (1994) *Efficacy of a standard human anthrax vaccine against Bacillus anthracis spore challenge in guinea pigs. Vaccine 12*:872.

(130) IVINS, B. E.; FELLOWS, P. F.; PITT, M. L. M.; (1996) Efficacy of a standard human anthrax vaccine against Bacillus alllhracis aerosol spore challenge in rhesus monkeys. Salsbury Medical 87(suppl):125.

(131) IVINS, B. E.; FELLOWS, P.; PITT, L. Y COLS.; (1995) *Experimental anthrax vaccines: Efficacy of adjuvants combined with protective antigen againstan aerosoI Bacillus anthracis spore chalIenge in guinea pigs. Vaccine 13*:1779.

(132) IVINS, B. E.; FELLOWS, P. F.; PITT, M. L. M. Y COLS. (1995) *Efficacy of a standard human carbunco vaccine against Bacillus anthracis aerosol spore challenge in rhesus monkeys. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):* 125-6.

(133) IVINS, B.; FELLOWS, P.; PITT, L. Y COLS.; (1995) *Experimental carbunco vaccines: efficacy of adjuvants combined with p(otective antigen against an aerosol Bacillus anthracis spore challenge in guinea pigs. Vaccine 13*: 1779-84.

(134) IVINS, B. E.; FELLOWS, P. F.; PITT, M. L. M. Y COLS.; (1996) Efficacy of a standard human anthrax vaccine against Bacillus anthracis aerosol challenge in rhesus monkeys. Salisbury Med Bull Suppl. 87(suppl): 125-126.

(135) IVINS, B. E.; PITT, M. L. M.; FELLOWS, P. F. Y COLS.; (1998) *Comparative efficacy of experimental carbunco vaccine candidates against inhalación carbunco in rhesus macaques, Vaccine 16*:1141-8.

(136) IVINS, B. E.; WELKOS, S. L.; (1988) *Recent advances in the development of an improved, human anthrax vaccine. Eur J Epidemiol. 4*:12-19.

(137) IVINS, B. E.; WELKOS, S. L.; (1998) *Recent advances in the development of an improved human carbunco vaccine. Eur J Epidemiol 4*: 12-9.

(138) IVINS, B. E.; WELKOS, S. L.; (1986) *Cloning and expression of the Bacillus anthracis protective antigen gene in Bacillus subtilis.lnfect Immun 54*: 537-42.

(139) IVINS, B. E.; WELKOS, S. L.; KNUDSON, G. B. Y COLS.; (1990) *Immunization against anthrax with aromatic Complejo de edificios número dependent (Aro-) mutants of Bacillus anthracis and with recombinant strains of Bacills subtilis that produce anthrax protective antigen. Infect Immunol 58*:303-8.

(140) IVINS, B. E.; WELKOS. S. L., LITTLE, S. F. Y COLS.; (1990) *Cloned protective activity and progress in development of improved anthrax vaccines. SaIisbury MedicaI Bulletin, 68: (suppl):86.*

(141) IVINS, B. E.; WELKOS, S. L.; LITTLE, S. F. Y COLS.; (1992) *Immunization against anthrax with Bacillus anthracis protective antigen combined with adjuvants; Infect Immun 60*:662.

(142) JACKSON, P. J.; HUGH JONES, M. E.; ADAIR, D. M.; GREEN, G.; HILL, K. K.; KUSKE, C. R.; GRINBERG, L. M.; ABRAMOVA, F. A.; KEIM, P.; (1998) *PCR analysis of issue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims. The presence of multiple Bacillus anlhracis strains in different victims. Proc Natl Acad Sci USA. 95*: 122-49.

(143) JOHNSON-WINEGAR, A.; (1984) *Comparison of enzyme-linked immunosorbent and indirect hemagglutinación assays for determining carbunco antibodies. J Clin Microbiol 20*.35 7-61.

(144) JOINT VACCINE ACQUISITION PROGRAM; (1997) Final Programmatic Environmental Assessment. Joint Vaccine Acquisition Program Project Management Office, Department of the Army, August.

(145) JONES, M. N.; BEEDHAM, R. J.; TURNBULL, P. C. B. Y COLS.; (1996) *Antibiotic prophylaxis for inhalation anthrax, Salisbury MedicaI Bulletin 87(suppI):127.*

(146) JONES, M. N.; BEEDHAM, R. J.; TURNBULL, P. C. B. Y COLS.; (1996) *Efficacy of the UK human anthrax vaccine in guinea pigs against aerosolized spores of Bacills anthracis. Salisbury Med. Bulletin 87(suppI):123.*

(147) KADLEC, R. P.; ZELICOFF, A. P.; VRTIS, A. M., (1997) *BiologicaI weapons: Control, prospects and implications for the future. JAMA 278*:351.

(148) KASHIBA, S.; MORISHIMA, T.; KATO, K.; SHIMA, M.; AMANO, T.; (1959) *Leucotoxic substance produced by Bacillus anthracis. Biken J. 2*:97-104.

(149) KAUFMANN, A. F.; (1990) *Observations on the occurrence of anthrax as related to soil type and rainfall. Salisbury Med Bull Suppl. 68*:16-17.

(150) KAUFMAN, A.; (1998) Anthrax Vaccine S., fety and Efficacy. ProMED-MaiI, April 16.

(151) KEIM, P. Y COLS. (2000) *Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationship within Bacilus anthracis J. Bacteriol 182,* 2928-2936.

(152) KEIM, P.; SMITH, K. L.; (2002) *Bacillus anthracis evolución and epidemiology. Curr Top Microbiol Immunol*. 271: 2132.

(153) KEPPIE, J.; HARRIS-SMITH, P. W.; SMITH, H.; (1963) *The chemical basis of the virulence of Bacillus anthracis, IX: Its aggressins and their mode of action. Br J Exp Pathol. 44*:446-453.

(154) KILUDSEN, G. B.; (1986) *Treatment of anthrax ii, man: History and current concepts. Mil Med* 151:71.

(155) KLIMPEL, K. R.; ARORA, N.; LEPPLA, S. H.; (1994) *Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. Mol Microbiol. 13*:1093-1100.

(156) KLIMPEL, K. R.; MOLLOY, S. S.; THOMAS, G.; LEPPLA, S. H.; (1992) *Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with sequence specificity and catalytic properties of furin. Proc Natl Acad Sci USA. 89*: 10277-10281.

(157) KO, M.; CHOI, H.; PARK, C.; (2002) *Group I self-splicing intron in the recA gene of BadUus anthracis. J. BacterioL 184*, 3917-3922.

(158) KOCH, R.; (1876) *Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus anthracis. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 2*:277-310.

(159) KOEHLER, T. M.; COLLIER, R. J.; (1991) *Anthrax toxin protective antigen: low-pH-induced hydrophobicity and channel formation in li Krauis PJ, Molscript a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J AppLCrystallogr. 24*; 946-950.

(160) KOTIRANTA, A.; LOUNATMAN, K.; HASPSALO, M.; (2000) *Epidemiology and pathogenesis of Bacillus Cereus infecciónS. Microbes lnfect. 2*: 189-198.

(161) KOTIRANTA, A. Y COLS.; (1998) *Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis and adherencia to matrix protein of Bacillus cereus cells with and without the crystalline surface protein layer. lnfect lmmun. 66*: 4895-4902.

(162) KUNST, F, Y COLS.; (1997) *The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature 390*, 249-256.

(163) LAMB, R.; (1973) *Anthrax. Br Med J. 1*; 157.

(164) LAKSHMI, N.; KUMAR, A. G.; (1992) *An epidemic of human anthrax - a study. Indian J Pathol Microbiol 35*:1-4.

(165) LEPORE, L. S.; ROELVINK, P. R.; GRANADOS, R. R.; (1996) *Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infecciónS, is a metalloprutease. J. Invertebr. PathoL 68*, 131-140.

(166) LEPPLA, S. H.; (1982) *Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cAMP concentrations in eukaryotic cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 79*,3162-3166.

(167) LEPPLA, S. H.; (1991) The anthrax toxin complex. In: Alouf JE, Freer JH, eds. Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. London. Academic Press.

(168) LEPPLA, S. H.; FRIEDLANDER, A. F.; SINGH, Y. Y COLS.; (1990) *A model for anthrax toxic action at the cellular level. Salisbury Medical Bulletin 68(suppl):4l.*

(169) LEPPLA, S. H.; KLIMPEL, K. R.; SINGH, Y. Y COLS.; (1996) *Interaction of anthrax toxin with mammalian cells. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):91*.

