

Revisión

La toxina botulínica como medicamento

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Este artículo es una revisión de las toxinas botulínicas, el compuesto orgánico más tóxico conocido de los que bastan 100 Kg, distribuidos equitativamente, para matar a toda la humanidad, por lo que se ha sugerido su uso como agresivo químico en la guerra y en el terrorismo. A continuación se describe la biología molecular de la toxina y sus mecanismos de acción.

Considera indicaciones terapéuticas las distonías, especialmente la laringea, la acalasia, el blefarospasmo, la esclerosis múltiple, los espasmos hemifaciales, procesos anales y por otro lado, su posible empleo para tratar los tics, la hiperhidrosis y las arrugas. Termina el trabajo con una amplia bibliografía del tema.

Palabras clave: Toxina botulínica.—Distonías.—Acalasia.—Arrugas.—Hiperhidrosis.

ABSTRACT

This article offers a complete revision of botulinic toxins, which are the most toxic among the organic compounds. Scarcely 100Kg equitably distributed are required to kill the whole mankind, and as a consequence its use has been suggested in conventional war or terrorisms. The molecular biology and the action mechanisms of the botulinic toxins are also described in this article.

In spite of the dangers, these toxins could be useful in therapeutic treatment of distonies, such as those from larynx, acalasy, blepharospasm, multiple sclerosis, hemifacial spasms, and on the other hand, for tic and wrinkles treatments.

Key words: Botulinic toxin.—Distonies.—Achalasia.—Wrinkles.

Una norma ética de la medicina ha sido la del “*primun non nocere*” y tradicionalmente a los medicamentos, se le exigía inocuidad y que hubiera una significativa diferencia entre dosis terapéuti-

ca y tóxica rechazando el empleo de tóxicos. Claude Bernard en 1885 en su "Introducción a la medicina experimental" había dicho que "los venenos pueden emplearse tanto para destruir vidas como para tratar a los enfermos". La toxina botulínica fue empleada en los años 60 para disgregar focos cancerosos. Al haber ordenado Nixon en 1968, cerrar la investigación con la toxina botulínica en Fort Derrick, Edward Schantz se fue a la Universidad de Wisconsin y allí dirigió su interés a la posible utilidad terapéutica de ésta, proporcionando a Allan Scott oftalmólogo del Smith-Kettewell Institut de Investigaciones Oftalmológicas de San Francisco muestras de toxina, que éste ideó en 1973 usarla como terapia relajante, demostrando que podía debilitar selectivamente a los músculos oculares de rhesus inoculando localmente cantidades mínimas de la toxina botulínica y luego a voluntarios con estrabismo, indicación que luego se amplió a muchos procesos. La toxina botulínica denerva funcionalmente a los músculos y como consecuencia induce la formación de nuevas uniones neuromusculares adyacentes, aliviando sustancialmente el dolor y mejorando la movilidad, siendo más eficaz, cuando se trata de músculos pequeños que sobre los grandes.

TOXINAS BOTULÍNICAS

Las toxinas botulínicas se designan con las letras BT seguidas del signo x y de una mayúscula expresiva del serotipo; vg la neurotoxina del Clostridium botulinum tipo A seria "BTxA" y mas comúnmente por las letras BoNT, seguidas, después de una barra inclinada, de una letra mayúscula indicativa del serotipo vg. BoNT/A; son las sustancias mas tóxicas existentes, incluidas las sintetizadas por el hombre. La cepa Hall, en un medio simple puede producir en 1 ml, diez millones de DL_{50} para el ratón en 24 horas. La dosis mínima que mata a un animal de laboratorio, generalmente el ratón de 20 g, en 24 horas, oscila según diversos autores entre 0,05 a 0,00005 mg/kg (la tetánica iría de 0,1 a 0,0001. La tarichatoxina 0,5, la batrachotoxina 4 y la saxitoxina 8. Un mg de toxina A contiene $31 \cdot 10^6$ DMM de ratón u $88 \cdot 10^6$ DL_{50} . Para el cobaya la DMM es $4,8 \cdot 10^6$. Un hombre muere con 100 a 3.500 DL_{50} ratón, es decir, con 5 a 160 mg/kg. La toxina botulínica es una de las potenciales sustancias que pudieran ser utilizadas como agresivo químico en guerra o en el terrorismo.

Para Gill y cols. (1982) y otros laboratorios basándose en la inoculación a varias especies, la DL_{50} para el hombre sería la de 1 ng/kg, y la letal 3 ng/kg (McNally y cols., 1994). Tomando como dosis letal para el hombre la de 0,065 mg por kg de peso 4,5 μ g de toxina botulínica mataría a un hombre y con 80-100 kg distribuidos equitativamente se podría matar a la humanidad. La LCt_{50} de la A es 22,5 μ g • min/ m_3 para el ratón y para el rhesus mientras que la de la enterotoxina B estafilocócica es 80-100 mg • min/ m_3 para el ratón. Por haberle caído una gota de toxina en la piel murió un Jefe de Servicio del Instituto Pasteur.

La toxina botulínica, como péptido, es relativamente termolábil ya que 80° C durante 30 minutos, o 100°C durante 10 minutos, separa sus cadenas H y L, con pérdida total de su toxicidad; una cocción prolongada evita la intoxicación. Resiste parcialmente hasta un pH de 2,5 y por ello a los jugos gástricos, y se descompone en un pH alcalino. La toxina se conserva muy bien a 0°C y a temperaturas inferiores, o bien liofilizada. La toxina se descompone en el aire, por la luz y por agentes químicos especialmente por los oxidantes, permanganato o yodo. La toxina tratada por el método de Ramón se convierte en la anatoxina o toxoide botulínico, mientras que si se somete a radiaciones (Levaditi) pasa a una supertoxina que llamó hipertoxina.

La toxina se obtiene cultivando el *C botulinum* en un medio nutritivo líquido durante unos días hasta el agotamiento de los nutrientes, que determina la muerte de las bacterias; se separan estas por centrifugación quedando las diversas presentaciones de la toxina en el sobrenadante.

