

Carbunco. Pasado y presente

Anthrax. Past and present

Bernagozzi JA*, Barragán JH, Anselmino F

Cátedra de Inmunología II. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

*Correo electrónico del autor: gberna@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El presente trabajo es una revisión bibliográfica que abarca el agente etiológico, sus principales características, mecanismos y factores que condicionan la patogenicidad, la patogenia y su utilización en la guerra bacteriológica y en el bioterrorismo a lo largo de la historia.

Palabras clave: *Bacillus anthracis*, factores de patogenicidad, toxinas, patogénesis

Abstract: The present work is a literature review that covers the etiologic agent and its main features, mechanisms and factors that determine the pathogenicity and the pathogeny. It also covers the use of anthrax in bacteriological warfare and bioterrorism throughout history.

Key words: *Bacillus anthracis*, pathogenic factors, toxins, pathogenicity

Introducción

El carbunco, carbunco bacteriano, carbón, grano malo o ántrax es una enfermedad conocida desde la antigüedad que afecta fundamentalmente a animales herbívoros, causando epizootias con grandes pérdidas económicas. Es, además, una zoonosis (Scorpio *et al.* 2006). El *Bacillus anthracis* (Koch 1876) ha sido utilizado desde hace años como arma biológica, dada su facilidad de cultivo, la perdurabilidad de las formas esporuladas y su alta capacidad infectante (Tournier *et al.* 2009). Los antecedentes como tal se remontan a ambas guerras mundiales. Por otra parte, los escapes producidos al medio ambiente en forma accidental, presumiblemente por deficiente manejo de las plantas productoras de estas armas biológicas, han causado grandes pérdidas de vidas humanas (Christopher *et al.* 1997).

A partir de la caída de las torres gemelas en Estados Unidos, en el año 2001, *Bacillus anthracis* ha recobrado protagonismo como microorganismo de elección para actos bioterroristas, superando, inclusive, a otros patógenos, como los virus Ebola o virus de la viruela (*small pox*), que requieren una mayor complejidad de cultivo, manejo y conservación (Riedel 2005).

El ántrax afecta a animales domésticos, salvajes y exóticos. Las especies afectadas incluyen equinos, vacunos, ovinos, caprinos, porcinos, hipopótamos, elefantes, leones, cebras y camélidos (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005). Generalmente las personas se contagian por contacto con animales infectados, utensilios o productos animales contaminados, presentando tres formas típicas de infección: cutánea, gastrointestinal e inhalatoria, siendo esta última la más peligrosa (Abramova *et al.* 1993; Iglesby *et al.* 2002; Mock y Fouet 2001).

Desde las postrimerías del siglo XIX existe una gran cantidad de trabajos sobre desarrollo de vacunas anticarbuncosas, observándose a partir del mismo momento de la implementación de la vacunación un descenso importante y paulatino de la tasa de infección (Scorpio 2006). Por otra parte, el desarrollo de las vacunas ha experimentado un progreso significativo desde aquella primera a base de células diseñada y elaborada por Louis Pasteur en 1881 (Geison 1995), pasando por la cepa pXO2 negativa desarrollada por Max Sterne en la década de 1930 (Sterne 1937), las vacunas a toxoide (Turnbull *et al.* 1988), las de filtrados de cultivo adsorbidos por hidróxido de aluminio en 1970 (BioThrax: anthrax vaccine adsorbed 2008), hasta las vacunas recombinantes del antígeno protector (PAr) disponibles, seguramente, en un futuro no lejano. Todos estos procedimientos produjeron un pronunciado refinamiento de las mismas, con un incremento considera-

ble en la seguridad y una disminución de reacciones adversas asociadas a la vacunación, sin disminuir la efectividad. La amenaza de desarrollo de cepas de *Bacillus anthracis* genéticamente modificadas, resistentes a antibióticos o a las vacunas existentes, hace necesario profundizar las investigaciones con el objetivo de encontrar nuevas técnicas que incluyan hibridación en sitios genómicos, proteómicos o en transposones con el fin de desarrollar nuevas vacunas que protejan contra infecciones producidas por variantes muy patógenas.

Historia

La enfermedad fue mencionada por Hipócrates al describir ciertas lesiones cutáneas de la piel y la designó con el nombre de anthrax debido a su aspecto (etimológicamente del griego anthrax: carbón) (Schwartz *et al.* 2009). Esta enfermedad era muy bien conocida en Europa encontrándose citas en la literatura que ubican la descripción entre los años 1491 y 1190 AC. Existen algunas referencias no tan precisas sobre la aparición de casos en China, coincidentes con la sintomatología de carbunco mucho más antiguas (3000 AC). La enfermedad está descrita en el Viejo Testamento (Exodus 9:3) como dos de las diez plagas (5: pestilencias y 6: granos o furúnculos) (Guichard *et al.* 2012).

Uno de los primeros incidentes bien documentados data del año 1500 AC cuando los egipcios describieron "la plaga del furúnculo" ("plague of boils") que afectaba al ganado del faraón (Holmes 2003). Hacia fines del siglo XV, John Bell encuentra la enfermedad en humanos cardadores de lana (History of anthrax through the age). Casimir Davaines, médico francés, describió por primera vez el agente etiológico al observarlo en la sangre de carneros infectados en el año 1850 (Geison 1995; Kauffman, Schaible 2005; Tournier *et al.* 2009). En 1876 Koch lo aisló en estado puro y lo clasificó, denominándolo *Bacillus anthracis* (Carter 1985; Davis *et al.* 1996; Geison 1995). Entre los años 1880 y 1881 se registró, por primera vez, el uso exitoso de una vacuna a base celular. En efecto, Jean-Joseph Henri Toussaint, William Smith Greenfield y Louis Pasteur en Pouilly le-Fort vacunaron, y desafiaron luego con una cepa patógena, a 24 carneros, 1 cabra y 6 vacas (Pasteur *et al.* 1880; Scorpio *et al.* 2006). En 1904, Oskar Bail identificó el factor protector, FP (del inglés, *protector antigen* - PA) en exudados de animales infectados (Bail 1904). Gladstone (1946) aisló el FP en filtrado de cultivos. En la década de 1950, Harry Smith y Keppie (1963) descubrieron la estructura completa de la toxina del *Bacillus anthracis*.

Si bien, como se mencionara previamente, el uso del bacilo como arma biológica data de la primera guerra mundial, en la última década ha cobrado

inusitada relevancia después de la destrucción de las torres gemelas en el año 2001 (Friedlander 2001b). Con posterioridad a ello se utilizaron esporos del bacilo aerolizados en sistemas de aire acondicionado, o contaminando correspondencia, dada la elevada patogenicidad y mortalidad de la forma inhalatoria, pasando la sintomatología prácticamente desapercibida y confundiendo la misma con estados gripales, que hace que cuando se instala el tratamiento si no se está prevenido sobre la posible causa, sea demasiado tarde, provocando una tasa importante de mortalidad/morbilidad. En Estados Unidos, luego del atentado contra las torres gemelas, el correo fue el medio utilizado, siendo responsable, por lo menos, de 22 casos confirmados de ántrax (11 cutáneos y 11 inhalatorios) incluyendo 5 defunciones, en 7 localidades (Jernigan 2001).

Con anterioridad, en 1979, se describieron 96 casos de ántrax en humanos, con un saldo de 68 muertos, debido a un escape accidental de esporos de un laboratorio militar en la localidad de Sverdlosk, en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (Abramova et al. 1993; Meselson et al. 1994). Sin embargo, la primera comunicación sobre el uso del *Bacillus anthracis* con fines de bioterrorismo data de 1993, cuando Aum Shinrikyo, del culto del fin del mundo, esparció esporos en Tokio, Japón, desde lo alto de un edificio. Aparentemente, no tuvo efectos deletéreos ya que la cepa utilizada era, probablemente, la cepa Sterne, variante atenuada vacunal (Keim et al. 2001; Takahashi et al. 2004).

Agente etiológico

El agente etiológico, *Bacillus anthracis*, pertenece al género *Bacillus*, constituido por bacilos grandes, Gram positivos, de alrededor de 1 a 1,5 µm de ancho por 3 a 10 µm de largo, con capacidad de formar esporos. Estos bacilos crecen de manera óptima en condiciones aeróbicas y no son exigentes desde el punto de vista metabólico, desarrollando perfectamente bien en medios comunes con una temperatura óptima de incubación de 37 °C, pudiendo hacerlo en un rango comprendido entre los 25 y 37 °C.

En tejidos provenientes de animales infectados pueden encontrarse en forma de bacilos aislados o formando cadenas cortas. Las colonias son grandes, rugosas, grisáceas y de bordes irregulares.