(170) LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GRANDVALET, C.; SALAMITOU, S.; GOMINET, M.; (2000) *Regulation of toxin and virulence gene transcription in Bacillus thuringiensis. lnt. J. Med. Microbiol. 290*:295-299.

(171) LESNYAK, O. T.; SALTYKOV, R. A.; (1970) Comparative assessment of anthrax vaccine strains. Zh Mikrobiol Epidemiol lmmunobio. 147:32.

(172) LIGHTFOOT, N. F.; SCOTT, R. J. D.; TURNBULL, P. C. B.; (1990) *Antimicrobial susceptibility of Bacillus anthracis. Salisbury Med Bull. Suppl 68*:95-98.

(173) LINCOLN, R. E.; FISH, D. C.; (1970) Anthrax toxin. In: Montie TC, Kadis S, Ajl SJ, eds. Microbial Toxins. Vol 3. New York, NY: Academic Press; 361-414.

(174) LINCOLN, R. E.; WALKER, Js.; KLEIN, F. Y COLS.; (1967) Value of fleld data for extrapolatlon m anthrax. Fed Proc 26:1558.

(175) LITTLE, S. L.; LOWE, J. R.; (1991) *Location of receptor-binding región of protective antigen from Bacillus anthracis. Biochem Biophys Res Commun. 180*:531-537.

(176) LITTLE, S. F.; LVINS, B. E.; FELLOWS, P. F. Y COLS.; (1997) Passive protection by polyclonal antibodies against Bacillus anthracis infection in guinea pigs. Infect lmmun 65:517l.

(177) LITTLE, S. F.; KNUDSON, G. B.; (1986) *Comparative efficacy of Bacillus anthracis live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. Infect Immun. 52*:509-512.

(178) LVANOVA, N.; SOROKLNT, A.; YERSON, I. Y COLS.; (2003) *Genoma sequence of Bacillus cereus y comparative análisis con Bacillus anthracis. Nature 423*. 86.

(179) MAHLANDT, B. G.; KLEIN, F.; LINCOLN, R. E.; HAINES, B. W.; JONES, W. I. JR.; FRIEDMAN, R. H.; (1996) *Immunologic studies of carbunco: IV. Evaluación of the immunogenicity of three components of carbunco toxin. J Immunol 96*: 727-33.

(180) MAYNARD, J. A.; MAASSEN, C. B.; LEPPLA, S. H.; BRASKY, K.; (2002) *Patterson JL, Iverson BL, Georgiou G. Protección against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. Nat Biotechnol. 20*: 597-601.

(181) MARGULIS, L. Y COLS.; (1998) *The Arthromitus stage or Bacillus cereus: intestinal symbionts of animals. Proc N. Acad. Sci. USA 95*: 1236-1241.

(182) MCBRIDE, B. W.; MOGG, A.; TELFER, J. L.; LEVER, M. S.; MILLER, J.; TURNBULL, P. C.; BAILLIE, L.; (1998) *Protective efficacy of a recombinant protective angen against Bacillus anthracis challenge and assessment of immunological markers. Vaccine. 16*: 810-7.

(183) MCCANN, K. P.; ROBINSON, C.; SAMMONS, R. L.; SMITH, D. A.; CORFE, B. M.;(1996) *Alanine germinación receptors of Bacllus subtilis. Lett AppL Microbiol. 23*, 291-294.

(184) MERRIT, E. A.; MURPHY, M. E. P.; (1994) *Raster3D version 2.0. A program for photorea\istic molecular graphics. Acta Crystallogr. D S O*. 869-873.

(185) MESELSON, M.; GUILLEMIN, J.; HUGH-JONES, M.; LANGMUIR, A.; POPOVA, I.; SHELOKOV, A. Y COLS.; (1994) *The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979.Science; 266*:1202-1208.

(186) MIGNOT, T. Y COLS.; (2001) *The incompatibility hetween the PlcR- and AtxA-controled regulons may have selected a nonsense mutación in Bacillus anthracis. MoL Microbiol. 42*, 1189-1198.

(187) MIKESELL, P.; IVINS, B. E.; RISTROPH, J. D.; DREIER, T. M.; (1983) *Evidence for plasmid-mediated toxin production in Bacillus anthracis. Infect Immun. 39*:371-376.

(188) MILLER, C.; (1998) *Reserve troops suffering from syndrome. PA News (UK) september 24, 1997 Miller J: Clinton seeks additional 300 million to fight. bioterrorism. New York Times 9 June 9.*

(189) MILLER, J.; (1998) *Company led by top admiral buys Michigan vaccine lab. New York Times July 8.*

(190) MILNE, J. C.; BLANKE, S. R.; HANNA, P. C.; COLLIER, R. J.; (1995*) Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino- or carboxy- terminus. MoL MicrobioL 15*,661-666.

(191) MILNE, J. C.; COLLIER, R. J.; (1993) *pH-dependent permeabilization of the plasma membrane of mammalian cells by anthrax protective antigen. MoL MicrobjoL 10*,647-653.

(192) MILNE, J. C. Y COLS.; (1994) *Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. J. BioL Chem. 269,*20607-20612.

(193) MOCK, W. L.; STANFORD, D. L.; (1996) *Arazo formyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. Biochemistry 35*:7369-7377.

(194) MOLLOY, S. S. Y COLS.; (1992) *Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. J. BioL Chem. 267,* 16396-16402.

(195) NASS, M.; (1992) Anthrax epizootic in Zimbabwe, 1978-1980: Due to deliber¡¡te spread? Physicians for social Responsibility Quarterly 2:198.

(196) NASS, M.; (1998) *Anthrax vaccine and the prevention of biological warfare? ASA Newsletter 65*;1-20.

(197) NASS, M.; (1998) Anthrax Vaccine safety and Efficacy: Response to Army Surgeon General Ronald Blanck's posting. Pro-MED Mail, May 7.

(198) NASS, M.; (1991) The labyrinth of biological defense. PsI Quarterly 1:24.

(199) NEWMAN, M. J.; POWELL, M. F.; (1995) *lmmunological andformulatio~ design considerations for subunit vaccines. Pharm Biotechnol 6*:1.

(200) NOLLING, J. Y COLS.; (2001) *Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium Clostridjum acetobutyricum. J. Bacteriol. 183*.4823—4838.

(201) NORTON-TAYLOR, R.; (1997) *MOD ignorcd warning on Gulf drugs. Thc Guardian (UK) October 29.*

(202) O'BRIEN, J.; FRIEDLANDER, A.; DREIER, T.; EZZELL, J.; LEPPLA, S.; (1985) *Effects of anthrax toxin components on human neutro-phils. Infect Immun. 47*:306-310.

(203) OKINAKA, R. T. Y COLS.; (1999) *Sequence and organización of pXOI, the large Baci/1us anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes. J. Bacteriol. 181*. 6. 515.

(204) OKINAKA, R. Y COLS.; (1999) *Sequence,assembly and analysis ufpXOI and pX02.J. App1. Microbiol. 87,* 261-262.

(205) OKSTAD, O. A. Y COLS.; (1999) *Sequence analysis of three Bacillus cereus loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. Microbiology 145*: 3129-3138.

(206) ORENSTEIN, W. A.; HINMAN, A. R.; BART, K. J. Y COLS.; (1995) *Immunization. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds): PrincipIes and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, NY,* p 2770

(207) OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W.; (1997) *Processing ofX-ray diffraction data coUected in osciUation mode. Methods Enzymol. 276*; 307-326.

(208) PANEN, M. J.; LAM, A. C.; ANTONIO, M.; DUNBAR, K.; (2001) *An embarrassment of sortases-a richness of substrates? Trends Microbiol 9*:97-102.

(209) PANNIFER, A. D.; YIAN WONG, TM.; SCHWARZENBACHER, R. Y COLS.; (2001) *Crystal structire of the anthrax letal factor. Nature 414*, 229.

(210) PANNUCCI, J.; OKINAKA, R. T.; SABIN, R.; KUSKE, C. R.; (2002) *Bacillus anthracis pXOI plasmid sequence, conservación among closely related bacterial species. J. Bacteriol 184*, 134-141.

