

## REVISION

## EL GAS SARIN: EFECTO Y TRATAMIENTO, RECIENTES INVESTIGACIONES.

Esteban Cuartas\*

## INTRODUCCION

En febrero de este mismo año, el mundo se estremeció ante los ataques terroristas presuntamente perpetrados por miembros de la secta extremista AumShinrikyo. Fueron dejados paquetes en diversas estaciones del metro de Tokyo y estos comenzaron a exhalar un olor indescriptible, pero que producía efectos terribles en los transeúntes. Todos intentaron alejarse del gas, pero algunos no lograron hacerlo a tiempo ¿Qué era esa substancia que de un momento a otro podía atacar a las grandes masas que utilizan el metro? Era Sarin, un gas tóxico muy fácil de sintetizar que ha sido adoptado por muchos países como principal arma química. Ahora, el Sarin se convierte en una amenaza terrorista.

## EL GAS SARIN

El gas sarin es un organofosfato altamente tóxico, conocido como "gas nervioso", que a temperatura y presión estándar se encuentra en estado gaseoso.

## Organofosfatos

Son llamados organofosfatos (OPs) unos 200 compuestos comunmente utilizados como insecticidas de fitófagos. Entre ellos se encuentran el diazinón, malathión, parathión, TEPP y DFP. Persisten en el ambiente desde horas hasta semanas y normalmente no se encuentran residuos en el momento de cosechar. Todos, aparte de ser compuestos análogos, funcionan como inhibidores irreversibles de las enzimas colinesterasas.

Fueron inventados en 1973 por Willy Lange y Gerhard Schrader, quienes trabajaban para Farbenfabriken Bayer AG. Debido a su actividad biológica sirvieron bastante para impulsar el desarrollo de la toxicología y la neurofisiología. Luego, a partir de los 60's cuando fue prohibido el uso de DDT y algunos organocloros en EEUU, los OPs fueron desarrollados como insecticidas comerciales.

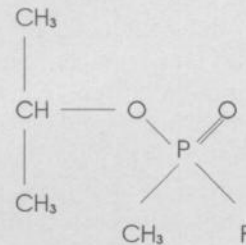
Los primeros OPs en ser sintetizados por Lange y Schrader resultaron altamente tóxicos y los nazis impulsaron su desarrollo como "gases nerviosos". Entre estos primeros OPs están sarin, soman y tabun. A partir de estos compuestos se generaron otros con márgenes de acción más específicos, que son utilizados hoy en día como insecticidas.

Además, se han desarrollado otros insecticidas a partir de la fisostigmina (de la planta *Physostigma venenosum*), que también inhibe las colinesterasas pero de manera reversible, y por consiguiente son menos peligrosos en caso de intoxicación. A estos insecticidas no OPs se les llama carbamatos.

## Sarin

El gas sarin es de alto interés militar ofensiva y defensivamente. Aunque pocos países admiten tener programas de armas químicas, es un hecho que casi la totalidad de las investigaciones en el tema son llevados a cabo por establecimientos militares. El ataque terrorista con gas sarin perpetrado en el metro de Tokyo (febrero 1995) demuestra que el sarin no es un problema del pasado. Las víctimas de este ataque fueron tratadas eficazmente con atropina y sólo hubo diez muertes en total. El peligro del sarin radica en que los ingredientes para sintetizar este y otros OPs están disponibles en el mercado y en que los OPs son extremadamente fáciles de sintetizar.

Su nombre químico es isopropil metilfosfonofluorhidrato y su estructura es la siguiente:



\* Estudiante del I semestre, Facultad de Medicina, CES.