Una mínima cantidad de neurotoxina que tiene 5-7S se segrega aislada pero la mayoría lo hace rodeada por una hemaglutinina, absorbible por hematíes sin que el conjunto pierda toxicidad, y por una proteína atóxica no hemaglutinante que rodea y protege a la neurotoxina de la degradación por los ácidos y por las proteasas, formando complejos y agregados extracelulares, lábiles en el ambiente y al calor con diferencias según las cepas, cuyo tipo depende del bacilo, de las condiciones de su cultivo y del solvente empleado (Sugii y cols., 1977). Los complejos M (inicial de "mean") son los menores, de 10-12 S; están constituidos por la unión de la neurotoxina con una molécula

atóxica no hemaglutinante. Los complejos L (inicial de "large") de 16S están formados por la unión del complejo M con la proteína b de 7,2S de 128.000 daltons, mas una gran cantidad de una proteína hemaglutinante (Das Gupta y cols. 1966), al menos en los complejos de las neurotoxinas A y D y probablemente en los de la B. La formación de complejos M o L depende mucho de la concentración de iones Fe^{++} ; si es de 1 mM los complejos M y L, se producen equimolecularmente, pero si la concentración es de 10 mM predominan mucho los M. La descomposición de los complejos, en otros menores aumenta la toxicidad al concentrarse en ellos la toxina.

Los agregados son macromoléculas que contienen como demuestra el microscopio electrónico una cadena de neurotoxina envuelta por una hélice de hemaglutinina (Boroff y cols. 1972). La adición de tripsina, al medio de pH 6,7 modifica ligeramente la estructura de los agregados, quedando más accesible la toxina.

La agregación dimérica de dos complejos L da un agregado tóxico de 19S (unos 900.000 daltones) en el caso de la BoNT/A y de 500.000 para la BoNT/B, y de unos 350.000 (11 S) para la BoNT/E. El agregado de 19S se retiene en las columnas de Sephadex de las que se puede eluir con cloruro sódico obteniéndose una fracción la α de 7,2 S con 150,000 d que es el 20% del total que contiene entre 3 a 5 veces mas neurotoxina que los cristales y poca hemaglutinina y la β que es el 80% que contiene poca neurotoxina y mucha hemaglutinina. La hemaglutinina se reparte en diversos picos, al modificar las condiciones de la elución (Das Gupta y cols. 1968).

Otro agregado es el formado por unión de los complejos M y L que forma cristales de 840.000 a 1.000.000 daltones, de unos 19S, salvo la BoNT/C₂ y laBoNT/G.

TABLA 1

Tipo	Composición
Complejo M	Toxina + proteína atóxica
Complejo L	Complejo M + proteína de 128.000 d + hemaglutinina
Agregados de L	
Agregados de M y L	

La diálisis de los agregados contra puffer fosfato separa los complejos M y la hemaglutinina, al menos en el caso de la neurotoxina A. La hemaglutinina puede separarse absorbiéndola con hematíes (Kozaki y cols. 1975).

La electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico separa las proteínas estabilizadoras de los agregados. Las columnas de Sephadex (dietilaminoetil) retienen a todas las proteínas de las soluciones de los cristales en un tampón de pH 7,2. La elución de la columna con el mismo tampón con gradiente de CINA separa dos fracciones: la a que contiene el 20% de las proteínas, entre ellas la mayoría de la neurotoxina, siendo, (Knox y cols. 1970, Lammanna y cols. 1970, Das Gupta y cols. 1966) tres a cinco veces más tóxica que los cristales y escasa cantidad de una proteína de similar peso, atóxica y no hemaglutinante. La ultracentrifugación de la fracción a da un solo componente de 7,2S de 128.000 (± 12.800) de pm y la gel filtración otro componente único de 150.000 daltons. Los cristales disueltos solución salina molar tamponada se resuelven en complejos L (Sugii y cols. 1975). La ultra centrifugación de la solución de los cristales en medio ácido solo da una banda pero en un pH alto aparecen varias bandas. La disgregación de los agregados en los que la toxina está protegida del pH ácido y de la pepsina, libera a aquella. Por ello, por ejemplo, la toxicidad aumenta, si el alimento se conserva a 0° C.

La neurotoxina se separa de los agregados y complejos, por el método rojo que comienza precipitando el producto bajando el pH, redisolviendo el precipitado en un buffer acuoso en el que al agregar sulfato amónico precipita la neurotoxina muy pura y estable en forma cristalina, que da una sola banda de precipitación con la anti-toxina por el método de Ouchterlony. La toxina se liofiliza y el polvo resultante se puede almacenar en viales pequeños. Hay también cristales formados por la neurotoxina unida a la hemaglutinina, y en algunos casos a otra proteína.

La neurotoxina se segrega como prototoxina que es un péptido lineal de 1.291 aminoácidos de 150.000 a 167.000 daltones (unos 5,7 S) para la de los *C. botulinum* A y B. Un puente disulfuro intracatenario, encorva a la cadena, dándole forma de "J". La activación a neurotoxina se produce por la separación de los dos extremos

de la cadena. Las proteasas SH-dependientes, como las bacterianas, la tripsina, pero no la quimiotripsina, cortan en un único punto a la prototoxina formando a partir del extremo C-terminal, una cadena H o pesada (de 97 a 105.000 daltones según el serotipo) que queda unida a la L o ligera (de 53 y 60.000 daltones) por unión no covalente y sobre todo por un puente disulfuro en la toxina A, que tiene una molécula de zinc y por dos en la toxina B. La reducción de los puentes disulfuro entre las dos cadenas separa dos fracciones con actividad antigénica diferente; la H de 104.000 d y la L de 59.000. La quimiotripsina separa en la holotoxina a la fracción H en dos partes una la H₁ de 50.000 d en la que radica la mayor actividad y otra de 100.000 d formada por la L y por la H₂, a la cual la tripsina separa la fracción H₂. Esta disposición de la toxina aumenta la neurotoxicidad. La toxina C₁ esta formada por dos proteínas no ligadas la I y la II.