(211) PARK, S.; LEPPLA, S. H.; (2000) *Optimized production and purification of Bacillus anthracis lethal factor. Protein Expr Purif 18*; 293-302.

(212) PARKHILL, J. Y COLS.; (2001) *Genome sequence of YeTSjnio pestis, the causative agent of plague. Nature 413*, 523-527.

(213) PASTEUR, L.; (1881) *Sur l´ attenuation de of virus. C R Acad Sci 101*:429-35.

(214) PASTEUR; CHAMBERLAND; ROUX; (1881) *Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près Melun, sur la vaccination charbonneuse. Comptes Rendus des séances De L'Académie des Sciences. 92*:1378-1383.

(215) PATRA, G.; VAISSAIRE, J.; WEBER LEVY, M.; LEDOUJET, C.; MOCK, M.; (1998) *Molecular characterizaon of Bacillus strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. J Clin Microbiol. 36*: 3412-4.

(216) PELLIZZARI, R.; GUIDI-RONTANI, C.; VITALE, G.; MOCK, M.; MONTECUCCO, C.; (1999) *Anthrax lethal facto MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN'Y-induced release of NO and TNF.FEBS Letters 462*; 199-204.

(217) PESCHEL, A. Y COLS.; (2001) *Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killi via the novel virulencia factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. J. Exp Med. 193*: 1067-1076.

(218) PETOSA, C.; COLLIER, R. J.; KLIMPEL, K. R.; LEPPLA, S. H.; LIDDINGTON, R. C.; (1997) *Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. Nature 385*:833-838.

(219) PEZARD, C.; BERCHE, P.; MOCK, M.; (1991) *Contribution of individual toxin components to virulence of B. anthracis.lnfect. lmmun. 59*; 3472-3477.

(220) PILE, J. C.; MALONE, M.; EITZEN, E. M.; FRIEDLANDER, A. M.; (1998) *Carbunco as a potential biological warfare agent. Arch Intem Med 158*:429-34.

(221) PINEDO SAIZ, L.; (1965) *Estudios de la Zoonosis carbuncosa en la provincia de Teruel, Rev. de San e Hig Pub. Ener*.

(222) PITT, M. L. M.; IVINS, B. E.; ESTEP, J. E.; FARCHAUS, J.; FRIEDLANDER, A. M.; (1995) *Comparison of the efficacy of purified protective antigen and MDPH [AVA] to protect non-human primates from inhalación carbunco. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):130.*

(223) PLOTKIN, S. A.; BRACHMAN, P. S.; UTELL, M.; BUMFORD, F. H.; ATCHISON, M. M.; (1960) *An epidemic of inhalation anthrax, the first in the twentieth century, I: Clinical features. Am J Med. 29*:992-1001.

(224) POMERANTSEV, A. P. Y COLS.; (1997) *Vaccine JS*,1846-1850.

(225) POMERANTSEV, A. R.; MOCKOV, Y. U. V.; MARININ, L. I. Y COLS.; (1996) *Anthrax prophylaxis by antibiotic resistant strain STI—AR in combination with urgent anfibiotic therapy. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl);131.*

(226) POMERANTSEV, A. P.; STARITSIN, N. A.; MOCKOV, Y. V.; MARININ, L. I.; (1997) *Expression of cereolysin A13 genes in Bacillus anthracjs vaccine strain ensures protection against experimental hemolytic anthrax infection. Vaccine 15*:1846.

(227) POPOV, S. G.; VILLASMIL, R.; BERNARDI, J.; GRENE, E.; CARDWELL, J.; POPOVA, T.; WU, A.; ALIBEK, D.; BAILEY, C.; ALIBEK, K.; (2002) *Effect of Bacillus anthracis lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells. FEBS Lett. 527*: 211-5.

(228) PRESIDENTIAL ADVISORY COMMITTEE ON GULF WAR VETERANS ILLNESSES. (1996) *lnterim Rcport. US.Govt Pritlng Offlce, Wash.DC, Februry.*

(229) PRESIDENTIAL ADVISORY COMMITTCE ON GULF WAR VETERANS' ILLNESSES.(1997) *Special Report. US Govt Printing Office, Wash., DC, October 31.*

(230) PRESTON, R.; (1998) *The Bioweaponeers. New Yorker, March 9,* p 52.

(231) PUZISS, M.; MANNING, L. C.; LYNCH, J. W. Y COLS.; (1963) *Large-scale production of protective antigcn: \ of Bacjllus anfhracis in anaerobic cultures. Appl Microbiol 11*:330.

(232) QUINN, C. P.; SINGH, Y.; KIMPEL, K. R.; LEPPLA, S. H.; (1991) *Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by in-frame insertion mutagenesis.J Biol Chem 266*:20124-20130.

(233) RAMISSE, V.; PATRA, G.; VAISSAIRE, J.; MOCK, M.; (1999) *The Ba813 chromosomal DNA sequence effecvely traces the whole Bacillus anthracis community. J Appl Microbiol. 87:* 22-48.

(234) READ, T. D. Y COLS.; (2002) *Comparative gennme sequencing fur discovery of novel polymorphisms in BaciUus t anthrncis. Science 296*, 2028-2033.

(235) READ, T. D.; PETERSON, S. N.; TOURASSEM B. Y COLS.; (2003) *The genome sequence of Bacillus anthracis Ames and comparison to closely related bacteria. Nature 423*: 81.

(236) REDMOND, C.; HALL, G. A.; TURNBULL, P. C.; GILLGAN, J. S.; (1997) *Experimentally assessed public health risks associated with pigs from farms experiencing anthrax. Vet Rec. 6;* 244-7.

(237) REGALL, I. C.; (1921) *The local and general serum treatmcnt of cutaneous anthrax. JAMA 77*:1944.

(238) RODRÍGUEZ, P. M.; (1997) *Anti-HIV mix is found in blood of Gulf War veterans. Washington Times, August 24.*

(239) ROOK, G.; ZUMLA, A.; (1997) *Gulf War syndrome: ls it due to a systemic shift in cytokin balance towards a Th2 profile? Lancet 349*:1831.

(240) ROSS, J. M.; (1957) *The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. J Pathol Bacteriol. 73*:485-494.

(241) SACCHI, C. T.; WHITNEY, A. M.; MAYER, L. W.; MOREY, R.; STEIGERWALT, A.; BORAS, A.; WEYANT, R. S.; POPOVIC, T.; (2002) *Sequencing of 16S rRNA gene, a rapid tool for identificación of Bacillus anthracis. Emerg Infect Dis. 8*: 1117-23.

(242) SAIZ MORENO, L.; (1990) Aspectos epidemiológicoá de las zoonosis. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

(243) SALAMITOU, S. Y COLS.; (2000) *The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus in mice and insects. Microbiology 46*:2825-2832.

(244) SALZBERG, S. L.; DELCHER, A. L.; KASIF, S.; WHITE, O.; (1998) *Microbial gene identificación using interpolated Markov models. Nucleic Acids Res. 26*,544-548.

(245) SCHUMM, W.R.; WEBB, F. J.; JURICH, A. P.; BOLLMAN, S R.; (2002) *Comments on the Institute of Medicine's 2002 report on the safety of anthrax vaccine. Psychol Rep. 91*: 187-91.

(246) SELLMAN, B. R.; MOUREZ, M.; COLLIER, R. I.; (2001) *Science 292*, 695-697.

(247) SHEPARD, C. W.; SORIANO GABARRO, M.; ZELL, E. R.; HAYSLETT, J.; LUKACS, S.; GOLDSTEIN, S.; FACTOR, S.; JONES, J.; RIDZON, R.; WILLIAMS, I.; ROSENSTEIN, N.; (2002) *Antimicrobial postexposure prophylaxis for anthrax, adverse events and adherence. Emerg Infect Dis. 8*:1124-32.

(248) SHIN, S.; KIM, Y. B.; HUR, G. H.; (1999) *Involvement of phospholipase A2 activation in anthrax lethal toxin induced cytotoxicity. Cell Biol Toxicols.15*: 19-29.

(249) SHLYAKOV, E.; (1996) Anthrax in-a skin test for early and retrospective diagnosis of anthrax and anthrax vaccination assessment. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):109.

(250) SHLYAKHOV, E.; RUBINSTEIN, E.; (1994) *Human live carbunco vaccine in the former USSR. Vaccine 12*. 727-30.