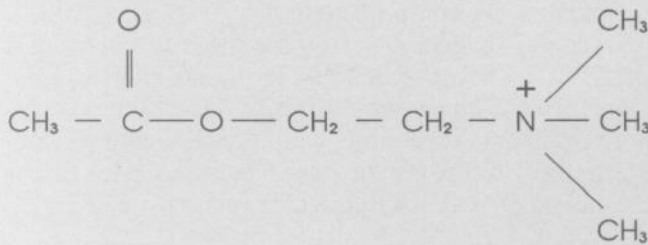
## FISIOLOGIA DETRAS DEL EFECTO DEL SARIN

El efecto del sarin en los seres humanos involucra los siguientes elementos:

### Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor en los ganglios simpáticos, las terminaciones parasimpáticas y simpáticas postganglionares, en las glándulas sudoríparas y en las uniones neuromusculares (placa motora). Se encuentra almacenada en vesículas que son liberadas a los espacios sinápticos al llegar un impulso nervioso.

Estructura:



### Receptores de ACh

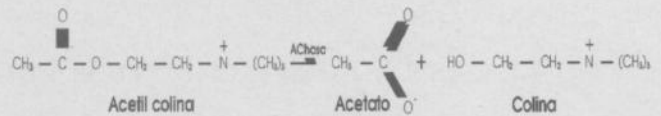
En el sistema autónomo los receptores de ACh se dividen en nicotínicos (en los ganglios) y muscarínicos (el resto); cada tipo es estimulado específicamente por la sustancia respectiva. Los muscarínicos se dividen en M-1 (localizados en el SNC), M-2 (receptores no neurales de músculo liso, cardíaco y epitelio glandular) y M-3 (en músculo liso y epitelio glandular).

### Acetilcolinesterasa

Son concernientes tres tipos de colinesterasas: la colinesterasa plasmática (butirilcolinesterasa), la acetilcolinesterasa (AChasa) eritrocitaria y la AChasa neuronal o sináptica. Sólo la AChasa sináptica está involucrada en los síntomas de envenenamiento por sarin. Las otras dos, especialmente la eritrocitaria, sirven como reflejo del estado de inhibición de la AChasa sináptica. Sin embargo, es más práctico determinar la actividad de la colinesterasa plasmática.

La AChasa sináptica fue descubierta en 1938 por David Nachmansohn. Se encuentra anclada en la membrana basal del espacio sináptico; tiene un peso de 260 kilodaltons y posee una estructura alfa2beta2. La AChasa lleva a cabo el desdoblamiento de la ACh y es notable que es una de las enzimas más rápidas conocidas. Su velocidad catalítica depende sólo de la velocidad de difusión de sus sustratos. Su rol es eliminar la ACh libre presente en el espacio sináptico.

Reacción que cataliza:

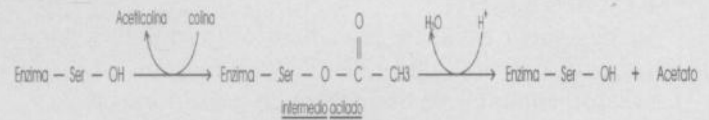


La importancia de la AChasa se puede evaluar mediante el dato proveniente de estudios del diafragma de ratones, en el cual existe la proporción de 1 AChasa:2 ACh receptores.

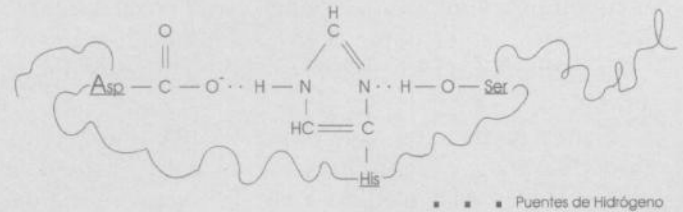
El mecanismo que utiliza es similar al de la proteasa quimotripsina, puesto que junto con esta pertenece a la familia de las serinoproteasas. El mecanismo consiste de dos pasos fundamentales: en el primero ocurre la acilación de la enzima y en el segundo la deacilación de la misma.

Simultáneamente con el primer paso, el enlace éster de la ACh se pierde y queda libre la porción colina. El segundo paso es más lento que el primero y es el que determina la velocidad de la reacción. Esta reacción se caracteriza entonces por la presencia de un compuesto intermedio enzima-acil.