La cadena H está constituida por la unión de una fracción llamada H₁ de unos 50.000 daltons en cuyo seno hay un puente disulfuro y la H₂ que se separa unida a la L, formando el complejo L-H₂, de unos 100.000 daltons, separables por la tripsina y por la quimiotripsina. Los pm de las subunidades H y la L son:

TABLA 2

<i>Tipo de toxina</i>	<i>Peso molecular de la cadena L (o fracción 1)</i>	<i>Peso miolecular de la cadena H (o fracción 2)</i>
A	53.000	97.000
B	59.000	104.000
Ca	53.000	98.000
D	60.000	110.000
E	50.000	102.000
F	56.000	105.000
G		

La destrucción o la reducción de los enlaces disulfuro con puffer de Nicotinadenina dinucleótido al 1% en solución de Cloruro sódico

0,5N o por el ditioneitol, suelta a las cadenas H que queden en el supernadante y a las L que se pueden separar por electroforesis en gel de acrilamida o bien dejando que se agreguen entre sí, precipitando cuando la concentración de toxina supera el mg/l salvo que, como pasa con la toxina tétanica, se adicione urea. La diálisis de una mezcla equimolecular de las cadenas H y L regenera el 40% de la neurotoxina.

Las neurotoxinas producidas por los clostridium, analizadas por clonación y secuenciación de genes, demuestra que tienen en común sólo algunos segmentos no consecutivos, localizados preferentemente en la cadena L. Las toxinas botulínica y tétanica tienen un segmento muy homólogo en la mitad de la cadena ligera (NH₂-terminal 50 k Da), que contiene el motivo ligado al zinc de la metaloendopeptidasas, HEXXH, que en cinco serotipos de la toxina botulínica, así como en la tétanica, quela al catión zinc, necesario para la catálisis. La HEXXH se ha sintetizado (Jongeneel y cols. 1989) actúa intracelularmente, lo que llevó a Schiavo y cols. (1992) a pensar que sería una endopeptidasa zinc-dependiente, cuya cadena L contiene la secuencia histidina-ácido glutámico-xaa-xaa-histidina típica de estas enzimas, que media la fijación a la proteína, siendo imprescindible para su toxicidad (Nieman y cols. 1994). Middelbrook y cols. demostraron que los inhibidores de las zinc-endopeptidasas bloquean la actividad intracelular de la toxina. Ello proporciona una prueba indirecta, pero muy convincente, de que la toxicidad celular radica en una actividad proteásica. Igualmente las cadenas L de las neurotoxinas tétanica y diftérica y la encefalina, que interviene en la inflamación y en la invasión y producción de metástasis de tumores malignos, así como en los subsiguientes procesos de reparación hística (proteasas de los PMN), son endopeptidasas zinc-dependientes, que cortan proteínas en puntos específicos.

Ihara y cols. (2003) demostraron que la neurotoxina de la cepa 111, la 111/NT, aislada de un caso de botulismo del lactante del serotipo B, tiene un 97,6% de homología y del 85,7% la de los aminoácidos con la neurotoxina de la cepa Okra aislada de un botulismo alimentario, diferencia que se traduce en cambios bioquímicos y antigénicos. La razón de sustitución de los no sinónimos respecto a la de los sinónimos fue 0,47. Las sustituciones de aminoácidos entre las toxinas 111/NT y Okra/NT tienen lugar preferentemente en

el dominio C terminal de la cadena pesada "H(C)" responsable de la unión con el complejo de proteína y gangliósido de su receptor.

Es posible que los Cl. botulinum A, B y E produzcan otras moléculas tóxicas de 9.000 a 18.000 daltones.

Se conocen cientos de inhibidores de las zincproteasas; el captopril inhibe específicamente la zinc-proteasa encargada de la conversión de la angiotensina en angiotensina, que abre vía para emplear antídotos.

Hay diversas toxitecas, siendo la más importante la del "American Type Culture Collection". Las tetraciclinas, los aminoglucósidos, espectinomocina, lincosamidas, polimixinas, penicilamina, quininas, bloqueantes de canales del calcio, acetilsalicílico, relajantes musculares, el ibuprofeno y la vitamina E potencian la acción de la toxina.

Las antitoxinas contienen anticuerpos contra ambas cadenas siendo los anti-H (constituidos por anti-H₁ y por anti-H₂) más potentes que los anti-L (Kozaki y cols. 1977, Krysinski y cols. 1980). Ambos anticuerpos son capaces de proteger al ratón frente a la neurotoxina. La BoNT/A y laBoNT/B sólo se neutralizan con sus correspondientes antitoxinas; la BoNT/D, la BoNT/F y la BoNT/E se neutralizan parcialmente con las antitoxina C y F.

GENÉTICA DE LA TOXICOGÉNESIS

Cada tipo de Cl. botulinum produce una neurotoxina principal, pero puede segregar otras en menor cantidad como la Af. La toxina se produce al expresarse los genes BoNT, de las toxinas A, B, E y G situados en plásmidos (Eklund y cols. 1988) en donde está también el gene de la toxina tetánica; los genes de las neurotoxinas A y B tienen un "open reading frame" de 3.873 pb que codifica la formación de una proteína de 1.291 aminoácidos que pesa 150.000 a 167.000 daltones (unos 5,7S) y tiene dos uniones sulfhidrilo intracatenarias. Los genes de las toxinas C y D están en el profago lisogénico llamado tox⁺. Algunos fagos tienen genes que codifican la toxina principal y otros fagos tienen genes que codifican otras toxinas menos específicas; la curación de una bacteria elimina un profago

pero no todos por lo que la bacteria continuará produciendo las otras toxinas; la ingeniería genética puede convertir un serotipo C en uno D o viceversa, o bien modificar la cantidad de toxina producida.