(251) SHLYAKHOV, E.; RUBINSTEIN, E.; (1994) *Hypersensibilité retardée charbonneuse post-vaccinale.Hypersensibilite retardée chez l'homme vacciné contre le charbon. Med Trop Mars. 54*: 133.

(252) SHLYAKOV, E.; RUBINSTEIN, E.; NOVJKOV, I.; (1997) *Anthrax post vaccinal cell mediate immunity in humans; Kinetics pattern. Vaccine 15*;631.

(253) SINGH, Y.; KHANNA, H.; CHOPRA, A. P.; MEHRA, V. J.; (2001) *Biol. Chem.* 276, 22090-22094.

(254) SINGH, Y.; KLIMPEL, K. R.; QUINN, C. P.; CHAUDHARY, V. K.; LEPPLA, S. H.; (1991) *The carboxyl-terminal end of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity. J Biol Chem. 266*:15493-15497.

(255) SIRARD, J-C.; MOCK, M.; FOUET, A.; (1994) The three Bacillus anthracis toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. J Bacteriol.

(256) SIRISANTHANA, T.; NELSON, K. E.; EZZELL, J.; ABSHIRE, T. G.; (1994) *Serological studies of pacientes with cutaneous and oral-oropharyngeal anthrax from northern Thailand. Am J Trop Med Hyg. 9:*575-581; 198876:5188-5192.

(257) SLAMTI, L.; LERECLUS, D.; (2002) *A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the Bacillus cereus group. EMBO J. 21*:4550-4559.

(258) SMITH, H.; KEPPIE, J.; (1954) *Observations on experimental anthrax: Demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by Bacillus anthracis. Nature. 173*:869-870.

(259) SMITH, K. L. Y COLS.; (1999) *Meso-scale ecology of anthrax in southern Africa: a pilot study of diversity and clustering.J Appl Microbiol. 87*: 204-7.

(260) SMITH, R. J.; (1980) *Soviet anthrax explanation is debunked. Science.209*:375.

(261) SPIERS, E. M.; (1996) Chemical and Biological Terrorism. En: The Centre for Defence Studies. Ed King's College. London.

(262) STANLEY, J. L.; SMITH, H.; (1961) *Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. J Gen Microbiol.26*:49-66.

(263) STEME, M.; (1939) *The use of carbunco vaccines prepared from avirulent (unencapsulated) variants of Bacillus anthracis. Onderstepoort J Vet Sci An Ind 13*.307-12.

(264) STEPHEN, J.; (1986) Anthrax toxin. In: Dorner F, Drews J, eds. Pharmacology of Bacterial Toxins. Oxford, England: Pergamon Press.

(265) SWANSON, E. R.; FOSNOCHT, D. E.; (2000) *Anthrax threats: a report of two incidents from Salt Lake City. J Emerg Med. 18*: 22-93.

(266) STEPANOV, A. S.; KLIMPEL, K. R.; LEPPLA, S. H.; (1996) Extracellularproteases in Bací/lus anthracis. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):87.

(267) STEPANOV, A. S.; LEPPLA, S. H.; (1996) Macrophages are killed by the plasmid and chromosomally encoded factors synthesized by Baci/1us anthracis inside and outside the host cell. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):89.

(268) STEPANOV, A. V.; MARININ, U.; POMERANTSEV, A. P. Y COLS.; (1996) *Development of novel vaccines against anthrax in man. J Biotech 44*:155.

(269) STEPANOV, A. S.; MARININ, L. L.; STARITSYN, N. A. Y COLS.;(1997) Molecular mechanisms underlying Bacillus anthracis infection at early stages and search for novel vaccines. Vestn Ross Akad Med Nauk 6:16.

(270) STEPANOV, A. S.; MIKSHIS, N. L.; BOLOTNIKOVA. M. F.; (1996) Role of chromosomally-encoded factors in virulence of Bacillus anthracis for mice and guinea pigs. Salisbury Medical Bulletin 87(suppl):86.

(271) STICKLE, D. F.; MCKENZIE, D. A.; LANDMARK, J. D.; PIRRUCCELLO, S. J.; POST, G. R.; IWEN, P. C.; THOMPSON, R. B.; HINRICHS, S. H.; (2003) *Effects of sterilizing gamma irradiación on bloodspot newborn screening tests and whole blood cyclosporine and tacrolimus measurements. Am J Clin Pathol. 119*: 2927.

(272) TAFT, S. A.; LIBER, H. L.; SKOPEK, T. R.; (1994) *Mutational spectrum of1CR-191 at the hprt locus in human lyrophoblastoid cells. Environ. MoL Mutagen. 23*,96-100.

(273) TERWILLIGER, T. C.; BERENDZEN, J.; (1999) *Automated MAD and MIR structure solution. Acta Crystallogr. D 55*;849-861.

(274) THORNE, C. B.; (1993) Bacillus subtilis and others Gram-positive Bacteria 113-124.

(275) TICKNOR, L. O. Y COLS.; (2001) *Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis or norwegian Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis soil isolates. Appl Environ. Microbiol 67*: 4863-4973.

(276) TJADEN, J. A.; LAZARUS, A. A.; MARTÍN, G. J.; (2002) *Bacteria as agents of biowarfare. How to proceed when the worst is suspected. Postgrad Med.* 112: 5760.

(277) TURNBULL, P. C. B.; (1991) *Anthrax vaccines:. present and future. Vaccine 9*:533-8; 1991

(278) TUMBULL, P. C.; (1999) *Definitive identificación of Bacillus anthracis; a review. J Appl MicrobioL 87*.237-240.

(279) TURNBULL, P. C.; BROSTER. M. G.; CARMAN, J. A.; MANCHEE, R. J.; MELLING, J.; (1986) *Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. Infect Immun. 52*:356-363.

(280) THURNBULL, P. C. B.; (1999) *Definitive identificación or Bacillus anthracis-a review. J Appl Microbiol 87*: 237-240.

(281) TURNBULL, P. C.; LEPPLA, S. H.; BROSTER, M. G.; QUINN, C. P.; MELLING, J.; (1988) *Antibodies to anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. Med Microbiol Immunol. 177*:293-303.

(282) TURNBULL, P. C.; LINDEQUE, P. M.; LEROUX, J.; BENNETT, A. M.; PARKS, S. R.; (1998) *Airborne movement of anthrax spores from carcass sites in the Etosha National Park, Namibia.J Appl Microbiol. 84*: 667-76.

(283) TURNBULL, P. C. B.; BROSTER, M. G.; CARMAN, J. A.; MANCHEE, R. J.; MELLING, J.; (1986) *Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of carbunco toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. Infect Immun 52*.356-63.

(284) TURNBULL, P. C. B.; LEPPLA, S. H.; BROSTER, M. G. Y COLS; (1988) *Antibodies to anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective jmmunity. Med Microbiol Immunol* 177:293.

(285) TURNBULL, P. C. B.; QUIN, C. P.; HEWSON, P. Y COLS.; (1990) Protection conferred by microbially supplemented UK and purified PA vaccines. Salisbury Medical Bulletin 68(suppl):89.

(286) UCHIDA, I.; HORNUNG, J. M.; THORNE, C. B.; KLIMPEL, K. R.; LEPPLA, S. H.; (1993) *Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. J Bacteriol. 175*:5329-5338.

(287) VAN NESS, G. B.; (1972) *Ecology of anthrax. Science 172*:1303.

(288) VARUGHESE, M.; CHI, A.; TEIXEIRA, A. V.; NICHOLLS, P. J.; KEITH, J. M.; LEPPLA, S. H.;(1998) *Internalizaon of a Bacillus anthracis protective antigen cMyc fusion protein mediated by cell surface anti cMyc anbodies. Mol Med. 4*: 87-95.

(289) VARUGHESE, M.; TEIXEIRA, A. V.; LIU, S.; LEPPLA, S. H.; (1999) *Identitication of a receptor-binding región within domain 4 ofthe protective antigen component of anthrax toxin.lnfect.lmmun. 67*,1860-1865.

(290) VICK, J. A.; LINCOLL, R. E.; KLEIL, F. Y COLS.; (1968) Neurological and physiological responses of the primate to anthrax toxin. J Infect Dis 1l8:85.

(291) VIETRI, N. J.; MARRERO, R.; HOOVER, T.; WELKOS, S. L.; (1995) *Identification and characterization of a trans-activator involved in the regulation of encápsulation by Bacillus anthracis. Gene. 152*:1-9.