Los tejidos de los animales afectados, especialmente la sangre, contienen gran cantidad de bacilos y esporos que son liberados al exterior por hemorragias a través de las aberturas naturales, como asimismo por orina, saliva, vómitos, heces, sobre todo con melena, e incluso por leche. La incorrecta eliminación de los cadáveres (cuando permanecen en la superficie, son trasladados o enterrados en condi-

ciones precarias), por no seguir estrictas normas de bioseguridad, provocan una gran contaminación del suelo. Esto origina una alta concentración de esporos en los sitios donde la enfermedad es enzoótica, lo que constituye los denominados campos malditos. Se han descrito casos de contaminación del suelo a través del uso de fertilizantes, sobre todo elaborados a partir de harina de hueso, en la que los esporos sobreviven a los procesos de manufactura (FAO 2001). Sin embargo, la persistencia de los bacilos en el suelo está condicionada por los procesos biológicos que en él se desarrollan, afectando fundamentalmente a la forma vegetativa cuando todavía no ha esporulado. Sufren procesos de competición con las bacterias de la flora telúrica, especialmente con especies del género *Pseudomonas*. Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle (2005) mencionan la capacidad que poseen las aflatoxinas de inhibir el desarrollo de ciertas especies de bacterias del género *Bacillus*. Se ha demostrado que concentraciones de 10 µg/ml son capaces de inhibir el desarrollo de *B. brevis* mientras que concentraciones más altas (15 µg/ml) inhiben el desarrollo de *B. megaterium* y *B. anthracis*.

El suelo es el habitat natural del espora y principal fuente de contaminación del ganado, siendo el pH ideal superior a 6, ya que los muy ácidos no permiten la supervivencia de los mismos. También se ha encontrado el espora en suelos áridos y semiáridos de África, Asia y Sudamérica (Salle et al. 2006; Turnbull et al. 2002). Se han descrito casos de carbunco a mediados del siglo XX en Canadá, como consecuencia de la contaminación del suelo con efluentes provenientes de la industria del cuero.

La viabilidad de los esporos no es indefinida, pero una gran cantidad de trabajos demuestra una perdurabilidad apreciable. Pasteur, Roux y Chamberland encontraron formas viables en el suelo luego de 17 años de haber sido enterrado un animal afectado de carbunco (Pasteur et al. 1880). Merchant et al. (1961) citan la aparición de casos de carbunco luego de 25 años de haberse registrado casos en el lugar. Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle (2005) mencionan en su publicación el hallazgo de esporos viables en escobillones, algodón y papel de envolver entre 12 y 41 años después del contacto. Wilson et al. (1964) encontraron esporos viables en una botella con tierra seca luego de 60 años. En huesos provenientes de excavaciones arqueológicas realizadas en el Parque Nacional Kruger de la República de Sudáfrica, fueron encontrados esporos de una data aproximada de 200 años. El Dr. García Carrillo (comunicación personal), a cargo del área de carbunco, en el entonces Centro Panamericano de Zoonosis, mencionaba la estabilidad de esporos de la cepa Sterne 34 F2 en cultivos madres para elaboración de vacunas durante 11 años.

En general, el suelo es reservorio de esporos, desde donde se infectan los animales, siendo el ciclo más frecuente de transmisión animal-suelo-animales, aunque existen otras como a través de paja, estiércol, establos, pesebres y camas. No debe descartarse el contagio por la ingestión de carnes provenientes de animales enfermos o alimentos naturales o balanceados contaminados, sobre todo estos últimos, con harinas de carne o de hueso en su composición, provenientes de animales infectados. La mayor parte de las infecciones se produce por la ingestión o inhalación de esporos provenientes de pastos de terrenos contaminados, los que penetran por abrasiones de la piel y/o mucosas o a través del aparato respiratorio.

Los brotes son más frecuentes en verano, por el hecho de que los pastos son generalmente más cortos, ralos y duros debido a la sequedad del ambiente, y los animales al pastar rozan la tierra con el hocico, lo cual favorece la aparición de abrasiones en la barrera cutáneo-mucosa. Por otra parte, la sequedad ambiente, aumenta la presencia de esporos en el polvo.

Si bien hasta el momento la utilización de *Bacillus anthracis* en la guerra biológica y atentados bioterroristas no ha tenido una tasa significativa de afectados, varias proyecciones permiten caracterizar a este agente etiológico como de gran poder devastador y de alta mortalidad ante nuevos ataques, sobre todo ante la posibilidad de que las organizaciones bioterroristas obtengan cepas resistentes a las vacunas y/o antibióticos, lo que hará necesario la disponibilidad de una mayor cantidad de vacunas efectivas y seguras. La investigación está focalizada en la obtención de vacunas multivalentes con capacidad de neutralización en las diversas etapas del desarrollo de la enfermedad con la intención de minimizar la replicación del bacilo en los tejidos del hospedador y disminuir la capacidad de expresar moléculas tóxicas.

Susceptibilidad de las especies a la infección

Hay notables diferencias de susceptibilidad entre las distintas especies. La cabra es la más sensible y, por ello, es considerada animal centinela. Le siguen los óvidos, excepto el carnero de Argelia que es muy resistente, bóvidos y demás herbívoros (Blood *et al.* 1983). Entre los factores que modifican la susceptibilidad podemos mencionar la eficacia de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares neutrófilos, la presencia de sustancias bactericidas séricas y la efectividad del complemento, habiéndose observado que la deficiencia de la fracción C5 del mismo disminuye la resistencia a la enfermedad. Una dieta alimentaria carente de lisina (aminoácido requerido para una correcta fagocitosis), radiaciones, corticoides, estrés o modificaciones en las condiciones

del hábitat favorecen el desarrollo de la enfermedad. Basta recordar las experiencias de Pasteur que logró producir la enfermedad en las gallinas al sumergir una o ambas patas en agua fría, o en ranas cuya temperatura corporal se elevaba y mantenía a 36-38° C (Walker *et al.* 1967).

En el cerdo se han encontrado bacilos en los linfonódulos submaxilares y mesentéricos sin producción de enfermedad. Se debe puntualizar que, en esta especie, la enfermedad se caracteriza por una marcada tumefacción faríngea y cervical.

En zoológicos se han afectado elefantes, leones, leopardos, pumas y osos, entre otras especies. Los roedores suelen ser resistentes, destacándose el visón aleutiano, que no la padece. En ratas inoculadas con el bacilo, solo se afecta el 14% (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005).

Los perros y gatos son muy resistentes, sobre todo los adultos, pero una vez afectados suelen morir por edema laríngeo y lesiones asociadas del tracto digestivo. Las aves son muy resistentes, aunque su presencia se ha observado en avestruces y en patos, en heces de águila y en el buche del gorrión inglés. Las aves carroñeras pueden eliminar esporos a través de las heces, a pesar del ácido úrico presente en las mismas (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005). Los animales poiquilotermos, entre ellos los peces, son muy resistentes.

Variabilidad genética

La gran variabilidad genética de *B. anthracis* depende básicamente de las regiones denominadas VITA. Se conocen, como mínimo, diez serotipos, muchos genotipos y una gran cantidad de subgenotipos (Pavan *et al.* 2011; Read *et al.* 2002, 2003, 2005). Esta variabilidad genética permite identificar al bacilo actuante en un brote y realizar la trazabilidad o modo de diseminación del mismo. Fouet *et al.* (2002) observaron que 50 aislamientos provenientes de animales de Francia correspondían a 8 genotipos distintos, pertenecientes a dos racimos genéticos. El genotipo tipificado como B2 fue prevalente en el sur y el identificado como A1, solo fue hallado en el norte. Realizando el seguimiento del origen del bacilo se determinó que el brote procedía del sur de África. Smith *et al.*, en trabajos realizados en el año 1999, determinaron que las cepas aisladas procedentes del Parque Kruger de la República de Sudáfrica pertenecían a diferentes genotipos, lo que permitió inferir que se asentaron allí desde hace mucho tiempo. El subtipado molecular del *Bacillus anthracis* es muy importante en la determinación, diferenciación e identificación de las diversas cepas, lo que, entre otras ventajas, puede ayudar mucho a la identificación de la procedencia de los esporos utilizados por el bioterrorismo (Smith *et al.* 1999).

Factores asociados a la patogenicidad de *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis se caracteriza por su larga persistencia en el suelo, dada su capacidad de esporular que, si bien no es un factor de patogenicidad directo, está asociado a los procesos de permanencia en el ambiente y a la capacidad de infección (Scorpio et al. 2006). Posee dos factores de patogenicidad principales, ampliamente descritos desde hace años en la literatura: la cápsula, constituida por ácido poli- γ -glutámico (PGA), codificado por un plásmido denominado pXO2 y la toxina específica codificada por otro plásmido termosensible, denominado pXO1 (Pavan et al. 2011). Con posterioridad han sido descritos otros que pasaremos a detallar.

Forma de resistencia: espora

El espora constituye la forma de resistencia de las bacterias, presentando, como característica importante, una alta perdurabilidad en el medio ambiente. Cuando la forma vegetativa de *Bacillus anthracis* toma contacto con el aire, y en particular con el oxígeno, origina la formación de esporos, los que son los responsables de la supervivencia del patógeno por muchos años, soportando inclemencias climáticas y permitiendo la transmisión de la enfermedad a huéspedes susceptibles, incluyendo el hombre (Tournier et al. 2009). Por otra parte, algunos autores también mencionan el hallazgo de formas vegetativas del bacilo en ciertos tipos de suelos.