Para que se expresen los genes se requiere anaerobiosis, un pH superior a 4,6 (alimentos poco ácidos) y menos del 15% de sal. La adición de ornitina y citrulina aumenta la producción de toxina. También se requiere una temperatura superior a los 3°C. Para que una conserva sea tóxica si está a 10 a 20°C se necesitan varias semanas, mientras que a 28°C bastan 8 días; por eso los alimentos frescos no tienen suficiente toxina.

El calentamiento de las esporas a 70°C durante veinte minutos o bien adicionando a los cultivos de cepas C un suero antifago o naranja de acridina cura a algunas bacterias, perdiendo los genes BoNT. Los *C. botulinum* no toxigénicos pueden adquirir, si no tienen el fago tox+ la propiedad de fabricar toxina, incubándola con los lisados de un cultivo de bacilos toxigénicos estimulados por la Mitomicina C.

Las toxinas se sintetizan antes de que lo hagan las proteasas en las cepas que tienen estas enzimas y se producen a un pH bajo en el que se forma poco gas y pocas proteasas. Las cepas proteolíticas no forman toxina por debajo de pH 5 y con una concentración de cloruro sódico superior al 5%. La sal y los nitritos adicionados a los alimentos enlatados o en frascos, inhiben la producción de toxina.

Otros clostridia diferentes de los del botulismo pueden tener y expresar los genes codificadores de la neurotoxina botulínica y lógicamente podrían causar intoxicaciones botulínicas. Harvey y cols. (2002) describieron un caso de botulismo causado por la toxina F producida por un *Clostridium baratii*, y además los genes codificadores de las toxinas se pueden secuenciar, clonar e insertar en otras bacterias. (Eisel y cols. 1986, Fairweather y cols 1986, Hausor y cols. 1990, Binz y cols 1990, Binz y cols 1990, Thompson y cols. 1990, Whelan y cols 1992, Alison y cols. 1992, Campbell y cols. 1993), fabricando nuevos agentes productores del botulismo, aunque los experimentos de este tipo están prohibidos en muchas naciones entre ellas USA pero no hay prohibición internacional.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA TOXINA BOTULÍNICA

La toxina libre, ingerida con los alimentos, se destruye parcialmente por la masticación. La toxina incluida en los agregados está protegida del pH ácido y de la pepsina. En el intestino la tripsina libera y activa a la neurotoxina, acción necesaria para la toxicidad de las toxinas E y G, sin que modifique la toxicidad de la toxina D. Colaboran, en menor grado a la activación, otras enzimas digestivas y las proteasas segregadas por el *Cl. sporogenes* y por los propios *Cl. botulinum* proteolíticos (los A y algunos B y F). Prévot y cols. (1966) en una epidemia por el tipo D en el Tchad, en 1959 encontraron que el *C. botulinum* estaba asociado al *Bacillus licheniformis*, cuya proteasa aumentaba la toxicidad (aunque no la causaba la adición). La reiteración de las tomas de toxina aumentan los efectos; es posible que se trate del fenómeno de facilitación observado en el tétanos.

La toxina libre dispersada en el aire en forma de aerosoles está muy expuesta a su degradación y si lo está en complejos, la toxina no se activa por los enzimas digestivos.

La toxina no se une a extractos de cerebro como obtuvo Wassermann Takaki en el tétanos, pero si se fija en los sinaptosomas (Habermann, 1974) que son terminales nerviosos, obtenibles experimentalmente del cerebro de ratón que conservan gran parte de la estructura de la presinapsis, entre ellas las vesículas; es decir necesita para fijarse no solo componentes bioquímicos sino además estructuras. La afinidad para los sinaptosomas no es muy grande pero permite estudiar la fijación de la toxina; Schlavo y cols. (1983, 1989) usaron pequeñas vesículas muy purificadas obtenidas de cerebro de rata. Para el efecto tóxico se requiere la holotoxina (al igual que en la tetánica TaTx) lo que no hacen las cadenas H y L separadas).

El anclaje se efectúa por el dominio, esférico del extremo carboxilo terminal de la cadena H de las holotoxinas, botulínica (al igual que pasa con las toxinas diftérica y tetánica) a los receptores que son un complejo de una proteína de unos 200.000 daltones, encontrada en 1996 por Middlebrook y col., expresadas en la membrana de células de feocromocitoma de rata diferenciadas en sentido neuronal por la inducción ejercida por el factor de crecimiento nervioso NFG, unida a un esfingolípido. Similarmente otras toxinas

microbianas como la diftérica, tienen dominios estructurales que se unen, internan y realizan la actividad enzimática. La toxina botulínica fijada, como ocurre en el tétanos, no se neutraliza por la IgG, por lo que no se evita el bloqueo de la liberación de la acetilcolina.

La cadena H recombinante obtenida por la clonación en la *E coli* de los genes de la toxina 111/NT tiene una actividad ligante a la sinaptotagmina II, 4,2 veces menor que la de la Okra/NT. El híbrido de los extremos COOH-terminal de las cadenas H de las dos toxinas revela que la disminución de actividad ligante se debe a la mutación de 23 residuos en esa fracción (1029 1291) de la Okra/NT (Ihara y cols. 2003).

Los receptores son específicos de cada serotipo de toxina (De Black y cols. 1986, Simpson, 1989); están situados en regiones especializadas denominadas “coated pits” traducibles como “pozos revestidos” que se presentan concentrados en la membrana de las presinapsis colinérgicas y sobre todo en la de las placas motoras amielínicas de las que hay 150 a 500 por cada mm² de membrana muscular dispuestos. Basta la fijación a los receptores de cantidades extremadamente bajas de toxina para provocar la enfermedad. La estructura de estos receptores determina la diferente susceptibilidad de las especies e individuos. Las drogas lisosomotrópicas inhiben o al menos retrasan la parálisis botulínica, lo que hace pensar, que la toxina entra en las neuronas por el RME, vía utilizada por otras toxinas bacterianas, por muchas hormonas polipeptídicas, por factores de crecimiento, e incluso por algunos virus (Goldstein y cols. 1979).