(292) VILAS-BOAS, G.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; LEMOS, M. V. F.; BOURGUET, D.; (2002) *Genetic differentiation between sympatric populations or Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis Appl. Environ. Microbiol 68*: 1414-1424.

(293) VITALE, G. Y COLS.; (1998) *Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine threonine phosphorylation of MAPKs in cultured Macropahges. Biochem Biophys Res. Comm. 248*; 706-711.

(294) VITALE, G.; BERNARDI, L.; NAPOLITANI, G.; MOCK, M.; MONTECUCCO, C.; (2000) *Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal toxin.352*; 739-745.

(295) WADE, N.; (1980) *Death at Sverdlovsk: A critical diagnosis. Science*.209:1501-1502.

(296) WALKER, D. H.; (1994) *Death at Sverdlovsk: what have we learned? Am J Pathol. 144*:1135-1141.

(297) WALKER, D. H.; YAMPOLSKA, L.; GRINBERG, L. M.; (1994) *Death at Sverdlovsk: What have we learned? Am J Pathol. 144*: 1135-1141.

(298) WANG, X. M.; MOCK, M.; RUYSSCHAERT, J. M.; CABIAUX, V.; (1996) *Secondary structure of anthrax lethal proteins and their interaction with large unilamellar vesicles (LUV): a Fourier-transform infrared spectroscopy approach. Biochemistry 35*:14939-14946.

(299) WANG, P.; GRANADOS, R. R.; (1997) *An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94*, 6977-698.

(300) WARD, N. W.; MCGANN, V. G.; HOGGE, A. L. JR.; HUFF, M. L.; KANODE, R. G. JR.; ROBERTS, E. O.; (1965) *Studies on anthrax infectións in immunized guinea pigs. J Infect Dis 115*: 59-67.

(301) WATTERS, J. W.; DEWAR, K.; LEHOCZKY, J.; BOYARTCHUK, V.; DIETRICH, W. F.; (2001) *Curr. Biol. J J.* 1503-1511.

(302) WEBER, D. J.; SICKBERTBENNETT, E.; GERGEN, M. F.; RUTALA, W. A.; (2003) Efficacy of selected hand hygiene agents used to remove Bacillus atrophaeus (a surrogate of Bacillus anthracis) from contaminated hands. JAMA. 289; 12747.

(303) WELKOS, S. L.; (1991) *Microb. Pathogen.* 10, 183-198.

(304) WILLIAMS, P.; WALLACE, D.; (1989) Unit 73: Army's Secret of Secrets. Ed Hodder and Stoughton.

(305) WELKOS, S. L.; BECKER, D.; FRIEDLANDER, A. F. Y COLS.; (1990) Pathogenesis and host resistaI)ce to Bacillus anthracis: A mouse model. Salisbury Medical Bulletin 68(suppl):49.

(306) WELKOS, S. L.; FRIEDLANDER, A. M., (1988) Comparative safety and efficacy against Baci/1us anthracis of protective antigen and live vaccinesin mice. Microb Pathog 5:127.

(307) WELKOS, S. L.; FRIEDLANDER, A. M., (1988) Pathogenesis and genetic control of resistance to the Sterne strain of Bacillus anthracis. Microb Pathog 4:53.

(308) WEST, J. T.; (2000) *Estacio W, Marquez-Magana L. Relative roles of the flatche P(A), P(D-3), and P(sigD) J, promoters in regulating motility and sjgD expression in Bad/1us subtilis. J. Bacteriol 182*.4841-4848.

(309) WHITFORD, H. W.; (1990) lncidence of anthrax in the USA: 1945-1988. Salisbury Medical Bulletin 68(suppl):5.

(310) WILLIAMS, J. L.; NOVIELLO, S. S.; GRIFFITH, K. S.; WURTZEL, H.; HAMBORSKY, J.; PERZ, J. F.; WILLIAMS, I. T.; HADLER, J. L.; SWERDLOW, D. L.; RIDZON, R.; (2002) *Anthrax postexposure prophylaxis in postal workers Connecticut 2001. Emerg Infect Dis. 8*: 113-37.

(311) WILLIAMS, P.; WALLACE, D.; (1989) Unit 731: Japan's secret Biological Warfare in World War II. New York, The Free Press.

(312) WILLIAMSON, E. D.; PERCIVAL, D. A.; FRITH, N. J. Y COLS.;(1990) Cell-mediated immune response to the toxins of anthrax. Salisbury Medical Bulletin 68(suppl);92.

(313) WRIGHT, G. G.; GREEN, T. W.; KANODE, R. G. JR.; (1954) *Studies on immunity in carbunco. V. Immunizing activity of alum-precipitated protective antigen. J Immunol 73*: 387-91.

(314) WRIGHT, G. G.; READ, P. W.; MANDELL, G. L.; (1988) *Lipopolysaccharide releases a priming substance from platelets that augments the oxidative response of polymorphonuclear neutrophils to chemotactic peptide. J Infect Dis.157*:690-696.

(315) ZAUCHA, G. M.; PITT, L. M.; ESTEP, J.; IVINS, B. E.; FRIEDLANDER, A. M.; (1998) *The pathology of experimental anthrax in rabbits exposed by inhalation and subcutaneous inoculation. Arch Pathol Lab Med. 122*: 982-92.

(316) ZEGERS, N. D.; KLUTER, E.; VANDERSTAP, H.; VANDURA, E.; VANDALEN, P.; SHAW, M.; BAILLIE, L.; (1999) *Expression of the protective antigen of Bacillus anthracis by Lactobacillus casei: towards the development of an oral Vaccine against anthrax. J Appl Microbiol. 87*: 309-14.

(317) ZILINSKAS, R. A.; (1997) Iraqs biological weapons. JAMA 278:418.

Componentes de la defensa química y biológica en operaciones militares

RENÉ PITA PITA
Capitán Farmacéutico
Profesor de la Escuela Militar de Defensa NBQ

1. INTRODUCCIÓN

Aunque hemos asistido al final de la Guerra Fría y a una disminución de la amenaza de una guerra nuclear a escala mundial, los albores del nuevo siglo en que vivimos presencian un creciente número de conflictos regionales y el empleo de medios asimétricos por parte de fuerzas no estatales y grupos terroristas (Sanz, 2004). Pese a los esfuerzos realizados en el control de armas, existen pruebas de que el desarrollo de armas nucleares, biológicas y químicas (NBQ), así como de sus medios de dispersión y diseminación, sigue proliferando (DIGENPOL, 2003; Pita, 2004). Asimismo, la globalización ha llevado a una amplia distribución por todo el mundo de industrias que utilizan materiales radiactivos, biológicos y químicos, incrementando la posibilidad de emisión de estos materiales al medio ambiente como resultado de una negligencia, un desastre natural, una acción deliberada o bien un daño colateral en el curso de operaciones militares (Pita, 2004).

La defensa NBQ en el marco de la Organización del Tratado del Atlántico Norte (OTAN) tiene como objetivo disuadir al enemigo de la utilización de armas NBQ y proteger a la Fuerza en el caso de que el ataque se produzca, permitiéndole llevar a cabo su misión y mantener su libertad de actuación. Para ello, la doctrina de defensa NBQ de la OTAN, recogida en la publicación aliada conjunta (AJP, Allied Joint Publication) número 3.8, agrupa la capacidad de defensa NBQ en cinco componentes:

(1) detección, identificación y monitorización; (2) alerta e información; (3) protección física; (4) gestión del riesgo; y (5) contramedidas y apoyo sanitario (OTAN, 2002a). Las bases para estos componentes se deben establecer previamente mediante el desarrollo de una adecuada doctrina, equipos, procedimientos e instrucción en defensa NBQ. En el presente trabajo se describen los componentes de la defensa NBQ de la OTAN aplicables a la defensa contra la utilización de armas químicas y biológicas, sin hacer mención de la defensa nuclear.

2. DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y MONITORIZACIÓN

El equipo y los procedimientos necesarios para detectar e identificar agentes químicos o biológicos de guerra deben estar preparados y ensayados previamente en los diferentes niveles de la amenaza, con el fin de que esa detección o identificación se lleve a cabo lo antes posible y las alertas y/o alarmas sean dadas de forma oportuna. Esto permitirá, también, adoptar las medidas de protección adecuadas del personal que pueda verse expuesto.