Mecanismo:

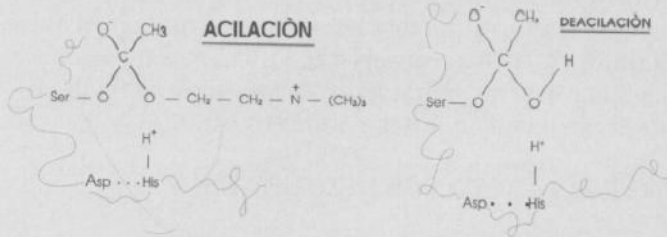


La serina reactiva posee propiedades catalíticas a la presencia de una histidina y un aspartato proximales. En conjunto forman lo que se ha llamado la tríada catalítica. Participación de la tríada catalítica:

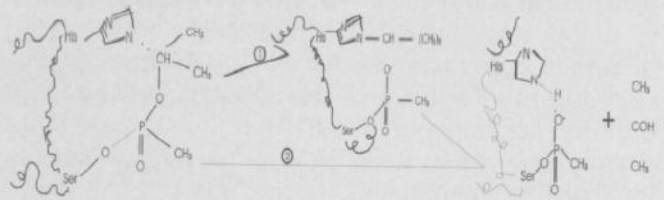


La histidina funciona como el aceptor de hidrogenión (H+) del grupo hidroxilo de la serina que es liberado al ocurrir la unión al sustrato. La histidina, una vez cargada con el protón, es estabilizada por el grupo carboxílico del aspartato, que posee carga negativa. Para llegar a la enzima acilada, se debe pasar por un estado de transición tetraédrico, que permite el rompimiento del enlace éster. Al ocurrir la deacilación sucede lo inverso, sólo que el atacante neutrofilico es una molécula de agua.

Estados de transición tetraédricos:



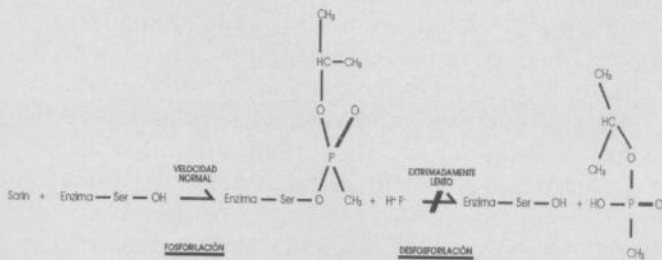
Envejecimiento enzimático:



EFFECTO MOLECULAR DEL SARIN

El sarin es un análogo estructural de la ACh que en vez de presentar un éster carbónico tiene un éster organofosfórico que se une bien a la serina de la AChasa, debido a la electrofilia del fósforo central. Entonces el grupo hidroxilo de la serina fácilmente lleva a cabo su ataque nucleofílico. Se produce una enzima fosforilada y se libera el ion fluor, el cual es muy estable. Luego, el paso que sería normalmente una deacilación, y en este caso una desfosforilación, es extremadamente lento y, para efectos prácticos, inexistente. Esto se debe a que el compuesto intermedio es muy estable y no es tan susceptible al ataque nucleofílico por parte de la molécula de agua. El éster con la serina es un grupo alcoxilo, menos electronegativo que el átomo de fluor en el sarin original y por ende permite al átomo de fósforo una mayor carga negativa parcial y más estabilidad.

Inhibición de AChas mediante sarin:



Luego, a medida que transcurre el tiempo (24 horas aproximadamente), el compuesto enzima-sarin sufre una descomposición verdaderamente irreversible, que lleva a efectos fisiológicos duraderos. En uno de los posibles mecanismos, uno de los grupos alcoxilo es liberado y el ion resultante es estabilizado por el anillo imidazol de la histidina proximal. En la otra posibilidad, uno de los nitrógenos del anillo imidazol conduce al ataque nucleofílico y secuestra el grupo alcano, dejando la enzima fosforilada. Estas descomposiciones son llamadas envejecimiento enzimático, refiriéndose sin duda al hecho de que es un proceso irreversible.