El espora esférico u oval (Fig. 1), que no deforma el bacilo, mide 0,8 a 1 μm y está formado por

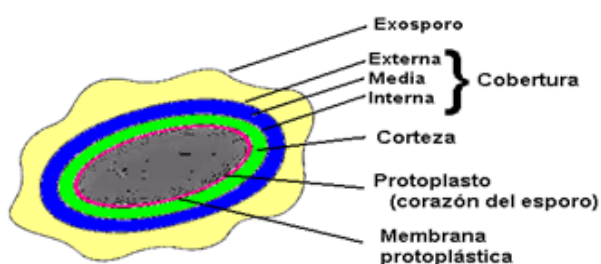


Figura 1. Corte de espora de *B. anthracis*. Protoplasto, corazón del espora o core. Contiene el DNA y todos los elementos necesarios en forma deshidratada con capacidad de dar nacimiento a la nueva célula. Corteza. Finas láminas compuestas de peptidoglicanos, que le dan al espora mucha resistencia a diversos agentes injuriantes. Cobertura. Estructura proteica con capacidad de tamizar y excluir el paso hacia la parte más profunda del espora de algunas enzimas y productos químicos. Exosporo. Estructura más externa del espora en forma de saco. *Bacillus subtilis* no posee esta capa.

varias capas, siendo la más externa el exosporo, seguida hacia el interior de una cobertura con tres capas o estamentos -externa, media e interna- luego la corteza, la membrana protoplástica y el protoplasto o corazón del espora (Moberly et al. 1966).

Cápsula

La cápsula cumple un importante rol en la patogenia de la enfermedad, ya que impide la fagocitosis, protegiendo al bacilo, además, de la acción lítica del complemento (Pavan et al. 2011). Es un factor esencial para la virulencia y responsable de la permanencia del bacilo en el organismo para iniciar su acción patógena.

Ultraestructuralmente, la cápsula del bacilo es una estructura compuesta enteramente por ácido poli-D-glutámico o poli-D- γ -glutamato, pero sólo en la configuración D. La síntesis de la cápsula es dependiente de cuatro proteínas (Cap A, B, C y E) codificadas en un operón denominado pXO2 (Pavan et al. 2011).

Otra proteína codificada por el operón *cap* es la denominada Cap D o Dep A. Entre las funciones específicas de esta proteína podemos mencionar la posibilidad de degradar la cápsula y provocar la liberación de fragmentos de bajo peso molecular, relacionados fuertemente con la virulencia. Además, aparentemente, Cap D es capaz de ligar covalentemente la cápsula a los peptidoglicanos presentes en la pared celular (Candela et al. 2005; Fouet 2009; Richter et al. 2009).

La cápsula está codificada por tres genes situados en el plásmido de 110-kilobases. Es un polímero de ácido poli-D-glutámico que determina la resistencia a la fagocitosis y a la lisis por proteínas catiónicas del suero (Keppie et al. 1963). Una L-aminoácido-transaminasa presente en el *Bacillus anthracis*, y también en el *B. subtilis*, forma L-alanina (y ácido α -cetoglutárico) a partir del ácido pirúvico y del ácido L-glutámico. Luego, por acción de la alaninracemasa, se transforma en D-alanina. Esta D-alanina, conjuntamente con el ácido α -cetoglutárico, a través del accionar de una D-amino-transaminasa, pasa a ácido D-glutamínico que al polimerizarse dará lugar a la formación de la cápsula.

Las propiedades antifagocíticas de la cápsula fueron descritas por Gruber y Futaki en 1907 y, en 1915, Bail las asoció con la virulencia del bacilo. Trabajos realizados por Keppie et al. en 1963 demostraron que cuando se lograba adicionar nuevamente cápsula a aquellas cepas a las cuales se les había eliminado genéticamente la posibilidad de producirlas e identificadas como cepas NP y cepa Sterne, éstas recuperaban la capacidad de inhibir la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares neutrófilos del coba-

yo. De acuerdo con esto, podemos concluir que los anticuerpos anticapsulares favorecen la fagocitosis.

La cápsula también produce el camuflaje del bacilo hacia el sistema inmune, dada la propiedad que tiene de adherir proteínas del hospedador. Durante la década de 1930, los investigadores demostraron que la cápsula es también capaz de unirse a proteínas básicas del suero, como la lisozima, con posibilidad, además, de desactivar péptidos catiónicos con propiedades antibacterianas (Makino *et al.* 1989, 2002; Schneerson *et al.* 2003). Se ha sugerido que los fragmentos de la cápsula pueden unirse a mediadores de la inmunidad innata actuando como inmunomoduladores. También puede unir el complemento, quizás en conjunción con una capa de proteína S, y provocar la inhibición de la actividad antracida normal del suero de caballo y de extractos leucocitarios de cobayos (Harvill *et al.* 2005; Makino *et al.* 2002; Zwartouw y Smith 1956).

Toxina

El esporo de *Bacillus anthracis* es el responsable de su persistencia en el ambiente y de la forma de ingreso al organismo. La cápsula presente en la fase vegetativa impide la eliminación del esporo por parte de las células específicas de la inmunidad innata permitiendo la multiplicación del bacilo. La toxina, finalmente producida por estas células, produce la muerte del individuo y la posterior liberación de los esporos al medio para reiniciar el ciclo (Glomski 2011).

En el año 1954, Smith y Keppie demostraron que el suero extraído de cobayos infectados con *Bacillus anthracis*, esterilizado mediante filtración, y por ende libre de bacterias, cuando se inocula a otro cobayo por vía endovenosa es capaz de producir la muerte del mismo. Este mismo filtrado cuando se inocula por vía subcutánea produce un pronunciado edema. Los mismos autores, más tarde, describieron la presencia de dos metabolitos con capacidades tóxicas diferentes cuando se unen a una proteína central que actúa a modo de receptor (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005; Leppla 1991; Leppla *et al.* 1990; Loving *et al.* 2009; Moayeri y Leppla 2001).

Bacillus anthracis produce una única toxina de estructura proteica codificada por un plásmido termosensible denominado pXO1. Está constituida por tres factores antigénicamente diferentes, codificados por genes plasmídicos distintos y denominados: el antígeno protector, PA, (*protector antigen*) o FP (*factor protector*), el factor edematógeno o FE o EF (*edema factor*) y el factor letal o FL o LF (*lethal factor*) (Moayeri *et al.* 2004; Pavan *et al.* 2011; Tournier *et al.* 2009).

El PA, en realidad, y contrariamente a lo que podemos suponer, no es un factor protector para el

hospedador, sino que precisamente actúa de manera inversa, ya que constituye la llave que permite el ingreso a las células de los otros dos factores cuando se copulan con él. La asociación de este PA con el FL da lugar a la formación de la denominada toxina letal, TL o LT (*lethal toxin*) y cuando se conjuga el PA con el FE se produce la denominada toxina edematógena o TE o ET (*edema toxin*). Esta unión se produce de manera aleatoria.

Una vez descubierta la toxina y establecida su estructura en la década del 60, la investigación entró en un impasse, resurgiendo en la década de los 80 con los avances en biología molecular, sobre todo en el clonado de toxinas y en la purificación de las mismas. En la década del 90, los descubrimientos en la genética de los gérmenes Gram positivos, posibilitó la creación de mutantes isogénicas, conteniendo genes productores de toxinas, surgiendo de los estudios llevados a cabo por Cataldi *et al.* (1990) y por Pezard *et al.* (1991) que el mayor factor de virulencia del *Bacillus anthracis* es la toxina letal (Bergman 2011).

El descubrimiento del mecanismo de muerte por la acción de la toxina sobre macrófagos, y también sobre células eucarióticas, pone en primer plano la función del PA como mecanismo principal de activación. Con posterioridad al ataque terrorista sufrido por Estados Unidos en el año 2001, los estudios sobre la TL crecieron exponencialmente, superando en una relación de 10 a 1 a los realizados sobre la TE. La función de esta toxina prácticamente permaneció ignorada durante dos décadas más.

La toxina del carbunco es similar a la de muchas especies de *Clostridium* (Barth *et al.* 2004). Estas toxinas están formadas por dos componentes esenciales: uno denominado A, con propiedades enzimáticas y de fijación a membranas celulares, y otro denominado B, que no se encuentra ligado al A en solución y que es secretado por la misma bacteria, pero que tiene la particularidad de unirse al A para ejercer su acción deletérea cuando éste se ha activado o modificado.

Los tres componentes de la toxina del ántrax son secretados en forma independiente. Se encuentran libres en las fases líquidas de la sangre, en la linfa y también en los tejidos. La activación sólo se produce cuando la fracción PA se une a su receptor específico en la superficie celular o bien, bajo ciertas condiciones, cuando puede ser clivado en la fase líquida en la que se encuentra (Bradley *et al.* 2001; Scobie *et al.* 2003). Una vez activado el PA une en forma aleatoria sólo uno de los otros dos factores iniciando la acción tóxica específica.

El factor edematógeno (FE) o factor I pesa 89 Kd y fue descubierto por Watson *et al.* (1947) en el edema, en el plasma y en los tejidos. Smith *et al.* (1953) lo extrajeron de sangre de cobayo en la etapa

terminal de la enfermedad (Leppla 1982; Leppla et al. 1996; Smith Keppie 1954). Es un adenilatociclasa calmodulin-Ca²⁺ dependiente, que origina en el citoplasma de la célula blanco la formación de AMPc inhibiendo la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), aumentando la permeabilidad capilar y dando lugar a la producción de edema (Pavan et al. 2011).

El FE disminuye la inmunidad por varios mecanismos, especialmente inhibiendo la fagocitosis. En 1911, Baily et al. encontraron que la toxina impide la destrucción de la bacteria por parte de los PMN. Este efecto se debe a la inhibición de la quimiotaxis de los PMN (Kashiba et al. 1959; Loving et al. 2009) con supresión del estallido respiratorio en estas células (O'Brien et al. 1985). También inhibe la síntesis de la IL-6 y el TNF (factor de necrosis tumoral) por los monocitos, determinando, consecuentemente, una disminución de la resistencia del hospedador.

