

Microbis per occir i guarir

Escrit per:

Mercè Berlanga¹ i Ricard Guerrero²

¹ Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries
de la Universitat de Barcelona

² Departament de Microbiologia de la Universitat de Barcelona

Una *metzina* o *verí* és tota substància que, introduïda en l'organisme animal, produeix la mort o un efecte morbós. Un verí produït per un organisme rep el nom de *toxina*. Els microorganismes fabriquen toxines per adquirir aliment, defensar-se contra la predació, infectar hostes potencials, etc. Però el més probable és que, a més, tinguin altres funcions desconegudes importants per a la fisiologia dels organismes productors. Possiblement, les toxines bacterianes van evolucionar molt abans de l'aparició dels organismes eucariotes multicel·lulars, que actualment constitueixen la principal diana d'acció d'aquestes toxines.

Els humans han utilitzat des de fa molt de temps verins i toxines amb finalitats diferents, com ara caçar i defensar el territori (puntes de fletxes enverinades amb curare, substància extreta de la planta *Strychnos toxifera*), eliminar persones rellevants (Sòcrates, amb cicuta, produïda per la planta *Conium maculatum*), o resoldre ràpidament enuigs crematístics o familiars (com diuen que va passar amb l'emperador romà Claudi, amb un àpat amb el bolet *Amanita phalloides*). Però els verins també tenen efectes beneficiosos, en dosis molt petites. El curare s'ha utilitzat per tractar convulsions i espasmes (bloca la conducció nerviosa moto-

ra per inhibició de la captació de l'acetilcolina en les plaques neurotransmissores). La toxina botulínica, un terrible verí produït pel bacteri *Clostridium botulinum*, també té moltes aplicacions terapèutiques.

«Totes les substàncies són verins; no n'hi ha cap que no ho sigui. La dosi diferencia un verí d'una medicina»

(Theophrastus Philippus Aureolus Bombastus von Hohenheim, conegut com Paracels, 1493-1541)

Figura 1

La doble vessant del *Clostridium botulinum*: assassí o guaridor.



Un microbi amb mala (i merescuda) fama

El gènere *Clostridium* és un grup heterogeni de bacteris grampositius que tenen per característiques principals el fet de ser anaerobis estrictes (s'inhibeixen i moren en contacte amb l'oxigen) i formar endòspores termoresistents. Els clostridis es troben al sòl, als sediments d'aigües dolces o salades i a l'intestí dels animals, incloent-hi els éssers humans. Es considera que el gènere reuneix 120 espècies, 35 de les quals poden causar malalties als humans i a altres animals. Els clostridis patògens es caracteritzen pel fet de produir potents toxines extracel·lulars, que són les responsables dels símptomes clínics. Segons les malalties que produeixen, se'n poden distingir tres grups: clostridis neurotòxics (produeixen toxines que afecten el sistema nerviós, p. ex., *C. botulinum* i *C. tetani*), clostridis enterotòxics (toxines que afecten el tub digestiu, p. ex., *C. perfringens* i *C. difficile*) i clostridis histotòxics (toxines que causen necrosi en el lloc de la infecció, p. ex., *C. perfringens*). No obstant això, altres espècies també són importants des del punt de vista ambiental i industrial i, per tant, són molt beneficioses. Els clostridis s'han utilitzat per produir acetona, butanol, etanol, butirat, enzims (cel·lulases, amilases, substàncies que catalitzen biotransformacions esteroespecífiques, etc.), i per a la degradació anaeròbia de productes xenobiòtics, com ara compostos aromàtics i diferents herbicides.

El 1817, el metge i poeta alemany Justinus Kerner (1786-1862) va publicar la primera descripció clínica d'una malaltia paralitzant en 230 pacients. La malaltia, la va denominar *botulisme*, perquè l'enverinament es va produir per ingesta de salsitxes (*botulus*, en llatí). Kerner va creure que les salsitxes contaminades contenien alguna substància tòxica, com ara algun tipus de greix. El 1895, Emile P. van Ermengen (1851-1922), col·laborador de Robert Koch, va aïllar el bacteri anaerobi responsable de la malaltia. El bacteri es va denominar inicialment *Bacillus botulinus*, i posteriorment *Clostridium botulinum* (*kloster*, en grec, 'en forma de fus'), ja que l'endòspora és més ampla que el diàmetre cel·lular i dóna al bacteri forma de fus o, com s'ha dit posteriorment, de raqueta de tennis (**fig. 2**).