EFFECTOS FISIOLÓGICOS INMEDIATOS DEL SARIN

El sarin es absorbido a través de la piel, en los pulmones y en el tracto gastrointestinal y se distribuye ampliamente en los tejidos. Su eliminación es lenta y se lleva a cabo en el hígado. Los metabolitos, productos de oxidación, todavía muestran actividad biológica y requieren de hidrólisis para ser inactivados.

El sarin inhibe irreversiblemente las AChasas; por consiguiente causa una acumulación de ACh en los espacios muscarínicos y nicotínicos. Esto produce tres tipos de síntomas distintos: muscarínicos, nicotínicos y del SNC. Los síntomas aparecen de 30 minutos a dos horas después de la exposición al gas.

Los síntomas muscarínicos son náusea, vómitos, dolores abdominales, incontinencia fecal y urinaria, visión borrosa, secreciones incrementadas, y más severamente, bradicardia, hipotensión, y edema pulmonar.

Los síntomas nicotínicos son espasmos musculares, fasciculaciones, hipertensión, taquicardia y, en casos severos, hipoventilación y paro respiratorio.

Los síntomas del SNC incluyen ansiedad, temor, convulsiones, confusión, debilidad y coma.

Los casos severos se definen a partir de la presencia de menos del 50% de la AChasa plasmática. En estos casos las muertes ocurren por edema pulmonar y paro respiratorio.

TRATAMIENTO

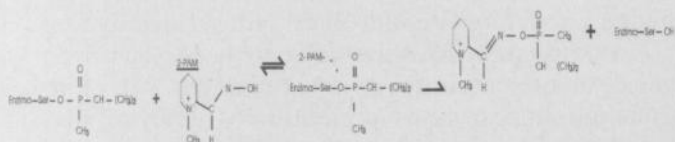
En vista de que se presentan tres tipos de síntomas distintos, el tratamiento se orienta hacia estos de manera específica. La atropina, un antagonista competitivo en los receptores muscarínicos, se aplica intravenosa en dosis de 0.5-2 mg cada 15-20 minutos hasta que desaparezcan las secreciones mucosas y bronquiales.

La 2-PAM o pralidoxima es una oxima que reactiva las colinesterasas inhibidas y es efectiva contra los síntomas nicotínicos. Se aplican de 1 a 2 g IV en un lapso de 5 a 20 minutos cada 5 horas hasta que desaparezcan los signos nicotínicos. La reactivación de las enzimas mediante 2-PAM se hace



más difícil a medida que pasa el tiempo, precisamente debido al fenómeno de envejecimiento enzimático; es prácticamente inútil después de 48 horas. También es importante notar que aunque los insecticidas carbamatos funcionan de manera análoga, la pralidoxima empeora los síntomas nicotínicos en lugar de mejorarlos. La 2-PAM es un potente agente nucleofílico (mucho más potente que el agua) debido a su grupo amonio cuaternario que, mediante estabilización por resonancia, crea un grupo hidroxilo muy nucleofílico. La 2-PAM entra y se asemeja al sitio activo de la AChasa y como tiene una acción nucleofílica más potente le roba el organofosfato a la enzima.

Reacción de la 2-PAM:



Finalmente, el diazepam se utiliza para los síntomas del SNC, 10 mg SC o IV. Aparte de aliviar la ansiedad, se cree que actúa en el SNC para complementar la acción de la atropina.

### EFFECTOS A LARGO PLAZO

En 1948 se describieron los efectos inmediatos de intoxicación por sarin, pero más recientemente se han reconocido efectos persistentes. Un estudio realizado en veteranos de la Segunda Guerra Mundial que habían sido expuestos a sarin permitió dividir la sintomatología en dos. El primero y mayor grupo presentaba vitalidad y ambición disminuida, regulación autonómica deficiente (cefalea, síntomas cardiovasculares y gastrointestinales), disminución de la libido, intolerancia al alcohol, a la nicotina y a varias medicinas, y envejecimiento prematuro. El segundo grupo presentó, además, desórdenes depresivos, ataques vegetativos cerebrales, amnesia y demencia. Estos síntomas persistían durante diez años aproximadamente y son el pr-ducto de la exposición a grandes concentraciones de sarin en un tiempo corto.