El factor letal, FL o LF o factor III es el principal responsable de la virulencia. La molécula tiene una masa de 90 Kd. Es una proteasa dependiente del zinc, una metaloenzima, activable por mitógenos, con capacidad destructiva de los macrófagos (Moayeri y Leppla 2009). El FL tiene cuatro dominios funcionalmente activos situados correlativamente en la estructura primaria de la proteína, siendo el dominio I el que determina la unión al PA.

El antígeno protector, PA, o factor II, fue descubierto en 1904 por Bail. Tiene una masa de 83 Kd, con una estructura heptamérica. Es inmunogénico y los anticuerpos específicos tienen la capacidad de proteger a la rata y al cobayo previamente inmunizado con vacuna específica de la inoculación de esporos, pero si se les aplica a estos animales toxina preformada, no los protegen de la muerte.

Cuando Pasteur elaboró su primera vacuna y sometió los cultivos a temperaturas de 42,5 °C, eliminó unos 10 plásmidos (Wright et al. 1998) que son los que intervienen en la producción de PA y FL. Como consecuencia de ello, logró una disminución de la patogenicidad, creyendo erróneamente, en ese entonces, que se había producido una "atenuación" del bacilo. El tiempo de permanencia a esas temperaturas, denominadas "disgenésicas", permitía obtener cepas con una mayor o menor patogenicidad, siendo esta disminución concordante con la cantidad de formas vegetativas que perdían la posibilidad de producir toxinas.

Según los conceptos actuales, no se trataba de una verdadera atenuación de la cepa, sino que, en realidad, convivían formas virulentas con otras que habían perdido su capacidad tóxica. Según la relación entre ellas, se obtenían cepas más o menos "atenuadas" (Mikesell et al. 1983).

Otros factores de virulencia

Sideróforos: bacilibactina y petrobactina

Se considera que la biosíntesis de sideróforos es un requerimiento adicional para la virulencia. Los principales sideróforos son la bacilibactina, antes denominada antrabactina, y la petrobactina, antes antraquelina (Cendrowski et al. 2004). Algunas otras bacterias del género también producen bacilibactina, por lo que su sola presencia no es indicativa de patogenicidad. La petrobactina sería el único sideróforo necesario para la virulencia y el crecimiento de *B. anthracis* (Cendrowski et al. 2004). La petrobactina evade a la siderocalina del sistema inmune innato. En el caso de *B. anthracis*, la bacilibactina se une a la siderocalina o su complejo con hierro, pero no sucede lo mismo con la petrobactina, debido a que la diferencia del patrón de hidroxilación de ésta provoca un gran cambio conformacional que impide su inserción en el bolsillo de la siderocalina. Esta diferencia estructural en un sideróforo es inusual y permite a la petrobactina libre o unida al hierro escapar sigilosamente del sistema inmune innato del hospedador. Actualmente se está investigando sobre el bloqueo de esta petrobactina, con la intención de limitar o impedir la replicación en el momento de la infección (Cendrowski et al. 2004).

Capa S o S-layer (surface layer)

Es una capa que rodea la pared de las células vegetativas. Se especula que cumple una función importante en la interacción microorganismo/medio ambiente (Mesnage et al. 1997). Podría tratarse de una capa de protección frente a mecanismos de respuesta del hospedador o actuar como tamiz, permitiendo el ingreso a la bacteria solamente de ciertas moléculas de bajo peso molecular. También se cree que facilita la unión de la bacteria a moléculas presentes en la célula del hospedador, aumentando su adherencia a los macrófagos. Contiene dos proteínas sintetizadas secuencialmente SAP (*surface array protein*) y EA1 (*extractable antigen 1*) en forma independiente de la fase de crecimiento.

En los últimos años del siglo pasado se describió una adhesina BslA (*B. anthracis* S-layer protein A) que media la adherencia del bacilo en su forma vegetativa a la célula hospedadora y se propone como un factor de virulencia. Según experiencias realizadas en cobayos, contribuye a la patogenicidad, ya que exacerba la DL50 (Mesnage et al. 1997).

Lipoproteína MntA

Es una lipoproteína de membrana y se comporta como factor de virulencia. La delección de esta proteína provoca dificultades en el crecimiento, sensibilidad al estrés oxidativo y una disminución de la DL50 en

cobayos. Es fuertemente antigénica pero no induce protección (Gat *et al.* 2005).

Además de los factores ya mencionados, *Bacillus anthracis* posee varios genes capaces de codificar distintas proteínas con capacidad de contribuir a la virulencia o a la supervivencia en ratones y cobayos utilizados como modelos. Algunos de ellos son proteasas específicas, con capacidad de producir daño en el hospedador, contribuyendo directamente al proceso infeccioso. Otras enzimas que modifican la estructura de la pared celular pueden promover evasión de la respuesta inmune innata. Otros factores no son virulentos *per se*, pero pueden promover la germinación del esporo, facilitar la adquisición de nuevos nutrientes, aumentar la resistencia al estrés oxidativo o estallido respiratorio de las células endocíticas o coordinar una respuesta global de estrés durante la replicación en el hospedador (Chitlaru *et al.* 2007).

Sintetasa de óxido nítrico del *Bacillus anthracis*: baNOS

Los resultados surgidos en recientes experiencias realizadas con una cepa virulenta de *Bacillus anthracis*, pero delecionada en los genes responsables de la producción de toxina letal y edematógena, han demostrado que además de estos dos factores, la bacteria cuenta con otros mecanismos de patogenicidad (Heninger *et al.* 2006).

Heninger *et al.* 2006 demostraron que la TL y la TE no son necesarias para la patogenicidad de la cepa AMES luego de la inhalación de la misma (Chand *et al.* 2009; Levy *et al.* 2012; Lovchik *et al.* 2012).

La cepa AMES fue aislada de un animal muerto de carbunco en Sarita, Texas, en 1981 y utilizada por el bioterrorismo en el año 2001 para contaminar cartas y encomiendas dirigidas a senadores de EE.UU. De acuerdo con las experiencias realizadas, la toxicidad sería independiente de la TL y estaría determinada por la sintetasa de óxido nítrico que el bacilo posee, denominada baNOS (Crane *et al.* 2010; Sudhamsu y Crane 2009).

A semejanza de lo que sucede en las células de los mamíferos, el *B. anthracis* tiene la capacidad de generar óxido nítrico (ON) a partir de la arginina (Tizard 2009). En las células del hospedador el ON, y otras especies reactivas derivadas del *reactive oxygen species* (ROS), participan de numerosos eventos biológicos como glicólisis, crecimiento celular, señales de transducción, respuesta a estrés y mantenimiento de la homeostasis (Tizard 2009). El ON puede reaccionar con el ión superóxido (O_2^-) generando un compuesto agresivo y de alta toxicidad denominado peroxinitrito ($ONOO^-$) que juega un rol importante en los procesos inflamatorios. El peroxinitrito se forma durante

las sepsis, procesos inflamatorios, exotoxicidad e isquemias con reperfusión de los tejidos, condiciones todas en las que se incrementa la producción de ON y superóxido, participando en la expresión patológica de estos procesos (Pacher *et al.* 2007).

Los peroxinitritos participan en la nitratación de residuos de tirosina (3-nitrotirosina) dando como resultado la modulación de actividades catalíticas de señales celulares y de la reorganización del citoesqueleto (Chung *et al.* 2013; Habib y Ali 2011).

El baNOS juega un rol esencial en la virulencia del *Bacillus anthracis* en los primeros estadios de la enfermedad, involucrando interacciones de la bacteria con macrófagos y, posteriormente, afecta también a células no fagocíticas del hospedador. Uno de estos mecanismos confiere protección al *B. anthracis* contra moléculas reactivas producidas dentro del macrófago del hospedador, previniendo el daño que estas moléculas oxidativas pueden producir al DNA bacteriano (Crane *et al.* 2010; Shudamsu y Crane 2009).

Recientes informes dan cuenta que la S-nitrosilación de proteínas mitocondriales derivados del accionar del ON generado a partir de la ba-NOS, determina una reducción de la bioenergía del macrófago, ocasionando la muerte de esta célula. Se demostró, además, que las células bacterianas delecionadas en los genes con capacidad de producir este ba-NOS resultan muchísimo más atenuadas cuando se inoculan al ratón (Shatalin *et al.* 2008).

Patogénesis

Existen tres formas características de la enfermedad de acuerdo con la puerta de entrada. En la forma cutánea el ingreso de los esporos se produce a través de heridas o abrasiones en la piel o mucosas. En el hombre, es la más de común de todas. En la forma inhalatoria los esporos ingresan a través del aparato respiratorio y en la digestiva, lo hacen por ingestión de los mismos (Wu 2009). Luego de la introducción en el huésped susceptible, los esporos pueden pasar a la forma vegetativa y multiplicarse localmente o bien ser ingeridos por macrófagos residentes y transportados al linfonódulo local o regional donde se multiplican, para luego diseminarse a través de la sangre y linfa por todo el organismo.