La toxina entrada en las neuronas emigra centrípetamente por los filetes nerviosos y llega por los pares craneales, a los centros nerviosos, a los nervios autónomos (colinérgicos) y a la función neuromuscular lo que explica la parálisis flácida de los músculos intrínsecos y extrínsecos del ojo y de los deglutorios. La toxina de la sangre, no atraviesa la barrera hematoencefálica.

La toxina botulínica no modifica la síntesis de acetilcolina, no modifica el número de vesículas, ni su contenido en acetilcolina, ni inhibe a la colinesterasa, y no forma anticuerpos contra la acetilcolina pero impide que se libere suficiente acetilcolina capaz de contraer al músculo. A concentraciones mayores puede inhibir la libe-

ración de otros neurotransmisores como la noradrenalina (Habermann y cols. 1987). A diferencia de la parálisis por el curare, la inyección directa de acetilcolina en el músculo para que llegue a la placa neuromuscular, o aún mejor la introducción por iontoforesis de tetraetilamonio contrae al músculo igual que si se hubiera aplicado una corriente eléctrica.

Una vez unida la cadena H a su receptor, otro dominio contiguo de la H reduce el puente disulfuro separando la cadena L que tiene actividad Zn-endopeptidasa, translocándola al citoplasma, en donde se une a lugares específicos de cada serotipo de toxina en las membranas de las vesículas colinérgicas; las neuronas que tienen neurotransmisores distintos de la acetilcolina como los órganos con inervación adrenérgica no se afectan y en aquellos con transmisión mediada por la norepinefrina y por la acetilcolina sólo se afecta ésta (Wright).

La neurotoxina B se une y corta a la sinaptotagmina, proteína asociada a las vesículas permitiendo que entre la cadena L en las vesículas (Nishiki y cols. 1994), lo cual no implica necesariamente que este fenómeno sea el que interne a la toxina.

La neurotoxina A separa sólo nueve aminoácidos, menos del 5% de la porción carboxiterminal de la SNAP-25, esenciales para la neuroexocitosis. La toxina E la corta en otro punto, e igualmente impide la exocitosis.

Las dos isoformas de la sinaptobrevina proteína de la membrana de las vesículas, cuya motilidad electroforética es de 19K son cortadas (Schlavo y cols. 1992) al igual que lo hace la toxina tetánica, produciendo fragmentos de 12 y de 7 K en el topo y en el hombre, por las toxinas botulínicas B y F y por la tetánica, separando la glutamina de la lisina, la D hidroliza el enlace peptídico entre la lisina y la leucina. Las toxinas B, D y F en el ratón y en el pollo, cortan a la isoforma 1 a nivel de la valina y la de la 2 entre la glutamina y la fenilalanina; la eliminación de los extremos de la sinaptobrevina del SNAP-25, o de la sintaxina, impide que se una la vesícula a la membrana presináptica y la consiguiente exocitosis, lo que explica en parte la alta resistencia del ratón y del pollo y la baja del topo y del hombre en lo que interviene la diferente presencia de receptores de alta afinidad para las toxinas en la unión

neuromuscular. Al tratarse de una enzima catalítica, una sola cadena L puede cortar sucesivamente todas las moléculas de sinaptobrevina, de SNAP-25 o de la syntaxina, existentes en la terminación nerviosa, bastando menos de una molécula de toxina por célula para provocar la enfermedad y su persistencia pese a cesar el ingreso de toxina. La cadena L de cada serotipo como endopeptidasa actúa sobre una proteína SNARE o lo hacen sobre la misma proteína pero cortándolo en puntos diferentes, formando un complejo hetero-oligomérico, asociado con la membrana de las vesículas sinápticas con una parte exterior a las mismas, que impide la exocitosis.

La entrada de la cadena L en las vesículas, acidifica su contenido, gracias a la bomba protónica ATPásica de la membrana hasta un pH de 4,5. Algunas drogas o las aminas lisosomotrópicas, impiden la disminución del pH y casi siempre, inhiben la liberación de ligandos, hecho que es un marcador de endocitosis mediada por el receptor (1955).

El calcio de las vesículas se une a dos histidinas del segmento central conservado de la cadena L, como se preveía por su homología con las zincproteasas, impidiendo la acción del calcio sobre la membrana de las vesículas presinápticas inhibiendo, aún a concentraciones mínimas, la salida de acetilcolina de las vesículas, quedando interrumpida la transmisión nerviosa entre las neuronas motoras y muy selectivamente en la placa neuromuscular (Brin, 1997), causando parálisis flácida de los músculos inervados por el sistema nervioso periférico, como se ve en el preparado frénico-diafragma de rata o ratón y se altera la transmisión parasimpática.

Las proteínas GTP son el blanco intracelular preferido de las toxinas proteicas bacterianas. Las Rho GTPasas RhoA/B/C, Rac1/2 y la Cdc42 pertenecen a la superfamilia Ras de bajo pm, son las principales reguladoras del citoesqueleto de actina.

Las toxinas A y B del *Clostridium difficile*, causantes de la colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos son citotoxinas que actúan intracelularmente con las mono glicosiladas Rho GTPasas.

La toxina C3 del *Clostridium botulinum*, que no está relacionada con las neurotoxinas clostridiales, cataliza la ADP ribosilación de la RhoA/B/C pero no la de otras Rho GTPasas. La glicosilación así

como la ADP ribosilación inactiva al Rho disociando el citoesqueleto actínico (Just y cols. 2001).

En el caso de la toxina C_1 inyectada en un asa aislada de ratón, se une su componente II a la superficie de la células intestinales y hace que entre el componente I al interior de la célula (Ohishi, 1983), haciendo que se acumule líquido en el asa.