Finalmente, existe lo que se ha llamado el OPIDN, o neurotoxicidad aplazada inducida por organofosforados. Este síndrome se ve más en casos de exposición a pequeñas concentraciones durante un tiempo largo. El OPIDN se caracteriza por flacidez, debilidad muscular, movimientos torpes, caminado lento, hiperreflejos, etc. Histológicamente se ha demostrado degeneración walleriana de los grandes axones mielinizados de nervios periféricos. Estudios bioquímicos han revelado que el sarin, y otros OPs,

inhiben una carboxil-esterasa neural, la NTE (neuropathic target enzyme), que se cree está involucrada en el metabolismo de los lípidos. Al ser inhibida la NTE se observa el OPI-DN. En algunos paciente hay recuperación parcial, pero también se observan daños motores permanentes.

### INVESTIGACIONES RECIENTES

#### \* 1992

Gupta y Dettbam<sup>1</sup> observaron que la mionecrosis que el sarin produce es tratable con d-tubocurarina y memantina. Por otro lado, Gupta et al<sup>2</sup> probaron tres oximas (bispiridina monooximas), compuestos similares a la 2-PAM recién sintetizados. Se encontró que funcionaron bien en el SNC y el SNP. El objetivo es encontrar oximas que penetren bien al SNC para aliviar los efectos del sarin. Otras investigaciones<sup>4</sup> sobre oximas demostraron que la HLo-7 es más efectiva que la HI-6 y que, además, es muy efectiva en la reactivación de la AChasa en el SNC. Niederhauser et al<sup>5</sup> encontraron sorpresivamente que la obidoxima también tiene el efecto de secuestrar el sarin libre que se encuentra en la sangre y así previene su penetración al SNC. Presumiblemente las otras oximas también funcionan de esta manera. Por otro lado, Maxwell<sup>6</sup> probó la efectividad de la terapia con carboxil esterasa (esterasa plasmática) contra varios OPs y encontró que es más efectiva contra los OPs más fuertes, como el sarin.

Finalmente, Clement<sup>7</sup> probó que la oxima HI-6 atraviesa la barrera hematoencefálica y que a esto se debe su mayor efecto en relación con otras oximas.

Bajgar<sup>3</sup> correlacionó los niveles de actividad de la AChasa eritrocítica con síntomas de intoxicación y encontró que a 70-100% de actividad no había síntomas obvios, de 60-70% se observó salivación, de 30-55% se observaron fasciculaciones y respiración afectada, y de 15-30% ocurrieron convulsiones. A menos del 10% de actividad se producía la muerte. Este estudio es importante para el monitoreo biológico a la exposición tanto a Sarin como a otros OPs, incluso insecticidas.

#### \* 1993

Gupta et al.<sup>8</sup> verificaron la efectividad del tratamiento estándar con atropina, diazepam y pralidoxima, y, además, observaron los efectos pulmonares. Registraron proliferación celular, engrosamiento intersticial, pérdida de espacios alveolares y finalmente consolidación de grandes áreas en los lóbulos. En cuanto a la terapia observaron la siguiente efectividad: atropina, diazepam y pralidoxima > atropina y diazepam > diazepam y pralidoxima > atropina y pralidoxima. Notablemente el diazepam resultó ser muy importante en el tratamiento.