El primer mecanismo de patogenicidad corresponde a la cápsula, que por sus propiedades antifagocíticas no permite la destrucción por endocitosis de la forma vegetativa y posibilita que el bacilo se multiplique fácilmente para luego liberar el segundo factor de patogenicidad, la toxina. *Bacillus anthracis* produce, una grave septicemia y, en conjunto con la posterior liberación de las toxinas edematógena y letal, provoca luego un shock séptico seguido de muerte.

Carbunco cutáneo

Los esporos son introducidos a través de la piel, generalmente en sitios donde la misma presenta soluciones de continuidad. En este sitio comienza la germinación del espora y produce necrosis localizada y edematización de los tejidos blandos. El paso de espora a forma germinativa demora alrededor de 1 a 3 horas y es necesario un daño tisular con disminución de la tensión de oxígeno para el inicio del proceso (Bischof 2007). Por otra parte, los macrófagos fagocitan esporos, los que son así trasladados a los linfonódulos locales y regionales. Durante el trayecto, el espora germina, pasa a forma vegetativa y en los linfonódulos provoca linfadenopatía y linfangitis. Como consecuencia de ello se produce septicemia y comienza la liberación de toxina. Sin embargo, un buen tratamiento antibiótico aplicado a tiempo puede detener el proceso de liberación de la toxina al eliminar las formas vegetativas.

Carbunco inhalatorio

El modelo clásico inhalatorio fue descrito por primera vez por Ross en la década de 1950 y, posteriormente, por Abramova (1993) y Hanna (1998). Los esporos ingresan al organismo por inhalación y dado su pequeño tamaño, menor a 5 µm, no puede ser eliminados por los mecanismos de defensa de la tráquea, los bronquios y los bronquiolos, alcanzando así los alvéolos. Allí ubicados, los esporos necesitan ser fagocitados por los macrófagos alveolares para iniciar la germinación, ya que la tensión de oxígeno del alvéolo impide la misma. También es factible que, a través de mecanismos de la inmunidad innata, como la proteína fijadora de manosa, puedan adosarse no sólo a macrófagos sino también a las células epiteliales del pulmón (Russel 2008). Dentro de las células los esporos encuentran las condiciones ideales de microanaerobiosis que permite que germinen y pasen a células vegetativas y luego abandonen las células para volcarse al sistema linfático. Pueden producir inflamación hemorrágica de los linfonódulos mediastinales (Abramova 1993) y provocar la formación de edema pulmonar por bloqueo linfático y derrames pleurales con presencia de *Bacillus anthracis* o fracciones del mismo (Guarner 2003). La neumonía focal, hemorrágica y necrotizante suele presentarse, pero de manera poco frecuente (Abramova 1993). La septicemia y la liberación de toxinas provocan la muerte del animal por shock séptico. También se han descrito meningitis hemorrágicas como consecuencia de la diseminación hematogena.

Entre las 6 y las 18 horas postinfección, los macrófagos que transportan los esporos se encuentran en el seno subcapsular del linfonódulo. Aquí es donde los esporos germinan y el bacilo prolifera, produciendo las cadenas que lo distinguen y difundiendo a través del sistema circulatorio. A las 24 horas se produce

una multiplicación masiva del bacilo, encontrándose formas vegetativas en sangre y más raramente en el pulmón.

Además del ingreso a través de los macrófagos pulmonares, existe la posibilidad de que los esporos puedan ingresar al organismo a través de la mucosa del tracto respiratorio superior, lo que se ha comprobado en roedores (Rayamajhi et al. 2012). No está claro si esto ocurre solo en roedores o también en otras especies.

La denominada BclA, *Bacillus colagen-like protein* de *B. anthracis*, simula el C1q del componente del complemento y tiene la propiedad de adherir los esporos al macrófago mediante los receptores de membrana específicos para fracciones del complemento (Bozue et al. 2007). BclA pesa 21 kD, tiene una secuencia rica en prolina, es similar al colágeno y es miembro de la familia del TNF, plegado en espiral. La selectividad sobre la célula parece ser importante para provocar la muerte del animal y para lograr una amplia multiplicación del bacilo, dando lugar a una mayor producción de esporos, lo que favorece una mayor diseminación de los mismos (Bozue et al. 2007). La proteína BclA es un antígeno inmunodominante del espora y, en consecuencia, es un futuro blanco para la elaboración de vacunas o para estrategias terapéuticas, lo que se conoce o denomina técnicamente como señuelo. Un hecho interesante es que los carbohidratos del BclA son también inmunogénicos.

El receptor específico de la fracción C3 del complemento, también denominado Mac-1 o CD11b/CD18, es considerado sitio de unión específico de los esporos de ántrax.

Carbunco digestivo

Se produce por la ingestión de esporos de *Bacillus anthracis* aunque hace poco más de una década se comprobó la posibilidad de infección por la ingesta de formas vegetativas presentes en animales. Aparentemente, la infección por formas vegetativas requiere la incorporación de una mayor cantidad de bacterias en comparación con la dosis mínima de esporos requeridos (Inglesby 2002). Se han determinado dos formas distintas de infección: una es la orofaríngea, a través de úlceras o soluciones de continuidad, con adenopatía regional y edema localizado. Otra es la denominada abdominal, en la que la puerta de entrada está localizada en la última porción del intestino delgado y el ciego. En estos casos se verifica la aparición de lesiones intestinales con edema de la pared, exudado en la cavidad abdominal y compromiso de los linfonódulos regionales. Finalmente se producen septicemia y muerte.

Rol de la toxina de *Bacillus anthracis* en la patogénesis

La toxina es una clásica A-B toxina. Ambas fracciones son secretadas por la célula bacteriana en forma separada y no se encuentran unidas (Collier y Young 2003; Duverger *et al.* 2006; Moayeri *et al.* 2004; Mock y Fouet 2001). El precursor PA pesa 83 kD, es secretado por el bacilo y debe ser activado proteolíticamente fuera de ella por tripsina, por una proteasa no identificada del suero o por proteasas ubicadas en la superficie celular (furinas o *furinas like*) que reconocen ciertas secuencias (164RKKR167) en el PA83kD.

La prolongada residencia del precursor PA en las superficies de las células optimiza la adhesión de FE y FL, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (Bradley *et al.* 2001; Collier y Young 2003; Duverger *et al.* 2006; Moayeri *et al.* 2004; Mock y Fouet 2001). Después de la proteólisis, el PA, ya sea en solución o adherido a la célula, pierde una fracción de unos 20 kD, dando lugar a la formación del PA63, modificando su estructura y generando una configuración compuesta por homoheptámeros hidrofóbicos. Esta nueva forma, cuando se encuentra en vesículas con un pH inferior a 7, adquiere la capacidad de formar canales en la membrana de la célula, los que son rápidamente obstruidos por bloqueadores específicos (Moayeri *et al.* 2011). El FL y el FE poseen, como terminal, un heptapéptido que se integra con el PA63, existiendo una competitividad entre ambos, que determina la unión en forma aleatoria de sólo uno de ellos. El PA activado puede asociarse con más de 3 moléculas de FL o FE. El proceso finaliza con la liberación en el citosol de las moléculas tóxicas neoformadas (Moayeri *et al.* 2011).

La estructura y los mecanismos de acción de la toxina han sido intensamente estudiados. Está compuesta, como ya hemos expresado, por tres factores denominados PA, FE, y FL (Loving *et al.* 2009). Estos tres factores son codificados por el plásmido, liberando, aparentemente, en primera instancia, el PA y luego los otros dos. El PA tiene la particularidad de unirse a tres tipos de receptores específicos localizados sobre la membrana celular del hospedador y denominados:

- TEM8, marcador tumoral del endotelio 8 o también denominado ANTXR1 (Bradley *et al.* 2001).

- CMG2, proteína 2 de la morfogénesis celular o también ANTXR2 (Liu *et al.* 2010; Scobie *et al.* 2003).

- Beta1 integrina, recientemente descrita, con propiedades de cumplir funciones de receptor (Ingram *et al.* 2013; Martchenko *et al.* 2010).

La unión del PA a estos receptores da origen a la activación del mismo, finalizando con la unión aleatoria a los otros factores y la traslocación al citosol para ejercer su acción específica.

Ambos marcadores, ANTXR1 y ANTXR2, son

expresados fuertemente en las células epiteliales de pulmón, piel e intestino, sitios de entrada del *B. anthracis* al organismo (Bonuccelli *et al.* 2005; Scobie *et al.* 2012; Xu *et al.* 2012).

Estos receptores cumplen otras funciones asociadas con la unión de proteínas componentes de la matriz extracelular y se especula, además, que intervienen en la regulación de la interacción con diversos componentes de la misma, incluyendo la adhesión, migración, distribución del colágeno y angiogénesis (Hotchkiss *et al.* 2012; Young *et al.* 2012).

La función de los receptores tiene un significado muy importante en el proceso patológico. Se ha observado que líneas celulares que han perdido sus receptores ANTXR1/2 resultan resistentes cuando se las enfrenta con toxina purificada, mientras que células que sobreexpresan dichos receptores incrementan la susceptibilidad a la toxina letal y presentan rápida apoptosis (Banks *et al.* 2005; Salles *et al.* 2006). Esto mismo ha sido observado *in vivo* durante la infección con el bacilo. Los ratones que han sido transfundidos con mutantes de macrófagos que han perdido la capacidad de expresión de los receptores ANTXR1/2 han sido capaces de resistir cierta dosis de esporos de *B. anthracis*, mientras que aquellos que fueron retransfundidos con macrófagos con capacidad de expresión de dichos receptores murieron como consecuencia de la acción de los esporos inoculados (Cote *et al.* 2008).