2.1. Detección

Los sistemas de detección de agentes químicos y biológicos de guerra pueden ser de tipo puntual, es decir, capaces de detectar el agente químico o biológico en el punto de contacto, o bien de tipo «stand-off», cuando detectan el agente a distancia. Se habla de detectores remotos cuando cualquiera de estos dos tipos de detectores es empleado a distancia de la Fuerza desplegada.

Los principales sistemas comercializados para la detección de agentes químicos de guerra se basan en reacciones enzimáticas, reacciones colorimétricas, espectrometría de movilidad iónica (IMS), fotometría de llama (FP), espectrometría de masas (MS), espectroscopia infrarroja (IR) y ondas acústicas superficiales (SAW). La espectroscopia IR que emplea la transformada de Fourier (FT-IR) es la principal técnica empleada para la detección «stand-off» de agentes químicos de guerra. Por su menor coste, los detectores basados en reacciones enzimáticas o colorimétricas son los principales detectores puntuales que forman parte del equipo de protección individual complementario de cada

combatiente. Los detectores portátiles de agentes químicos de guerra comercializados utilizan fundamentalmente técnicas de IMS y FP, como es el caso del CAM (Chemical Agent Monitor) y el AP2C, respectivamente, si bien ya han aparecido en el mercado los primeros detectores que utilizan la técnica SAW, basada en la modificación de la frecuencia de vibración de un cristal piezoeléctrico causada por la absorción de un determinado agente químico de guerra en un polímero que recubre dicho cristal piezoeléctrico. Desde hace relativamente poco tiempo también se han empezado a comercializar equipos de MS acoplados a cromatografía de gases (GC-MS) de tipo portátil, que incluyen espectros de agentes químicos de guerra en sus bases de datos.

Los detectores puntuales comercializados para agentes biológicos de guerra se limitan a ensayos de inmunoanálisis específicos para un determinado agente (figura 1), o bien a sistemas basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tipo portátil. Actualmente, se están investigando biosensores y biomarcadores para la detección de estos agentes. La detección «stand-off» de nubes, en las que puedan estar presentes agentes biológicos, tiene grandes limitaciones. Destaca el sistema LIDAR (Light Detection and Ranging o Laser Identification and Ranging) combinado con otros sistemas que permiten diferenciar nubes con agentes biológicos de guerra de otro tipo de nubes por la fluorescencia que emiten algunos componentes intracelulares (p. ej. triptófano, NADH y riboflavina) al absorber radiación ultravioleta. Lógicamente, se pueden producir falsos positivos en el caso de nubes de polen y de fertilizantes orgánicos, entre otras.

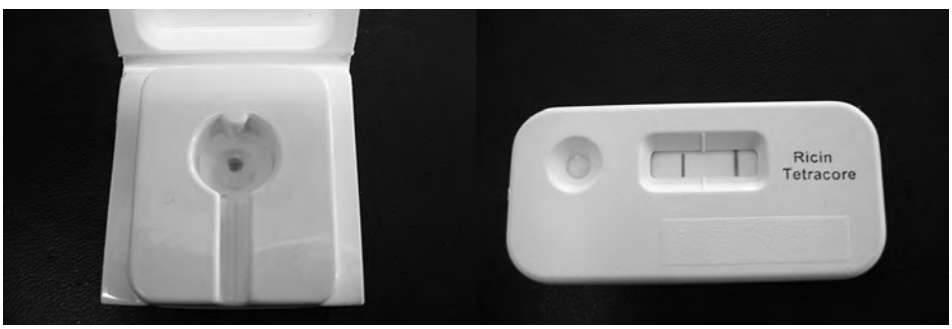


Figura 1. *Detectores de ricina basados en técnicas de inmunoanálisis. Se observa el resultado positivo tras analizar una muestra obtenida por el procedimiento de extracción, a partir de semillas de ricino, incluido en manuales relacionados con la red terrorista Al Qaeda (Pita y cols., 2004a).*

2.2. Identificación

Los detectores comerciales tienen el inconveniente de que pueden dar falsos positivos, es decir que pueden indicar la presencia de un agente que en realidad no está presente. La identificación, por el contrario, se diferencia de la detección en que permite conocer la identidad del agente químico o biológico (OTAN, 2000). Para la identificación de agentes químicos de guerra se emplean fundamentalmente tres técnicas analíticas que proporcionan información estructural, necesaria para la identificación inequívoca del agente: MS, IR y resonancia magnética nuclear (RMN o NMR). La identificación de agentes biológicos de guerra incluye técnicas inmunológicas, genéticas, cultivos *in vitro*, análisis bioquímicos y ensayos *in vivo* en modelos animales validados. La identificación del agente forma parte de las misiones SIBCA (Sampling and Identification of Biological and Chemical Agents), que incluyen también la recogida y el transporte, dentro de una cadena de custodia, de las muestras sospechosas de contener estos agentes. Los procedimientos técnicos para la toma de muestras e identificación vienen recogidos en la publicación aliada de ingeniería (AEP, Allied Engineering Publication) número 10 (OTAN, 2000). Es imprescindible que se cumpla la cadena de custodia hasta la llegada al laboratorio de referencia, para que la prueba del uso de estos agentes no pueda ser refutada, y que la toma de muestras la lleve a cabo personal previamente entrenado, con el fin de que haya unidad de doctrina, viabilidad, seguridad y responsabilidad en los procedimientos.

Se pueden distinguir tres tipos de identificación con varios grados de fiabilidad: (1) provisional, válida únicamente para necesidades inmediatas desde el punto de vista operativo; (2) confirmada, cuando es poco probable que cambie; y (3) inequívoca (forense), cuando está fuera de toda duda. El AEP-10 establece las condiciones que se deben cumplir para cada tipo de identificación en el caso de agentes químicos de guerra, toxinas de naturaleza no proteica, toxinas de naturaleza proteica y agentes biológicos de guerra. Así, por ejemplo, la identificación provisional de los agentes químicos de guerra requiere que se cumpla una de las siguientes condiciones: (1) en dos condiciones experimentales diferentes, el tiempo de retención cromatográfico del agente desconocido coincide con el tiempo de retención del agente en cuestión; (2) trabajando con un sistema de detección específico, el tiempo de retención cromatográfico

del agente desconocido coincide con el tiempo de retención del agente en cuestión. La identificación confirmada requiere que se cumpla una de las siguientes condiciones: (1) el espectro completo del agente desconocido, adquirido mediante una técnica espectrométrica (MS, IR o RMN) coincide con el del correspondiente agente en cuestión, almacenado en una base de datos; (2) el tiempo de retención cromatográfico del agente desconocido coincide con el tiempo de retención del agente en cuestión, cuando se trabaja con espectrometría de masas, en modo SIM (Single Ion Monitoring), con un mínimo de tres iones. La identificación inequívoca de agentes químicos de guerra requiere que se cumpla la condición de que el tiempo de retención cromatográfico y los espectros del agente desconocido, obtenidos mediante dos técnicas espectrométricas diferentes (MS, IR o RMN), coincidan con los obtenidos, trabajando en idénticas condiciones experimentales, con los de un patrón de referencia auténtico del agente en cuestión. Además, en espectrometría de masas, si el ión molecular no está presente, deberá confirmarse el peso molecular mediante un nuevo análisis, empleando, por ejemplo, espectrometría de masas con ionización química.

2.3. Monitorización

La monitorización es el proceso continuo o periódico para determinar si un riesgo químico o biológico está presente. Esto se debe a que los riesgos y persistencia de los agentes químicos y biológicos pueden estar afectados significativamente por factores como la meteorología, el tipo de terreno y la persistencia intrínseca de cada agente. La monitorización de superficie permitirá también validar los procesos de descontaminación.

2.4. Vehículos de reconocimiento y laboratorios desplegables móviles

El Ejército de Tierra de España dispone de vehículos blindados BMR (Blindado Medio sobre Ruedas) 600 que han sido modificados para convertirlos en vehículos de reconocimiento de áreas contaminadas (VRAC) (figura 2). El equipamiento del VRAC español incluye:

- un GC-MS con una base de datos que contiene más de 200.000 espectros de sustancias químicas
- un detector FT-IR «stand-off» con un alcance de hasta 5 km
- dos detectores (interior y exterior) de agentes químicos de guerra basados en la técnica IMS
- un muestreador-concentrador de aerosoles
- un sistema PCR portátil para la detección de agentes biológicos de guerra
- varios equipos de toma de muestras que permiten realizar esta misión sin que la tripulación tenga que salir al exterior
- una estación meteorológica
- un sistema de señalización de áreas contaminadas
- un filtro NBQ que impide el paso de aire contaminado y un sistema de sobrepresión en el interior del vehículo que lo hace estanco, de manera que la tripulación no necesita utilizar EPI.