Al quedar inhibida la liberación de acetilcolina disminuyen los potenciales miniatura y el de placa causando parálisis muscular. La repetición del estímulo restablece el potencial de acción muscular (fenómeno de facilitación), lo que asemeja el modo de acción de la toxina al exceso de Mg o a la gran hipocalcemia o al bloqueo neuromuscular que causan algunos antibióticos o al síndrome de Lambert-Eaton. El veneno de la viuda negra aumenta la salida espontánea de calcio del músculo intoxicado por la toxina botulínica, pero no basta para restaurar la liberación normal de la acetilcolina lo que confirma que no es la concentración del calcio, sino su intervención en la exocitosis, como actúa la toxina botulínica. El estímulo repetitivo del nervio ulnar con 3 Hz no señala cambio de la amplitud, en el test de conducción nerviosa, mientras que el de 20 Hz señala un aumento mayor del 160%.

La microinyección de toxina en los pares de neuronas del ganglio bucal del molusco marino, *Aplysia californica*, bloquea la neuroexocitosis, efecto que requiere zinc.

La inyección de una mínima cantidad de toxina selectivamente en un músculo, lo debilita y atrofia por irreversible bloqueo de la liberación de acetilcolina en la placa motora efecto que persiste 2 a 20 días y que se restablece al cabo de 2 a 4 meses cuando una nueva terminal axónica haya restaurado la transmisión (Alderson y cols. 1991).

Para la curación es preciso que se inactive la toxina, y una vez logrado la célula debe sintetizar nuevamente su dotación de proteínas sinápticas dañadas por la toxina.

La toxina disminuye los potenciales miniatura, atrofia por denervación al músculo; las estimulaciones repetidas pueden hacer reaparecer un potencial de acción muscular (facilitación).

El efecto depende de la especie intoxicada, de la dosis total y de su reparto temporal y de los músculos afectados, siendo los oculares

los más sensibles. Una dosis dada administrada fragmentadamente es mas tóxica que si se hace de una vez.

La afectación postsináptica es secundaria; se producen lesiones de denervacion atrofia muscular alteraciones eléctricas. Debido a la mínima cantidad de toxina que normalmente entra en el organismo y que enseguida se fija sin que llegue a contactar con las células presentadoras del antígeno, como pasa con el tétanos, no produce anticuerpos.

La toxina tetánica también impide la salida de acetilcolina pero lo hace en la interneurona inhibidora lo que explica que en el tétanos la parálisis sea espástica, al estar interrumpido el circuito nervioso espinal que proporciona el adecuado equilibrio de la contracción de músculos opuestos, esencial para un movimiento armónico y controlado de las articulaciones.

USO TERAPÉUTICO DE LA TOXINA

En 1989 la FDA aprobó la toxina como “orphan drug” y autorizó hacer ensayos con un lote certificado de 200 mg fabricado en 1979 con la cepa Hall. La toxina se valora en nanogramos y más frecuentemente en unidades funcionales, es decir, su contenido en dosis letales medias para el ratón Webster de 18 a 20 g. La toxina más usada es la A aunque puede emplearse la B sobre todo si se desarrollan anticuerpos contra la A, mientras que la toxina F sólo tiene la mitad de eficacia que la del tipo A. La toxina botulínica A está comercializada bajo el nombre genérico de “botox®” procedente de USA, comercializada en viales con 0,5 ml de albumina humana y 0,5 ml de SS. El Laboratorio Allergan la obtiene bajo el nombre de Vistabel que por microfiltración y selección de las partículas de mayor tamaño enlentece la difusión de la toxina Botox. Otro preparado similar es el ingles Dysport ®. Si está liofilizada se recompone con solución salina, estéril sin conservantes y se debe inyectar antes de cuatro horas, manejándola cuidadosamente, ya que es termolabil y sensible a la agitación. Se van inyectando 0,1 a 0,5 ml de la solución, según el tamaño del músculo, de debilitación deseada y de la preparación comercial de la toxina. La cantidad que se inyecta es muy pequeña, varios nanogramos. Se mide en unidades funcionales,

que se corresponden a la dosis letal media para el ratón Webster de 18 a 20 g. Se inyecta en varias zonas de los músculos hipertrofiados o que se contraen activamente a la palpación. Al tratarse de productos importados, las toxinas son caras, unos 400 euros cada tratamiento medio. En general se suelen inyectar 0,1 a 0,5 ml de la solución, según el tamaño del músculo, del grado de debilitación requerido y del preparado comercial. Se inyecta en varias zonas de los músculos afectados. El efecto se manifiesta al cabo de unas horas, siendo máximo hacia los 20 días, pero al irse regenerando las sinapsis, cesa el efecto curativo de la toxina por lo que se debería reinyectar cada tres o cuatro meses para contrarrestar la hiperactividad de las sinapsis neoformadas, que restablecen el hiperestímulo de la placa motora. Aún cuando se recomienda poner la siguiente inyección no antes de seis meses aunque en algunas indicaciones se repite a los dos meses, desde los 25 a los 75 años. En el 2% de los casos la toxina no da resultado bien por mala técnica en su aplicación, por dosis insuficientes, por haberse alterado el producto o improbable por la producción de anticuerpos.

CONTRAINDICACIONES

La toxina botulínica está contraindicada en los pacientes con enfermedades neuromusculares como la miastenia gravis, la esclerosis lateral amiotrófica, en el síndrome de Eaton-Lambert ni en otros trastornos generalizados de la función muscular. Aunque no se han señalado efectos negativos, está clasificada como fármaco tipo C; no se debe administrar a embarazadas ni a madres lactantes. Si en los siete días anteriores se han inyectado tetraciclinas, aminoglucósidos, espectinomicina, lincosamidas, polimixinas, penicilamina, quininas, bloqueantes de canales del calcio, acetilsalicílico, relajantes musculares, ibuprofeno y vitamina E que potencian la acción de la toxina, debe demorarse la administración de ésta, así como si hay inflamación o infección en el punto de inyección, ni en pacientes en tratamiento con aminoglucósidos u otros fármacos que pueden interferir con la unión neuromuscular. No se ha encontrado toxicidad a largo plazo. Al ser ínfima la cantidad que se debe inyectar para la terapia no resulta peligrosa para los manipuladores que no necesitan ser vacunados.