Si bien el rol que cumplen los receptores está claro en los procesos de la enfermedad, como asimismo las consecuencias inmunorregulatorias que produce la liberación de las toxinas, es muy poco lo que se conoce acerca de la expresión de los receptores por parte de los leucocitos (Fukao 2004).

Recientemente se ha demostrado que el PA se une primariamente a las células NKT (*natural killer T cells*) preferentemente antes de hacerlo a las células NK (*natural killer cells* o células naturalmente asesinas) o a los linfocitos T. También está claro que, si se enfrentan macrófagos *in vitro* a la TE, se produce en estas células un aumento del mRNA y, consecuentemente, una mayor expresión de los receptores ANTXR, mientras que en ratones a los que se les instila, por vía intranasal, esporos de *B. anthracis* cepa Sterne (cepa vacunal), se produce una regulación negativa del mRNA y, por lo tanto, menor expresión de receptores en los macrófagos pulmonares (Maldonado-Arocho 2006). Por otra parte, se han establecido otros mecanismos de activación del PA, mediante enzimas plasmáticas, sin necesidad de unirse, en primera instancia, al receptor de membrana.

Las toxinas del carbunco representan el típico ejemplo de toxinas que generan inmunosupresión. La TL inhibe la activación de numerosas células inmunes, inclusive polimorfonucleares neutrófilos, monocitos,

macrófagos, CD (células dendríticas), LT (linfocitos T) y LB (linfocitos B). Induce apoptosis de macrófagos por acción del TNF a través de la vía p38 y modifica la maduración de las CD alterando los mecanismos de muerte inducidos por caspasas, siendo estas células incapaces de iniciar el mecanismo de apoptosis, quizás por alteración de las funciones de ciertas familias de mitocondrias, como las denominadas, precisamente, mitocondrias inhibidoras de apoptosis. La TE también produce la disfunción del monocito y de la CD, pero sólo en cooperación con TL.

Los efectos de la toxina comienzan a manifestarse dentro del fagosoma que ingirió el bacilo para, posteriormente, a través de la TL y la TE, determinar el curso de la enfermedad. Se pueden describir tres fases principales:

- 1.- Una fase de invasión en la puerta de entrada, en la que la toxina ejerce sus efectos a corta distancia.
- 2.- Una fase de proliferación de la bacteria en los órganos linfáticos secundarios, con efectos deletéreos localizados principalmente sobre las células inmunes.
- 3.- Una fase de difusión terminal caracterizada por elevado nivel de toxina circulando en la sangre, con acción a larga distancia sobre numerosos órganos, que culmina con la muerte.

Durante las primeras fases la toxina actúa como antiinflamatoria, bloqueando el reclutamiento de células inflamatorias y, en consecuencia, inhibiendo ambos

mecanismos de la inmunidad (innata y adaptativa) alterando la capacidad del hospedador de mantener la homeostasis. Más tarde, cuando las toxinas son liberadas en grandes cantidades en la sangre, alteran primariamente la función de las células endoteliales, provocan su destrucción e inducen shock, coagulación intravascular diseminada, incoagulabilidad de la sangre por agotamiento de los factores responsables de la coagulación y, finalmente, disfunción cardíaca, con elevadas morbilidad y mortalidad (Firoved 2005; Gordon et al. 1988; Warfel et al. 2005).

Los antibióticos utilizados para el tratamiento pueden llegar a eliminar las bacterias, pero si éstas ya han liberado suficiente cantidad de toxinas, la muerte es inevitable.

Una vez ligado al receptor celular, una proteasa de la superficie celular que contiene furina C-terminal divide el PA en dos fragmentos (Molloy et al. 1992). La activación del PA es esencial en la génesis de la enfermedad.

Como las células furina-deficientes conservan alguna sensibilidad al PA, es evidente que hay otras proteasas celulares capaces de activar a las toxinas. El fragmento carboxi-terminal, el PA₆₃, se heptameriza, es decir, forma agregados de siete moléculas. Los heptámeros tienen gran afinidad para los dominios N-terminales homólogos del FL y del FE, a los que liga enseguida en forma aleatoria, constituyendo el receptor específico para el FE o el FL.

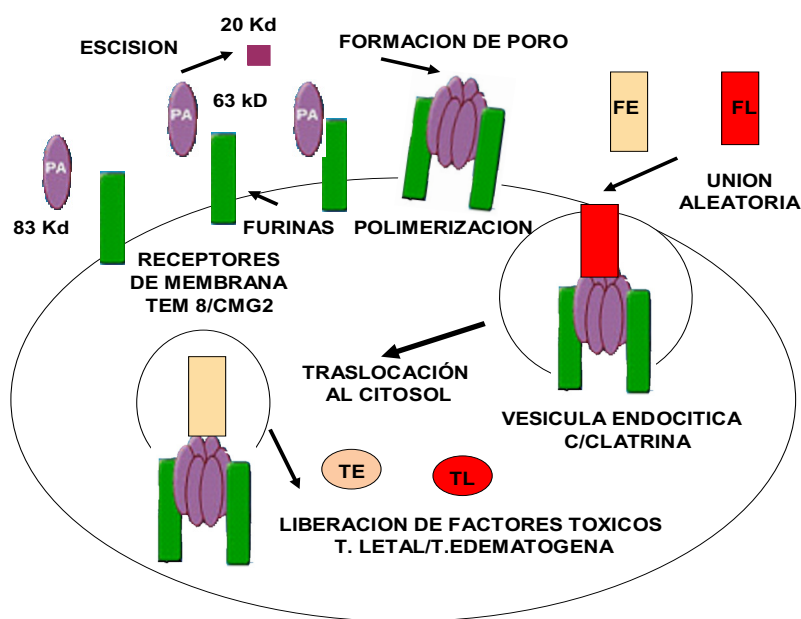


Figura 2. Esquema clásico de la formación de las toxinas e internalización al citosol. El PA se une a su receptor específico. Por acción enzimática de las furinas se libera una fracción de 20Kd. El PA, ahora de 63 Kd, se polimeriza y da lugar a la formación de un poro donde se unirán, en forma aleatoria, el FE o el FL. Endocitosis a través de vesículas recubiertas con clatrina. Traslocación al citosol y liberación de la toxina letal provocando muerte celular, temprana o retardada, y de la toxina edematogena, provocando edema e inhibición de fagocitosis.

Los complejos resultantes de $(PA_{63})_7$ que se hallan unidos a sus receptores específicos en la membrana celular y que han fijado al FE o al FL mediante una unión de tipo hidrofóbica, introducen el mismo a la célula, por un proceso de endocitosis, formando primariamente un endosoma ácido que contiene las toxinas (Koehler and Collier 1991). El pH ácido del endosoma modifica la conformación del heptámero recientemente formado $(PA_{63})_7$, y, como consecuencia de ello, se encuentra ahora insertado en la pared del endosoma provocando la formación de un poro en la membrana del mencionado endosoma. A través de dicho poro se produce la internalización al citosol de todo el complejo que acaba de formarse mediante la unión al PA de las fracciones FE o FL, la que se produce, como ya hemos mencionado, en forma aleatoria. La unión da origen a la formación de las toxinas letal y/o edematógena y a la liberación de las mismas dentro de la célula donde actúan sobre blancos o targets moleculares específicos para cada una de ellas (Blaustein et al. 1989; Benson et al. 1998; Elliot et al. 2000; Milne et al. 1995; Petosa et al. 1997).

Mecanismo de activación de las toxinas

La activación de las toxinas es esencial para el comienzo de la enfermedad. Se ha demostrado que células furino-deficientes muestran una cierta sensibilidad a la toxina, lo que permite suponer que el proceso de activación del PA se produce también mediante proteasas celulares diferentes a las furinas, aún cuando se halle circulando libremente en el plasma sanguíneo. Este proceso de activación también fue observado en otras toxinas, como la diftérica o la de *Pseudomonas*, todas pertenecientes, por su forma de activarse, al grupo de las denominadas A-B toxinas (Collier y Young 2003; Duverger et al. 2006; Moayeri et al. 2004; Mock y Fouet 2001).

También se ha especulado que, bajo ciertas circunstancias, el PA se une primariamente a los otros dos factores y una vez formado el complejo, una proteasa sérica escinde el PA, con posterior unión de este complejo activado al receptor del macrófago (Bradley et al. 2001; Scobie et al. 2003).

La TL es una metaloproteasa asociada al Zn con capacidad para inhibir las señales de transducción afectando al sistema de la activación de mitógenos por la quinasa de proteínas (MAPK, *mitogen activated protein kinase*). Actúa en el extremo N-terminal donde elimina la secuencia necesaria para activar a la MAP quinasa (MAPK) y anula el sistema de señalización que llega al núcleo a través de p38 (P-38 MAP quinasa), ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*) y JNK (*c-jun N-terminal protein kinase*).

Quizás sea éste el mecanismo por el cual la TL tiene, además, la capacidad de impedir el crecimiento

de tumores y la angiogénesis, probablemente inhibiendo o interfiriendo las vías MAPKK-1 y MAPKK-2 (Duesbery et al. 1998).