En otras investigaciones Gupta et al<sup>9</sup> observaron en un modelo de reflejo monosináptico (MSR) medular, que el efecto del sarin es bifásico, es decir, que a bajas concentraciones (2-20 nM) producía facilitación del 150% y que más altas concentraciones (90 nM) deprimían a un 70% del reflejo normal. Se especula que esto se debe inicialmente a un bloqueo de transmisión del GABA (tratable con diazepam que es un facilitador de la acción del GABA) y a más altas concentraciones se activan los AChR muscarínicos, llevando a la depresión del MSR. Gupta et al<sup>11</sup> demostraron que los efectos del sarin dependen de la ruta por la cual se absorbe, siendo afectados los AChR muscarínicos por la vía SC y en la ruta IV, además de los muscarínicos (hipotensión, bradicardia), también los alfa-adrenorreceptores (hipertensión, bradicardia).

Por otro lado, Sharú et al<sup>10</sup> demostraron que la enzima butirilcolinesterasa (colinesterasa plasmática) puede servir efectivamente como antídoto profiláctico para la intoxicación con sarin. Esta enzima mostró una vida media de aproximadamente 30 horas en roedores; permitió su supervivencia a varias exposiciones a la DL50 de sarin y, además, se manifestaron síntomas más leves cuando los hubo. Esta investigación abre las puertas a un tratamiento nuevo y efectivo.

Pandey et al<sup>12</sup> y Smith<sup>13</sup> investigaron el síndrome OPIDN (ver efectos a largo plazo) causado por el sarin. El primer equipo comprobó que al exponer ratones diez días seguidos a 20 minutos de sarin, la NTE (carboxiesterasa neural) estaba inhibida y que al mismo tiempo había degeneración distal de axones. Smith demostró que se necesita un período de más de 24 horas bajo el efecto del sarin para producir el incremento en el tiempo de latencia de los potenciales de acción musculares. La pralidoxima administrada antes de estas 24 horas previno el efecto sobre la latencia.

#### \* 1994

Clement<sup>17</sup> combinó sarin con otro OP llamado GF para ver si la toxicidad era mayor que la de cada uno individualmente. Encontró que si se suministraban atropina (17.4 mg/kg) y 2-PAM antes del sarin, se podía suministrar hasta 3 veces el DL50. Por otro lado, Gresham et al<sup>14</sup> investigaron la excreción de los metabolitos del sarin y encontraron que a bajas dosis casi el 100% es excretado por la orina, con una vida media de 3.7 horas. De ahí que sugieren que para hacer monitoreos de exposición al sarin es mejor utilizar estos metabolitos ácidos. Renestorff<sup>15</sup> reportó un caso de exposición accidental al sarin y encontró pupilas mióticas y un campo visual reducido, mientras la agudeza visual se conservó.

Como siempre, gran parte de las investigaciones se dedican a buscar mejores tratamientos. Maxwell et al<sup>18</sup> encontraron que la terapia descrita por Shani et al,<sup>10</sup> que consiste en suministrar AChasa sérica, puede ser potenciada mediante el suministro de oximas bis-cuaternarias. Utilizaron una oxima recientemente creada, la HI-6, la cual funciona de manera similar a la 2-PAM. Al combinar la HI-6 con la AChasa pudieron suministrar 5 veces el DL50 sin efectos. Luego, Stewart y Koplovitz<sup>19</sup> compararon HI-6 con PAM-2 y encontraron que para el sarin las dos funcionan igualmente, pero que para el gas tabun la HI-6 funciona tres o cuatro veces mejor; entonces sugieren que se adopte la HI-6 como terapia estándar para el envenenamiento con OPs. Al ser suministrada la HI-6 con atropina previamente se puede suministrar hasta diez veces la DL50 de sarin sin notarse efectos. Otra investigación dirigida hacia posibles terapias fue la de Blank et al,<sup>16</sup> quienes intentaron utilizar tacrina (THA), un inhibidor reversible de AChasa, como competidor del sarin, pero encontraron que la THA no sirvió como pretratamiento para la intoxicación con sarin.