El 10 al 15% de los tratados durante varios años, sobre todo si se administran dosis superiores a las necesarias para bloquear la sinapsis, el exceso pasa a sangre y puede afectar a sinapsis lejanas y estimular el sistema inmune, produciendo antitoxinas que disminuyen hasta anular el efecto, por lo que se deben utilizar las menores dosis capaces de cortar la liberación de acetilcolina, y ponerla en el sitio correcto. La dosis depende de cada grupo muscular y hay un rango en la dosis eficaz. Por ejemplo, para el blefaroplasmo la dosis es de 20 a 40 unidades. Para el esternocleidomastoideo de 75 a 1.440 U. A las dos semanas se ha producido alivio del dolor y mejora funcional. La inyección se realiza directamente en el músculo hiperactivo con una jeringuilla muy pequeña y una aguja muy fina. Se aplicarán los pinchazos necesarios en cada caso; para el blefaroplasmo varios en torno a los ojos en los párpados, en las cejas. La toxina debilita sin anularla la función de los músculos inyectados sin afectar a los vecinos. Normalmente, hay que repetir el tratamiento porque el efecto dura sólo entre cuatro y seis meses, debido a la producción de nuevas sinapsis hiperactivas. Aunque la cantidad es muy baja los viales desechados y vacíos, las jeringas o cualquier material que haya contactado con la toxina botulínica deben autoclavarse o ser tratados hipoclorito al 0,5% y los derrames recogidos con un paño absorbente empapado en hipoclorito.

EFFECTOS ADVERSOS

El pinchazo casi siempre cuando fue incorrecto, puede causar localmente hematoma, edema, dolor y eritema que desaparecen pronto. La toxina purificada no irrita ni causa inflamación. Las molestias locales dependen del volumen inyectado, de la concentración de la proteína y del pH de la solución. En el músculo puede aparecer atrofia, que repercute en debilidad y a veces fatiga generalizadas, sin necrosis muscular. No se ha publicado ningún efecto adverso a largo plazo durante los doce años que se está empleado. La cantidad inyectada es mucho menor que la que podría causar lesiones sistémicas y queda en el lugar de la inyección; en algunos casos se han presentado náuseas, vómitos, cefaleas, fatigas, trastornos y dificultad de la deglución, diplopia pasajera, disfagia, debilidad muscular, síntomas gripales, incontinencia urinaria y somnolen-

cia. Además la toxina que queda fuera de un músculo es degradada en pocas horas, de modo que no entra en contacto con el hígado, el riñón o el corazón, salvo si se inyectaran varios cientos de unidades que podrían producir parálisis neuromuscular en zonas alejadas, que si fueran los músculos respiratorios, requerirían respiración asistida, y sólo se sabe de algunos casos de diplopia pasajera, disfagia o debilidad muscular. Debido a la escasa cantidad introducida, a su fijación local y a su degeradación catabólica hace que sólo se produzca una sensibilización alérgica en el 2,6% de los casos, de la piel o generalizada, incluso anafiláctica que puede ser grave o una respuesta inflamatoria. La rara producción de anticuerpos neutralizantes de la toxina botulínica reducen la eficacia de las siguientes aplicaciones.

El Servicio de rehabilitación del Hospital Txagorritxu de Vitoria utiliza este protocolo para el consentimiento informado de los pacientes que van a recibir la toxina botulínica. Identificación. Médico informante. Fecha. **INFORMACIÓN SOBRE LA TOXINA BOTULÍNICA:** A Indicaciones: enfermedades que producen contracción mantenida de determinados músculos (Espasticidad) como trombosis o hemorragias cerebrales, parálisis cerebral, traumatismo cráneo-encefálico, esclerosis múltiple, tortícolis espasmódica, espasmo de media cara, espasmo de los párpados, etc.

Se aplica por vía intramuscular y su efecto dura de 2-4 meses. B: Alternativas: Aunque el equipo que le trata considera que en su caso concreto ésta es la mejor opción, existen otras posibilidades de tratamiento como son fisioterapia, medicación oral, bloqueos nerviosos, medicación intratecal, cirugía. C: Riesgos y complicaciones relativos a la indicación médica de espasticidad: En general las complicaciones se producen en los días siguientes a la inyección y tienen carácter transitorio. Efectos locales: El más frecuente es la debilidad muscular con posible aumento de caídas. Dolor localizado.

Sensibilidad y/o hematoma en el lugar de inyección. Dificultad para tragar.

Efectos sistémicos: Síntomas gripales. Reacciones alérgicas graves Fatiga excesiva. Debilidad muscular generalizada. Incontinencia urinaria. Vómitos. Somnolencia.

En caso de sobredosis puede producir parálisis neuromuscular distante y profunda. Si causara parálisis de músculos respiratorios, sería necesario respiración asistida.

Riesgos relacionados con sus circunstancias personales específicas.

Antes de firmar este documento, si desea más información o tiene cualquier duda, no tenga reparo en preguntarnos.

E. Declaro: Que he sido informado por el médico de las ventajas e inconvenientes del tratamiento y de que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento.

He comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para que se me administre la toxina botulínica. Firma del paciente. Firma del médico responsable de la información y en su caso representante legal.