Figura 2
Clostridium botulinum.



Figura 3
Dibuix artístic d'una persona adulta que pateix botulisme en el què destaquen la ptosi (parpelles caigudes) i paràlisi facial.

Botulina: l'assassina

La toxina botulínica, o botulina, pot ser una de les set neurotoxines relacionades (A, B, C, D, E, F, i G) produïdes per diferents soques de *C. botulinum*. És un dels verins biològics coneguts més potents: un mil·ligram de toxina pot matar més d'un milió de conills porquins. De les set neurotoxines, almenys dues estan codificades per bacteriòfags específics del bacteri. La botulina és una proteïna que bloca l'alliberament del neurotransmissor acetilcolina per les membranes presinàptiques en el contacte de les neurones motores amb la unió neuromuscular. En no haver-hi acetilcolina lliure, no hi ha estimulació de les fibres musculars i es produeix una paràlisi muscular flàccida, amb la consegüent mort per asfíxia per fallida cardiorespiratòria (fig. 3).

Normalment una soca de *C. botulinum* només sintetitza una de les set toxines esmentades. Les toxines A, B, E i, menys freqüentment, F produeixen botulisme en els éssers humans, mentre que les toxines C i D provoquen botulisme en els animals. La botulina G és produïda per una soca bastant diferent d'altres de *C. botulinum* i es desconeix la possible implicació en el botulisme humà i animal. De fet, s'ha proposat considerar la soca com a una espècie diferent, *C. argentinense*, perquè només s'ha trobat en mostres de terra a l'Argentina. Recentment, s'ha vist que soques neurotoxigèniques de *C. butyricum* (que produeix la toxina E) i de *C. baratii* (que sintetitza la toxina F) també poden causar botulisme en els humans. La mortalitat en els humans és més gran amb la toxina A, seguida de la E, i, finalment, de la B. Aquest fet està relacionat amb el diferent grau d'afinitat de les toxines pel teixit neuronal.

La botulina entra a l'organisme generalment per ingestió d'aliments contaminats, típicament conserves que no s'han esterilitzat bé i que han mantingut condicions anaeròbies. El període d'incubació, un cop ingerida la toxina, és de 12 a 36 hores, i sovint els símptomes neurològics són precedits per nàusees, vòmits, dolor abdominal i diarrea. La recuperació és molt lenta, de setmanes a mesos, segons la gravetat. Durant les primeres dècades del segle xx, la taxa de mortalitat per botulisme era del 60-70 % dels intoxicats i actualment és del 3-5 %, si s'arriba a

temps. El tractament consisteix a administrar antitoxina (anticossos de la toxina), que pot detenir la progressió de la paràlisi. En casos més greus es requereix ventilació mecànica. És imprescindible començar el tractament al més aviat possible després de l'aparició dels símptomes (idealment, abans de 24 hores), ja que l'antitoxina només neutralitza les toxines que encara no s'han unit a les terminacions nervioses.

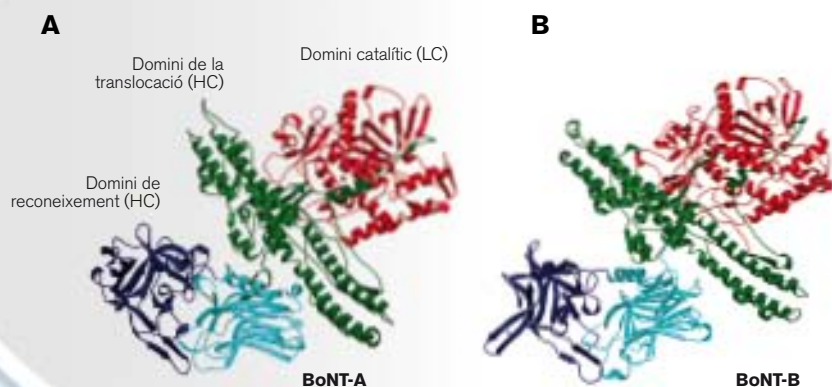
Per produir la neurotoxina, *Clostridium botulinum* fabrica inicialment un polipèptid de cadena simple de 150 kDa, el qual després s'escindeix en dues cadenes (cadena lleugera, LC, i cadena pesada, HC) unides per un pont disulfur. La LC té 50 kDa i actua com una endopeptidasa dependent de zinc. La HC conté dos dominis funcionals de 50 kDa cada un, el domini N-terminal i el domini C-terminal (fig. 4). El domini N-terminal forma un canal iònic a les membranes lipídiques. El domini C-terminal és el responsable de reconèixer i unir-se als gangliòsids i internalitzar la toxina en les neurones colinèrgiques, on finalment impedeix l'exocitosis de les vesícules d'acetilcolina. La dosi letal de la toxina botulina per injecció intravenosa és de 0,1-0,5 ng/kg, i, per ingestió oral, de 0,2-1 µg/kg. La toxina és termosensible i s'inactiva amb un tractament tèrmic de 85 °C durant cinc minuts.