#### CONCLUSIONES

Las investigaciones recientes muestran dos áreas prometedoras; por un lado está el desarrollo de las oximas H que muestran más efectividad que la 2-PAM y segundo, el desarrollo del uso de carboxiesterasa (butirilesterasa o colinesterasa plasmática) como tratamiento eficaz. En cuanto a las oximas, su desarrollo se ha centrado hacia un diseño que permita la penetración al SNC, pero paradójicamente, Niederhauser et al encontraron que las oximas también ejercen un efecto positivo al secuestrar el sarin libre en la sangre. Resulta conveniente que una porción de las oximas permanezca en la sangre para actuar de esta manera. Finalmente, el tratamiento con enzimas análogas a la afectada, es decir, una terapia kamikaze, suena muy prometedora si se acompaña de oximas tipo 2-PAM.

Si bien algunas de las investigaciones están siendo impulsadas por establecimientos militares, ésta mala intención es contrarrestada por los efectos positivos de los descubrimientos. Siendo el sarin una epítome de los OPs, los resultados encontrados pueden ser generalizados a todos los OPs que se utilizan como insecticidas y que pueden causar intoxicaciones.

Mientras se desarrollan estas terapias nuevas, el tratamiento adecuado sigue siendo la combinación de atropina, 2-PAM y diazepam.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gupta D. Potential of memantine, d-tubocurarine and atropine in preventing acute toxic myopathy induced by organophosphate nerve agents: soman, sarin, tabun, and VX. *Neuroxicologia* 1992; 13 (3).
2. Gupta et al. The 3,3'-bispyridinium mono-oximes as antidotes against organophosphorus intoxication. *J Pharm Pharmacol* 1992; 44 (12).
3. Bajgar. Biological monitoring of exposure to nerve agents. *Br J Int Med* 1992; 49 (9).
4. Boulet et al. Efficacy of Hlo-7 and pyrimidoxime. *Arch Toxicol* 1992; 66 (3).
5. Niederhauser et al. Interaction of obidoxime with sarin in aqueous solution. *Arch Toxicol* 1992; 66 (3).
6. Maxwell. The specificity of carboxylesterase protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 114 (2).
7. Clement JG. Central activity of acetylcholinesterase oxime reactivators. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 112 (1).
8. Gupta et al. Sarin induced lung pathology. *Biomed. Environ. Sci* 1993; 6 (2).
9. Gupta et al. Biphasic action of sarin on monosynaptic reflex. *Arch Toxicol* 1993; 67 (5).
10. Ashani et al. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45 (12).
11. Gupta et al. Route-specific cardiorespiratory and neuromuscular changes following Op poisoning. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1993; 321.
12. Pandey et al. Delayed neurotoxic effect of sarin in mice after repeated inhalation exposure. *J Appl Toxicol* 1993; 13 (2).
13. Smith. Long term effect of the anticholinesterases sarin and soman. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45 (3).
14. Gresham et al. Metabolite pharmacokinetics of soman, sarin and GF. *J Appl Toxicol* 1994; 14 (5).
15. Rengstorff. Vision and ocular changes following accidental exposure to organophosphates. *J. Appl Toxicol* 1994; 14 (2).
16. Blank et al. Efficacy of tacrine as a nerve agent pretreatment. *Drug Chem Toxicol* 1994; 17 (1).
17. Clement. Toxicity of the combined nerve agents GB/GF. *Arch Toxicol* 1994; 68 (1).
18. Maxwell et al. Amplification of the effectiveness of acetylcholinesterase for detoxification of organophosphates. *Bochem Pharmacol* 1994; 17 (2).
19. Stewart and Kopovitz. A comparison of the efficacy of H16 and 2-PAM. *Toxicol Lett* 1994; 70 (3).
20. Klaassen, Doull, Amdur. Cassarett and Doull's Toxicology, the basic science of poisons. 4th ed. 1991: 580-592.
21. Stryer. *Biochemistry*. 3rd ed. 1988: 221-226, 1023-1024.
22. Kasper, Fauci, Martin, Wilson, Braunwald, Isselbacher. *Harrison's principles of internal medicine*. 13rd. ed. p 2457.
23. Van Biema D. Prophet of poison, *Time magazine* 1995; 13: 12-23.