La TL determina la lisis de los macrófagos por alterar la proteólisis que produce la familia de las proteinquinasas activadas MAPKK 1 y 2, claves en la transducción de señales (Guichard et al. 2012). Cortan a las mismas cerca de su extremo amino terminal impidiendo la fosforilación y la activación de las mismas. En la lisis no intervienen los mecanismos de apoptosis.

La adición de inhibidores de la fosfolipasa A2 (PLA2) no permite el desarrollo de la citotoxicidad ejercida por la TL, actuando en forma dosis-dependiente. Por lo tanto, la fosfolipasa A2 y la proteinquinasa son enzimas que intervienen en el mecanismo de activación de la toxina letal, determinando citotoxicidad sobre los macrófagos (Guichard et al. 2012).

Las células primariamente afectadas en la patogénesis del carbunco son los macrófagos (Friedlander et al. 1986, Hanna et al. 1993). Concentraciones pequeñas de toxina letal fragmentan el MAPKK-3, inhibiendo la liberación, pero no la producción, de ON y de TNF- α , mediadores de la inflamación (Pellizzari et al. 1999), de modo que inicialmente en la infección se reduce o retrasa la respuesta inmune. Posteriormente, a las pocas horas, cuando se alcanzan niveles altos de toxina letal, lisan el macrófago, liberando bruscamente niveles altos de ON y de TNF- α , lo que explicaría que poco antes de la muerte se presenta el shock séptico.

El complejo PA-FE es una adenilciclase Ca^{2+} -calmodulina dependiente, que aumenta el cAMP el cual incrementa la permeabilidad vascular y causa edema (mecanismo similar al de la toxina colérica termolábil, con la diferencia que ésta causa diarrea). La asociación de la TE con la TL es sinérgica, aumentando la toxicidad.

Ambas toxinas son capaces de interferir, modificar o suprimir funciones de múltiples células como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, afectando tanto la inmunidad innata como la adaptativa (Brossier et al. 2000; Duesbery et al. 1998, 2001; Firoved 2005; Friedlander 1986, 2001; Gordon et al. 1988; Koehler and Collier 1991; Maldonado-Arocho et al. 2006; Mollo et al. 1992; Shin et al. 1999; Warfel et al. 2005).

Se ha comprobado que concentraciones inferiores a 1 μ g/ml de la asociación de PA+FE o PA+FL, inoculadas en animales de experimentación, suprimen la formación de iones superóxido en los neutrófilos estimulados por N-formilmietionil-leucil-fenilalanina, lipopolisacáridos o muramil-dipéptido (Wright et al 1988). Por otra parte, este fenómeno no se observa cuando se inyecta cada componente en forma independiente.

La acción sinérgica entre la TL y la TE determina un importante aumento del AMPc de los PMN, lo que

inhibe la fagocitosis medida por la inducción de la respuesta inmunoluminiscente y mediante microscopía de fase. También es muy manifiesta la acción del macrófago en el desarrollo de la enfermedad ya que, si experimentalmente se eliminan los mismos, el animal se vuelve insensible a la toxina letal. Se ha demostrado, asimismo, que en un mismo individuo coexisten poblaciones de células dendríticas y macrófagos resistentes a la toxina y otras sensibles a la misma. La insensibilidad al *B. anthracis* observada en ciertas razas dentro de algunas especies, es muy probable que esté relacionada con la resistencia de sus macrófagos a la acción de las toxinas del bacilo (Welkos y Friedlander 1988). Quizás estas poblaciones de CD y/o macrófagos insensibles a la toxina tengan relación con los mecanismos inmunitarios posvacunales.

Signos clínicos

El período de incubación es variable, dependiendo de la puerta de entrada y de la dosis infectante. Generalmente es de alrededor de 3 a 7 días, con una fluctuación entre 1 y 14 días (Dominguez Carmona y Dominguez de la Calle 2005).

La enfermedad en casi todas las especies se presenta en forma sobreaguda. El animal se encuentra realizando su vida normal y en pocas horas aparece muerto. La forma aguda presenta cuadros febriles con temperaturas superiores a 40-41°C, taquicardia, taquipnea, hematuria y hemorragias por las aberturas naturales.

La forma cutánea puede presentar un período de incubación más prolongado con necrosis local y edema, el que puede generalizarse. En equinos ha sido descrita este tipo de infección como consecuencia del uso de arneses provenientes de animales muertos de carbunco y que al lesionar la piel permiten el ingreso de los esporos y la aparición de la enfermedad.

Los porcinos, caninos, gatos y carnívoros salvajes pueden presentar frecuentemente lesiones faríngeas con compromiso de amígdalas y linfonódulos retrofaríngeos y con exudado serofibrinoso. La forma entérica presenta úlceras edematosas y hemorrágicas con compromiso de los linfonódulos mesentéricos. La forma sobreaguda, más rara en estas especies, se caracteriza por septicemia y muerte (FAO 2001).

Conclusiones

En tanto y en cuanto los productores y los organismos de control nacional y/o provinciales no fiscalicen de manera eficiente el cumplimiento de las leyes vigentes adecuadamente, esta zoonosis se mantendrá en forma endémica. La intervención de la autoridad competente en los focos activos, la eliminación eficiente de los cadáveres y la vacunación obligatoria,

son las únicas herramientas para su control. Para el control de la enfermedad es necesario cumplir con las siguientes premisas:

- Vacunación obligatoria de las especies susceptibles
- Prohibición de desollar animales muertos súbitamente
- Eliminación de cadáveres en forma adecuada
- Introducción de la figura del veterinario responsable sanitario
- Capacitación del personal involucrado en tareas de riesgo sanitario de los establecimientos ganaderos.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

- Abramova FA, Grimberg LM, Yampolskaya OV, Walker DH. Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlosk outbreak of 1979. Proc Natl Acad Sci. USA. 1993; 90:2291-4.
- Bail O. Research into natural and artificial anthrax immunity. German Zentralb, Bakteriell. Parasitenk. Infektionskr. 1904; 47:270-2.
- Bail O. Veränderung der Bakterien in Terkoerpe. Ueber die Korrelation swischen Kapselbildung, Sporenbildung un Infektiositaet des Milzbrandbazillus. Zentralbl Bakt Paras Infekt Krank. I. Orig. 1915; 75:159-73.
- Banks DJ, Barnajian M, Maldonado-Arocho FJ, Sánchez AM, Bradley KA. Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge. Cell Microbiol. 2005;7:1173-85.
- Barth H, Aktories K, Popoff KR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 2004; 68(3):373-402.
- Benson EL, Huynh PD, Finkelstein A, Collier RJ. Identification of residues protective antigen channel. Biochemistry. 1998; 37:3941-8.
- Bergman NH. 2011. *Bacillus anthracis* and Anthrax. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell.
- Bischof TS, Hahn BL, Sohnle PG. Characteristics of spore germination in a mouse model of cutaneous anthrax. J Infect Dis. 2007; 195(6):888-94.
- BioTrax (anthrax vaccine adsorbed) emergent BioSolutions. www.fda.gov/downloads/Biologic Blood Vaccines/Approved/Products/ucm124496.pdf.2008:1-16.
- Blaustein O, Koehler TM, Collier RJ, Finkelstein A. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipoid bilayers. Proc Natl Acad Sci. USA. 1989; 86:2209-13.
- Blood DC, Henderson JA, Radostits OM. 1983. Medicina