FIGURA 2. *Vehículo de reconocimiento de áreas contaminadas (VRAC) del Ejército de Tierra.*

Dada la limitación de incorporar en los vehículos de reconocimiento equipos que utilicen otro tipo de técnicas y, sobre todo, la imposibilidad de preparar las muestras (extracciones, derivatización, etc.) en su interior para su posterior análisis, los distintos países de la OTAN, entre ellos España, están desarrollando laboratorios analíticos que puedan ser desplegados en un área de operaciones.

3. ALERTA E INFORMACIÓN

La alerta e información es el proceso por el cual los informes de incidentes con agentes químicos o biológicos son transmitidos a través de la cadena de mando, de manera que las Unidades afectadas puedan ser alertadas de los riesgos existentes. El proceso debe ser coordinado por una estructura jerárquica que permita que a todos los niveles se pueda valorar el impacto del incidente en sus planes y decisiones, siempre sobre la base de una información oportuna, precisa y evaluada. Los procedimientos de alerta e información NBQ de la OTAN vienen recogidos en la publicación aliada de temas tácticos (ATP, Allied Tactical Publication) número 45 y permiten informar de todos los incidentes químicos y biológicos, predecir y alertar de las áreas de riesgo resultantes de ese incidente y evaluar la información, de tal manera que se pueda hacer una valoración de su influencia en las operaciones e intercambiar información con las autoridades civiles y militares (OTAN, 1999a).

Actualmente, se tienden a utilizar sistemas de alerta e información informatizados que permiten que la información del incidente, la predicción de las áreas contaminadas y la alerta de las Unidades en las áreas de riesgo se realice de forma automatizada (OTAN, 1999b). En el Ejército de Tierra el software SIMACET (Sistema de Información para Mando y Control del Ejército de Tierra) incluye un módulo denominado NBC-PRE (Nuclear, Biological and Chemical Predictions) que realiza todas estas tareas de forma automática.

4. PROTECCIÓN FÍSICA

La protección individual y colectiva frente a agentes químicos y biológicos tiene el inconveniente de que puede restringir la libertad de operatividad del personal implicado directamente en los incidentes. Por este

motivo es necesario previamente realizar una evaluación del riesgo que permita adoptar el nivel apropiado de protección física, basándose en factores como la localización del personal, las condiciones meteorológicas y la naturaleza del trabajo físico que desempeñará ese personal.

4.1. Protección individual

El equipo de protección individual (EPI) incluye un sistema de protección respiratorio frente a la inhalación del agente y un traje de protección frente al contacto de la piel con el agente, ya sea en forma de vapor o en forma líquida. Además, el componente de protección física incluye una serie de materiales complementarios, como equipos de descontaminación y de detección, y material sanitario, como autoinyectores con antídotos frente a las intoxicaciones por agentes neurotóxicos de guerra (figura 3).

FIGURA 3. *Autoinyector con antídotos para el tratamiento de intoxicaciones por agentes neurotóxicos de guerra fabricado por el Servicio Farmacéutico de la Defensa.*

Los cartuchos filtrantes de las máscaras NBQ (figura 4) contienen un primer filtro HEPA que impide el paso de partículas menores de 0,06 µm. Este filtro evita el paso de agentes biológicos de guerra y el de aquellos agentes químicos de guerra que se encuentren en estado sólido a temperatura ambiente (p. ej. BZ). Si bien algunos agentes biológicos presentan tamaños inferiores a 0,06 µm y, por lo tanto, serían capaces de atravesar ese filtro, es preciso indicar que, cuando se utilizan los agentes biológicos como arma, es necesario obtener aerosoles con diámetros aerodinámicos de masa media (MMAD) de 1 µm aproximadamente, que son los adecuados para su depósito en las vías bajas del tracto respiratorio y para que el aerosol se mantenga suspendido en el aire durante largos períodos de tiempo (Pita y cols., 2004b). El segundo filtro es el de carbón activado, capaz de adsorber las moléculas gaseosas de los agentes químicos de guerra del tipo de los neurotóxicos, vesicantes y neumotóxicos. Este carbón activado lleva un tratamiento con sales de cromo o cobre que permiten que el filtro impida también el paso de los agentes cianogénicos. De esta manera el cartucho filtrante impide el paso de todo el espectro de agentes químicos de guerra. Hay que tener en cuenta que estos cartuchos filtrantes tienen una eficacia limitada frente a otras sustancias químicas, que no son adsorbidas por el carbón activado, y no deben ser utilizados en incidentes con productos químicos industriales tóxicos (TIC, Toxic Industrial Chemicals). Tampoco se deben utilizar cuando la concentración de oxígeno en el aire es inferior al 19-19,5%. En estos casos, se debe recurrir a equipos de respiración autónomos (SCBA, Self-Contained Breathing Apparatus).

FIGURA 4. *Izda.: máscara NBQ (modelo M6-87) utilizada por las Fuerzas Armadas de España. Dcha.: corte transversal de un cartucho filtrante en el que se observa el filtro HEPA en la parte inferior y el filtro de carbón activado en la parte superior.*

El uniforme de combate con protección NBQ impide el paso de agentes químicos hidrosolubles y de los agentes químicos o biológicos que se dispersan o diseminan en medios acuosos gracias a una cubierta de silicona impermeable a soluciones acuosas. Los agentes químicos liposolubles y los agentes químicos o biológicos que se dispersan o diseminan en medios oleosos son frenados por una cubierta de silicona fluorocarbonada. Finalmente, en la capa más interna del tejido, se encuentra un recubrimiento de carbón activado que impide el paso de las moléculas gaseosas de los agentes químicos de guerra.

4.2. Protección colectiva (COLPRO, Collective Protection)

Los COLPRO NBQ permiten proteger a grupos de individuos en un ambiente NBQ, de manera que puedan disminuir su nivel de protección individual. El propósito de los sistemas COLPRO en el ámbito militar es el de asegurar el continuo desarrollo de las funciones operativas en presencia de riesgos NBQ o el de proporcionar descanso y recuperación al personal implicado, ya que las instalaciones COLPRO ofrecen un medio de contrarrestar los efectos físicos y psicológicos que resultan del uso prolongado del EPI. Los COLPRO pueden ser: (1) fijos, cuando los sistemas están integrados en instalaciones estáticas; (2) móviles, cuando están integrados en plataformas terrestres, marítimas o aéreas y pueden ser incluso capaces de operar en movimiento o de permitir la entrada y salida en ambiente NBQ (p.ej. la ciudadela de los barcos); y (3) transportables, cuando pueden ser desplegados en el área de operaciones. Una de las principales limitaciones de los COLPRO es que pueden no ser eficaces en ambientes con altas concentraciones de TIC que desplacen el oxígeno, proporcionando únicamente una protección limitada.

5. GESTIÓN DEL RIESGO

La gestión del riesgo está basada en los principios de la toma de precauciones antes del incidente y en el control de la contaminación, una vez que éste se ha producido. Cuando el personal o su equipo, vehículos o repuestos son contaminados puede ser necesario permanecer con el EPI durante cierto período de tiempo, lo cual degrada el desarrollo de las ta-

reas de este personal. La principal forma de obviar esta dificultad consiste en evitar entrar en contacto con la contaminación y, si éste se produce, proceder a la descontaminación tan rápidamente como otras prioridades operativas lo permitan. Las medidas para la gestión del riesgo necesitan formar parte integrante de todo el planeamiento operacional del personal con riesgo de verse implicado o de intervenir en un incidente con agentes químicos o biológicos y, en la medida de lo posible, deberían ser ensayadas con antelación.