Botox: la guaridora

Durant la Segona Guerra Mundial, l'Acadèmia Nacional de Ciències dels Estats Units va instal·lar uns laboratoris a Fort Detrick, Maryland,

Figura 4

(A) Estructura cristal·lina de la neurotoxina A de *Clostridium botulinum* (BoNT/A) i (B) de la neurotoxina B (BoNT/B), en què s'observen els tres dominis de la proteïna.



primats, i el 1981, en humans. L'aplicació de la toxina A en tractaments cosmètics, la va descobrir Jean Carruthers de manera accidental al Canadà, el 1987, quan tractava una pacient de blefarospasme (tancament i obertura continuada involuntària de les parpelles). Estaven injectant a la pacient la toxina botulínica tipus A prop dels ulls i, quan el líquid li va tocar el front, va notar que la pell començava a tenir un aspecte més jove, ja que les arrugues van desaparèixer gairebé totalment.

Figura 5
Productes comercialitzats Botox® (toxina A) i Dysport® (toxina A).



Les aplicacions terapèutiques de la toxina botulínica avui inclouen totes les afeccions que són conseqüència d'una hiperfunció o disfunció musculars. També en altres situacions clíniques, per interrompre funcions com ara la de les glàndules salivals, en la preparació d'un pacient per a una laringotomia completa. El 1989, l'organisme nord-americà Administració d'Aliments i Fàrmacs (Food and Drug Administration [FDA]) en va aprovar la utilització per al tractament de l'estrabisme, blefarospasme i espasmes hemifacials (tremolors involuntaris que contrauen diferents músculs d'una part del rostre).

Tanmateix, l'aplicació més coneguda és com a tractament cosmètic (fig.5). El 2002, la FDA en va aprovar la utilització amb finalitats cosmètiques, i el 2004 es va permetre aquest ús a Espanya. Hi ha quatre medicaments amb toxina botulínica autoritzats per l'Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris: Botox® (toxina A, Allergan, Inc., EUA), Dysport® (toxina A, Speywood, UK), NeuroBloc® (toxina B, Elan Pharmaceuticals, distribuït per la UE) i Vistabel® (en cirurgia estètica, el Botox rep el nom de Vistabel, però és exactament el mateix preparat que produeix Allergan). NeuroBloc només està indicat per al tractament de la distonia cervical (torticoli). Botox i Dysport estan indicats per a la resta de tractaments (taula 1).

destinats a la investigació de bacteris infecciosos perillosos i les seves toxines, els quals es podrien utilitzar com agents de guerra biològica. El 1946, Edward Schantz va aconseguir purificar la toxina A en grans quantitats. Uns quants anys més tard, el 1972, el president Richard Nixon va firmar un tractat internacional pel qual el Govern americà es comprometia a acabar les investigacions sobre microorganismes destinats a la guerra biològica. Fort Detrick va tancar aquell mateix any. El 1973, Alan Scott va aplicar la toxina A per al tractament no quirúrgic de l'estrabisme (desviació en l'alineació d'un ull respecte a l'altre) en

Botox es presenta en vials de 100 U en forma de toxina cristal·lina purificada. La preparació Dysport no és equivalent en les seves dosis, perquè la purificació es fa per un mètode diferent. Normalment, les dosis requerides de Dysport per a un mateix efecte són de dues a cinc vegades més grans que la de Botox. El Botox s'ha de conservar congelat i sense agitar, perquè la toxina pot inactivar-se. Un cop resuspensa amb solució salina

Taula 1

Utilitzacions terapèutiques de la toxina botulínica.