- Veterinaria. 5° Ed. México D. F. Editorial Sudamericana.
- Bonuccelli G, Sotgia, F, Frank, PG. ATR/TEM8 is highly expressed in epithelial cells lining *Bacillus anthracis* three sites of entry: implications for the pathogenesis of anthrax infection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 288. C 1402–10.
- Bozue J, Moody KL, Cote CK. *Bacillus anthracis* spores of the BclA mutant exhibit increased adherence to epithelial cells, fibroblast, and endothelial cell but not to macrophages. *Infect Immun*. 2007; 75(9):4498-505.
- Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 2001; 4:225-9.
- Brossier F, Weber Levy M, Mock M, Sirard, JC. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun*. 2000; 68:778-816.
- Candela E, Fouet A. *Bacillus anthracis* Cap D, belonging to the gamma-glutamyl-transpeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol*. 2005; 57:716-7.
- Candela T, Mock M, Fouet A. Cap E, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *J Bacteriol*. 2005; 187:7765-72.
- Carter, KC. Koch's postulates in relation to the work of Jacob Henle and Edwin Klebs. *Med Hist*. 1985; 29:353-74.
- Cataldi A, Labruyere E, Mock M. Construction and characterization of a protective antigen-deficient *Bacillus anthracis* strain. *Mol. Microbiol*. 1990; 4, 1111-7.
- Cendrowski S, MacArthur W, Hanna P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol*. 2004; 51:407-17.
- Chand HS, Drysdale M, Lovchik J, Koehler TM, Lipscomb MF, Lyons CR. Discriminating virulence mechanisms among *Bacillus anthracis* strains by using a murine subcutaneous infection model. *Infect Immun*. 2009; 77:429-35.
- Chitlaru T, Gat O, Grosfeld H, Inbar I, Gozlan Y, Shafferman A. Identification of *in vivo*-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infect Immun*. 2007; 75:2841-52.
- Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM. Jr. Biological warfare. A historical perspective. *JAMA*. 1997; 278:412-7.
- Chung MC, Narayanan A, Popova TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide induces protein S-nitrosylation contributing to macrophage death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 430:125-30.
- Collier RJ, Young JA. Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19:45-70.
- Cote CK, Di Mezzo TL, Banks DJ, France B, Bradley KA, Welkos, SL. Early interactions between fully virulent *Bacillus anthracis* and macrophages that influence the balance between spore clearance and development of a lethal infection. *Microbes Infect*. 2008; 10:613–9.
- Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA. Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem*. 2010; 79:445-70.
- Davis B, Dulbecco R, Herman N, Eisen H, Ginsberg H, 1996. *Tratado de Microbiología*. 4a Ed. Barcelona. Salvat Editores.
- Domínguez Carmona M, Domínguez de la Calle M. El *Bacillus anthracis* como agresivo. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. <http://www.ranf.com>
- Duesbery NS. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*. 1998; 280:734-7.
- Duesbery N. Suppression of a mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of mul. *Acad Sci. USA*. 2001; 98:4089-94.
- Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fisher R., Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR, Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J of Immunol*. 2006; 176:1776-83.
- Elliot JL, Mogridge J, Collier RJ. A quantitative study of the interaction of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. *Biochemistry*. 2000; 39:6706-13.
- FAO. Harina de hueso <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0112sp.htm>. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Enfoques/2001. El carbunco en los animales. Perdurabilidad en el suelo.
- Firoved AM. *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mouse. *Am J Pathol*. 2005; 167:1309-20.
- Friedlander AM. Macrophages are sensitive and resistant to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J Biol Chem*. 1986; 261:7123-6.
- Friedlander AM. Anthrax: clinical features, pathogenesis, and potential biological warfare threat. *Curr Clin Top Infect Dis*. 2001; 20:335-49.
- Friedlander AM. Tackling anthrax. *Nature*. 2001b; 414: 160.
- Fouet A, Mesnage SV. *Bacillus anthracis* cell envelope components. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002; 271:87-113.
- Fouet A. The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med*. 2009; 30:374-85.
- Fukao T. Immune system paralysis by anthrax lethal toxin: the roles of innate and adaptive immunity. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:166-70.
- Gat O, Mendelson I, Chitlaru T, Ariel N, Altboun Z, Levy H, Weiss S, Grosfeld H, Cohen S, Shafferman A. The solute-binding component of a putative Mn(II) ABC transporter (MntA) is a novel *Bacillus anthracis* virulence determinant. *Mol Microbiol*. 2005; 58:533-41.
- Geison GL. *The private science of Louis Pasteur*. 1995. Princeton, NJ. Princeton University Press.
- Gladstone GP. Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free cultures filtrates. *Br J Exp Pathol*. 1946; 27:394-418.
- Glomski IJ. *Bacillus anthracis* dissemination through host. En: Bergman NH. 2011. *Bacillus anthracis* and Anthrax. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell, cap.12.
- Gordon VM, Leppla SH, Hewlitt EL. Inhibitor of receptor mediated endocytosis blocks the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun*. 1988; 56:1066-9.
- Gruber M, Futaki K. Ueber die Resistenz gegen Milzbrand und ueber die Herkunft der milzbrandfeindlichen Stoffe. *Med Wschr*. 1907; 54:249.

- Guarner J, Jernigan JA, Shieh WJ. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Am J Pathol.* 2003; 163(2):701-9.
- Huichard A, Nizet V, Bier E. New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses. *Microbes Infect.* 2012; 14(2):97-118.
- Habib S, Ali, A. Biochemistry of nitric oxide. *Ind J Clin Biochem.* 2011; 26:3-17.
- Hanna P. Anthrax pathogenesis and host response. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998; 225:13-35.
- Harvill ET, Lee G, Grippe VK, Merkel TJ. Complements depletion renders C57BL/6 mice sensitive to the *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Infect Immun.* 2005; 73:4420-22.
- Heninger S, Drysdale M, Lovchik J, Hutt J, Lipscomb MF, Koehler TM. Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. *Infect Immun.* 2006; 74:6067-74.
- Holmes C. Spores, plagues and history: the history of anthrax. Texas Department of States Health Services. 2003. TX: Durban House.
- Hotchkiss KA, Basile CM, Spring SC, Bonuccelli G, Lisanti MP, Terman B. I. TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Exp Cell Res.* 2005; 305:133-44.
- Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA. For the Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon: updated recommendations for management. *JAMA.* 2002; 287(17):2236-52.
- Ingram RJ, Harris A, Ascough S, Metan G, Doganay M, Ballie L, Williamson ED, Dyson H, Robinson JH, Sriskandan S, Altmann DM. Exposure to anthrax toxin alters human leucocyte expression of anthrax toxin receptor 1. *Clin Exp Immunol.* 2013; 173:84-91.
- Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, Cetron M, Cohen M, Doyle T, Fisher M. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:1019-28.
- Kashiba S, Morishima T, Kato T, Shima M, Amano T. Leucotoxic substance produced by *Bacillus anthracis*. *Biken.* 1959; J.2:97-104.
- Keim P, Smith KL, Keys C, Takahashi H, Kurata, T, Kaufmann A. Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:4566-7.
- Keppie J, Harris-Smith PW, Smith H. The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. IX. Its aggressins and their mode of action. *Br J Exp Pathol.* 1963; 44:446-53.
- Koch R. Die aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Beiträge zur biologie der planzen. 1876; 2:277-310.
- Koehler TM, Collier RJ. Anthrax toxin protective antigen: low pH induced hydrophobicity and channel formation in liposomes.
- Krauis PJ and Molscrip. A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Crystallogr.* 1991; 24:946-50.
- Leppla SH, Firedlander AF, Singh Y. A model of anthrax toxic action at the cellular level. *Salisbury Medical Bulletin.* 1990; 68 (suppl):41.
- Leppla SH. The anthrax toxin complex. En: Alouf, JE, Freer JH, ed. Sourcebook of bacterial protein toxins. 1991. London. Academic Press.
- Leppla SH, Klimpel KR, Singh Y. Interaction of anthrax toxin with mammalian cells. *Salisbury Medical Bulletin* 1996; 87 (suppl):91.
- Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cAMP concentrations in eukariotic cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1982; 79:3162-6.
- Levy H, Weiss S, Altboum Z, Schlomovitz J, Glinert I, Sittner A. Differential contribution of *Bacillus anthracis* toxins to pathogenicity in two animal models. *Infect Immun.* 2012; 80:2623-31.
- Levy H, Weiss S, Altboum Z, Schlomovitz J, Rothschild N, Glinert I. The effect of deletion of the edema factor on *Bacillus anthracis* pathogenicity in guinea pigs and rabbits. *Microb Pathog.* 2012; 52:55-60.
- Loving CL, Khurana T, Osorio M, Lee GM, Kelly VK, Stibitz S, Merke TJ. Role of anthrax toxins in dissemination, disease progression, and induction of protective adaptive immunity in the mouse aerosol challenge model. *Infect Immun.* 2009; 77(1):255. DOI: 10.1128/IAI.00633-08.
- Liu S. Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of *Bacillus anthracis* infections in mice. *Cell Host Microbe.* 2010; 8:455-62.
- Lovchik JA, Drysdale M, Koehler TM, Hutt JA, Lyons CR. Expression of either lethal toxin or edema toxin by *Bacillus anthracis* is sufficient for virulence in a rabbit model of inhalational anthrax. *Infect Immun.* 2012; 80:2414-25.
- Makino S, Uchida J, Terakado N. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 1989; 171:722-30.
- Makino S, Watarai M, Cheun HI. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. 2002; 186:227-33.
- Maldonado-Arocho FJ, Fulcher JA, Lee B, Bradley KA. Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. *Mol Microbiol.* 2006; 61: 324-37.
- Martchenko M, Jeong SY, Cohen SN. Heterodimeric integrin complexes containing beta 1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:15583.
- Merchant IA, Packer RA. 1961. *Bacteriología veterinaria.* 2ª ed. Zaragoza. Acribia.
- Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, Langmuir A, Popova I, Shelokov A, Yampolskaya O. The Sverdlosk anthrax outbreak of 1979. *Science* 1994; 266:1202-8.
- Mesnager S, Tosi-Couture E, Mock M, Gounon P, Fouet A. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that is the major cell-associated antigen. *Mol Microbiol.* 1997; 23:1147-55.
- Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* 1983; 39:371-6.
- Milne JC, Blanke SR, Hanna PC, Collier RJ. Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino-

- or-carboxy-terminus. *Mol Microbiol.* 1995;15:661-6.
- Moayeri M, Leppla S. Anthrax toxin. En: Bergman NH (Ed) 2011. *Bacillus anthracis* and Anthrax. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell, cap.8
- Moayeri M, Leppla S. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Current opinion in Microbiology.* 2004; 7:19-24.
- Moayeri M, Leppla SH. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med.* 2009; 30:439-55.
- Moayeri M, Sastalla I, Leppla SH. Anthrax and the inflammasome. *Microbes Inf.* 2011; 14:392-400.
- Mock M, Fouet A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55:644-7.
- Molloy SS. 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.* 1992; 267:16396-402.
- O'Brien J, Friedlander A, Dreier T, Ezzell J, Leppla S. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun.* 1985; 47:306-10.
- Pasteur L, Roux E, Charbeland C. Sur l'étiologie du charbon, *C.R.Acad Sci. (Paris)*, 1880; 91:86-94.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):315-24.
- Pavan ME, Pettinari MJ, Cairó F, Pavan E, Cataldi AA. *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Revista Argentina de Microbiología* 2011; 43:294-310.