Las precauciones antes de un incidente en una operación militar incluyen el uso de cubiertas (p.ej. abrigos protegidos y la ciudadela de los barcos, entre otros), el camuflaje, la ocultación, la dispersión, el pre-humedecimiento de los barcos y la redundancia. Una vez que se ha producido un incidente con agentes químicos o biológicos la medida de control de la contaminación más efectiva es la de evitar la contaminación mediante la señalización de las áreas contaminadas. El acuerdo de normalización (STANAG, Standard Agreement) de la OTAN número 2002 establece los tipos de señales para marcar las áreas contaminadas en función del agente presente (OTAN, 2002b). Si estas medidas no son efectivas, entonces será necesario llevar a cabo la descontaminación.

5.1. Descontaminación

La descontaminación es el proceso de absorción, destrucción o neutralización que hace inocuo o elimina los agentes químicos o biológicos en personas, objetos o áreas contaminadas. La descontaminación puede ser pasiva o activa, reflejando la urgencia de la situación operacional. La pasiva se define como la descontaminación efectuada por los procesos naturales, sin la intervención humana o mecánica. Algunas veces también se le llama descontaminación natural o climática, ya que incluye la acción de la luz solar, las altas temperaturas, la lluvia y el viento. Por el contrario, la descontaminación activa supone el empleo de procesos químicos y/o mecánicos para eliminar o neutralizar los agentes químicos o biológicos.

La doctrina de defensa NBQ de la OTAN describe cuatro tipos de descontaminación: inmediata, operativa, completa y acreditada. La descontaminación inmediata es la que lleva a cabo la propia persona una vez que es

contaminada, normalmente mediante el material incluido en su equipo individual complementario. La descontaminación operativa la lleva a cabo el individuo y/o una Unidad con medios de descontaminación, restringiéndose a partes específicas del equipo, material o áreas de trabajo que sean esenciales, con el fin de minimizar los riesgos por contacto o transferencia y poder continuar la labor que está realizando. La descontaminación completa es la realizada por una Unidad especializada, con el fin de reducir la contaminación del personal, equipo, material y/o áreas de trabajo, y así permitir minimizar o eliminar la necesidad de utilización del EPI. Por último, la acreditada o certificada se refiere a la descontaminación de equipo y/o personal militar que se traslada desde un área de operaciones, permitiéndole utilizar, sin restricciones, medios de transporte, mantenimiento o empleo.

La descontaminación se debe llevar a cabo tan pronto como sea posible, de manera que se minimice la absorción del agente en la superficie de los distintos materiales y el proceso sea más efectivo. Esto permitirá reducir el tiempo y el esfuerzo necesario, así como rebajar los niveles de protección individual. Si los medios se ven desbordados, será necesario establecer prioridades, dado que los procedimientos de descontaminación demandan grandes cantidades de recursos y de tiempo. En el caso de la descontaminación de bajas, el personal sanitario que realiza la primera clasificación de bajas (triage), antes del paso a la estación de descontaminación, tendrá que tener en cuenta no solamente la urgencia de tratamiento médico sino la urgencia de descontaminación de esas bajas.

6. CONTRAMEDIDAS Y APOYO SANITARIO

La doctrina NBQ incluye cuatro subcomponentes a este nivel: (1) profilaxis y pre-tratamiento; (2) contramedidas sanitarias; (3) tratamiento de bajas en ambiente NBQ; y (4) evacuación de bajas en ambiente NBQ.

6.1. Profilaxis y pre-tratamiento

En función de la amenaza puede ser necesario que el personal de mayor riesgo de exposición al agente necesite iniciar la profilaxis o ser inmunizado. Además, en el caso de los agentes neurotóxicos de guerra, debe valorarse la necesidad de iniciar el pre-tratamiento con bromuro de piridostigmina.

6.2. Contramedidas sanitarias

Este subcomponente incluye la escrupulosa aplicación de las medidas higiénicas, la vacunación post-exposición, el tratamiento con antibióticos o antivirales, el tratamiento antidótico y la restricción de movimiento (ROM, Restriction Of Movement) del personal que pueda estar afectado por agentes biológicos transmisibles.

6.3. Tratamiento de bajas en ambiente NBQ

En operaciones militares se plantea la necesidad de que el segundo y el tercer escalón operacional de asistencia sanitaria dispongan de COLPRO. En el segundo escalón es donde se realiza la estabilización y cirugía de urgencia y vanguardia e incluye los puestos de clasificación (PCLA) y los equipos de cirugía avanzados (ECA), mientras que en el tercer escalón se lleva a cabo el tratamiento de las urgencias absolutas en los hospitales de campaña.

6.4. Evacuación de bajas en ambiente NBQ

Las bajas por agentes químicos y biológicos de guerra deben ser previamente descontaminadas para evitar la contaminación secundaria del personal sanitario que las va a tratar (figura 5). Las estaciones de descontaminación de bajas deben disponer de dos líneas claramente diferenciadas, una para bajas en camilla y otra para bajas ambulatorias. En un ambiente NBQ puede ser también necesario evacuar a las bajas en sacos especiales con protección frente a este tipo de agentes.

FIGURA 5. *Estación de descontaminación de bajas NBQ de la Unidad de Apoyo Logístico Sanitario (UALSAN) del Ejército de Tierra.*

7. CONCLUSIÓN

Como se ha demostrado en las lecciones aprendidas tras los atentados con sarín en las ciudades de Matsumoto y Tokio (Japón) en 1994 y 1995, respectivamente, los cinco componentes descritos son perfectamente adaptables al ámbito civil (Pita, 2003). No en vano, la doctrina de defensa NBQ de la OTAN recoge las lecciones aprendidas por naciones que en su día padecieron los efectos reales de los ataques con este tipo de armas. El desarrollo de una doctrina que tenga en cuenta estos cinco componentes, así como una adecuada instrucción y adiestramiento, que no dé pie a la improvisación, permitirá minimizar las consecuencias de un ataque con este armamento.

BIBLIOGRAFÍA

(1) DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA DE DEFENSA (DIGENPOL) (2003). *España y el control de armamento. Madrid: Ministerio de Defensa.* Pp. 41-68.

(2) ORGANIZACIÓN DEL TRATADO DEL ATLÁNTICO NORTE (OTAN) (2002a). Allied joint doctrine for NBC defence. AJP-3.8. STANAG 2451, 3rd edition.

(3) ORGANIZACIÓN DEL TRATADO DEL ATLÁNTICO NORTE (OTAN) (2000). NATO handbook for sampling and identification of biological and chemical agents. AEP-10. Volume 1: procedures and techniques, 5th edition. STANAG 4359.

(4) ORGANIZACIÓN DEL TRATADO DEL ATLÁNTICO NORTE (OTAN) (1999a). Reporting nuclear detonations, biological and chemical attacks, and predicting and warning of associated hazards and hazard areas. ATP-45 (B). STANAG 2103, 8th edition.

(5) ORGANIZACIÓN DEL TRATADO DEL ATLÁNTICO NORTE (OTAN) (1999b). Programmer´s manual for reporting nuclear detonations, biological and chemical attacks, and predicting and warning of associated hazards and hazard areas. AEP-45. STANAG 2497.

(6) ORGANIZACIÓN DEL TRATADO DEL ATLÁNTICO NORTE (OTAN) (2002b). Warning signs for the marking of nuclear, biological and chemical contaminations. STANAG 2002, 9th edition.

(7) PITA, R. (2004). *Armas de destrucción masiva: la amenaza química. En: Secretaría General Técnica del Ministerio de Defensa, editor. Un nuevo concepto de la defensa europea. Madrid: Ministerio de Defensa.* Pp. 57-73.

(8) PITA, R., DOMINGO, J., AIZPURUA, C., GONZÁLEZ, S., CIQUE, A., SOPESEN, J.L., GIL, M., JIMÉNEZ, M.V., YBARRA, C., CABRIA, J.C. Y ANADÓN, A. (2004a). *Extracción de ricina por procedimientos incluidos en publicaciones paramilitares y manuales relacionados con la red terrorista Al Qaeda. Med. Mil. (Esp) 60.* En prensa.

(9) PITA, R., ANADÓN, A. Y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2004b*). Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. Rev. Toxicol. 21:* 51-63.

(10) PITA, R. (2003). *La sanidad militar y civil ante la amenaza química y biológica después del 11 de septiembre de 2001. Med. Mil. (Esp) 59*: 29-30.

(11) SANZ, F. (2004). *Los conflictos asimétricos. En: Secretaría General Técnica del Ministerio de Defensa, editor. Un nuevo concepto de la defensa europea. Madrid: Ministerio de Defensa.* Pp. 45-54.