Oftalmologia	Otolaringologia
<p>Estrabisme (desviació en l'alineació d'un ull respecte a l'altre)</p> <p>Nistagme (moviment incontrolat dels ulls)</p> <p>Blefarospasme (tancament i obertura involuntària de les parpelles)</p> <p>Ptosi (caiguda de les parpelles)</p>	<p>Disfonia espasmòdica</p>
Neurologia	Gastroenterologia
<p>Distonies (contraccions involuntàries permanents de diferents músculs del cos)</p> <p>Espasmes hemifacials (tremolors involuntaris dels músculs d'una part del rostre)</p> <p>Tics</p> <p>Tremolors</p>	<p>Acalàsia (regurgitar els aliments per problemes de l'esòfag)</p> <p>Tremolor del paladar</p> <p>Descontrol de la contracció i relaxació de l' esfínter anal</p>
To muscular	Cosmètica i altres aplicacions
<p>Espasticitat (contracció permanent d'alguns músculs)</p> <p>Espasticitat de la bufeta de l'orina</p> <p>Bruixisme (serrar i fer cruixir les dents)</p> <p>Quequesa</p> <p>Mal de cap causat per la contracció dels músculs del front</p>	<p>Correcció de les arrugues facials</p> <p>Línies d'expressió</p> <p>Potes de gall</p> <p>Descontrol de l'esfínter urinari</p> <p>Hiperhidrosi (excés de sudoració)</p> <p>Sialorrea o ptialisme (excés de salivació)</p> <p>Rinitis/rinorrea</p> <p>Colze de tenista</p>

estèril a la concentració adient, es pot mantenir en refrigeració 15 dies. Si s'afegeix 1 mL de diluent, la concentració de Botox serà de 10 U per 0,1 mL. Normalment s'aplica un màxim de 400 U per visita i un màxim de 50 U per lloc, amb un volum màxim de 0,5 mL. La dosi letal mitjana en humans és de 3.000 U, i 1 U és la quantitat de toxina necessària per matar el 50 % de les poblacions de ratolins Swiss-Webster (que pesen 18-20 g) inoculades. Només s'han descrit uns quants casos d'intoxicació per Botox o Dysport, i sempre han estat conseqüència de l'aplicació per personal no qualificat, que ignorava les concentracions d'aplicació adequades.

«Messieurs, ce sont les microbes que auront le dernier mot»

El físic Erwin Schrödinger (1887-1961) va dir: «L'important no és veure el que encara ningú no ha vist, sinó pensar el que encara ningú no ha pensat sobre això que tothom veu.» Els progressos fets en les ciències microbiològiques els últims trenta anys, tant en camps bàsics com aplicats, han estat enormes. La investigació mè-

dica i farmacèutica està descobrint mitjançant microorganismes nous fàrmacs i noves maneres de produir-los o optimitzar-los, com també està utilitzant els mateixos microorganismes per tractar determinades malalties. S'estan utilitzant enzims produïts per bacteriòfags en el tractament de les pneumònies bacterianes, espores de clostridis en el tractament d'alguns càncers, salmonel·les o virus *ensinistrats* per combatre tumors específics, ja que al llarg de l'evolució han après a buscar el camí d'atac amb eficàcia. En un futur no gaire llunyà veurem el triomf sobre moltes malalties mitjançant microbis, que han estat els nostres flagells durant tota la història de la humanitat. No hem d'oblidar que fa més de 3.500 milions d'anys que els microbis són a la Terra, i en aquest llarg temps han descobert moltes estratègies adaptatives que a nosaltres ens costaria molt d'albirar. Després de 150 anys de lluita directa contra els agents patògens, en molts casos fallida, estem ja en el camí d'aprofitar els mecanismes pels quals els microbis causen malalties per aconseguir tot el contrari, defensar-nos dels seus atacs i guarir-nos. I

Per saber-ne més

- ARNON, S. S. [et al.] (2001). «Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management». *JAMA*, 285, p. 1059-1070.
- CHADDOCK, J. A.; MARKS, P. M. H. (2006). «Clostridial neurotoxins: structure-function led design of new therapeutics». *Cell. Mol. Life Sci.*, 63, p. 540-551.
- ERIC, S.; FELBER, D. O. (2006). «Botulinum in primary care medicine». *JAOA*, 106, p. 609-614.
- JOHNSON, E. A. (1999). «Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins». *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, p. 551-575.
- MINTON, N. P. (2003). «Clostridia in cancer therapy». *Nat. Rev. Microbiol.*, 1, p. 237-242.
- MONTECUCCO, C.; MOLGÓ, J. (2005). «Botulinum neurotoxins: revival of an old killer». *Curr. Opin. Pharm.*, 5, p. 274-279.