La toxina botulínica se puede utilizar para tratar una serie de enfermedades oftálmicas, neurológicas, digestivas, urológicas e incluso cosméticas, aunque hay que ser prudentes al establecer resultados especialmente a largo plazo. Entre las indicaciones tenemos:

DISTONÍAS

Hay una amplia patología debida a la hiperactividad de la placa neuromuscular que causa distonías, que son síndromes caracterizados por la presentación de espasmos o contracciones intermitentes o más frecuentemente sostenidas de los músculos, que tienen aumentada su tensión y llegan a hipertrofiarse, a contraerse activamente al comprimirlos y a menudo causar dolor, torsiones, espasmos musculares dolorosos, rigidez y alteración del sueño, posturas anómalas que determinan impotencia y hasta anquilosis, rebajando la calidad de vida. Se deben a la afectación primaria de los ganglios basales especialmente del núcleo lenticular y del tálamo que excita al cortex desde donde parten los estímulos positivos sobre la placa muscular. La espasticidad puede afectar a cualquier músculo voluntario siendo frecuente en muchas enfermedades neurológicas de

adultos y niños. Las distonías se pueden clasificar por su repercusión sintomática, por la edad de inicio y sobre todo por los músculos afectados, de modo que puede ser focal, cuando afectan a un grupo limitado de músculos en alguna parte del cuerpo, la segmentaria cuando lo son dos o más grupos musculares contiguos y generalizada cuando abarcan a todos los grupos musculares, como la Distonía musculorum deformans, las enfermedades de Wilson, de Huntington, la de Hallervorden-Spatz y la Ataxia-telangiectasia.

La mayoría de las distonías son focales, afectando sólo a un área del cuerpo, como los ojos, una mano, el cuello o las extremidades; pueden ser extensa, como la distonía del cuello y los brazos, o bien ser multifocal, afectando a una extremidad superior y otra inferior del mismo o contrario lado o generalizada a todo el cuerpo. El calambre del escritor (o del músico) es una distonía focal en la que están contraídos temporalmente los músculos de la mano y del brazo durante la escritura, o al tocar algunos instrumentos similares, acto que a través del estrés de los movimientos repetitivos de la mano (favorecido por el cansancio psicológico) desencadena el espasmo. Otra distonía de las manos es la "mano talámica".

En las distonías no complicadas, se mantienen normales la conciencia y las funciones sensitivas e intelectuales. La distonía desaparece en el sueño y disminuye con la sedación, mientras que aumenta en los estados de tensión. Se ha descrito la presencia de mutaciones genéticas ligadas casi siempre a la distonía generalizada. La enfermedad de Wilson es una degeneración hepato-lenticular; la distonía suele aparecer en la infancia afectando a un pie o una pierna que luego suele afectar a otras partes del cuerpo. La mayoría de los casos son esporádicos pero algunos casos se deben a mutaciones de alguno de los cinco genes dominantes autosómicos; hay una distonía relacionada con una mutación genética es la que aparece en el parkinson mientras que otras tratable con dopa se acompaña de rigidez semejante a la del parkinson que comienza en infancia o en la juventud. En algunos casos existen antecedentes familiares de temblores de cabeza o manos. En algunos pacientes se han identificado lesiones del cerebro por anoxia por parte o fetales o del recién nacido o por microtraumas; algunos casos de espasticidad se han relacionado con microlesiones debidas a esclerosis múltiple, a encefalitis, a parálisis cerebral, que puede deformar el tronco y extremidades cau-

sando pie equino o a trombosis o hemorragias cerebrales, a esclerosis múltiple, o a traumatismos craneales o a otras enfermedades subyacentes a la exposición a drogas.

Las distonías afectan a 1 de cada 20.000 personas (se estima que en USA hay entre 50.000 a 100.000 pacientes), proporción que varía mucho para cada tipo de distonía y con el criterio diagnóstico, teniendo en cuenta que hay muchos casos leves que no se diagnostican y en otros que sólo lo son retrospectiva o tardíamente, habiéndose calculado que la distonía se diagnostica al cabo de 4 a 10 años (2 a 5 para la achalasia) de haber aparecido los síntomas. Es más frecuente en las mujeres, hasta tres veces más, en el caso del blefaroespas, y entre los 35 a los 50 años. La mayoría son esporádicos habiéndose identificado al menos cinco genes implicados en su presentación; un pequeño porcentaje se debe a traumas o aparece como efecto secundario de algunos medicamentos. Por otro lado tenemos distonías generalizadas como las que afectan a las personas que han sufrido parálisis cerebral.

Los tratamientos clásicos de las distonías son prácticamente de apoyo, pues son poco eficaces y duraderos y causan importantes reacciones adversas, en algunos casos graves. Los anticolinérgicos y los relajantes musculares son poco eficaces en las distonías focales. Se intentó bloquear la excitación del cortex mediante estímulos eléctricos. En espera de una prevención causal de tratamiento de la distonía y la de sus consecuencias se basa en impedir que la acetilcolina liberada por las terminaciones presinapsis sigan estimulando a los músculos por medio de la toxina botulínica inyectada, en cantidades ínfimas en los músculos contraídos. Las técnicas de microinyección y el uso de guías para colocar la aguja mejorará la precisión del lugar de la inyección y de la dosis, reduciendo la variabilidad de los efectos. La electromiografía puede aclarar cuáles son los músculos afectados en las distonías laríngeas, las de la mano, raramente en las del cuello, pero puede confundir en las demás distonías. Si hay disfagia la dieta debe ser blanda por el riesgo de aspiración.

DISTONÍA CERVICAL O TORTÍCOLIS ESPASMÓDICO

Es la distonía focal más común. Se debe a contracciones espasmódicas de los músculos de un lado del cuello que puede extenderse al hombro haciendo que la cabeza rote fijándose hacia un lado, hacia atrás o hacia abajo acompañándose de dolor. Hay escalas como la del "Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating" (TWSTRS) que tiene en cuenta la excusión máxima, dirección que toma la cabeza, el grado de rotación de ésta y del mentón. El 10% de los casos remite espontáneamente antes de un año, pero hasta el 87% de estos recaen en el siguiente año. Puede ser una manifestación de una distonía musculorum deformans.

La DC se trata con terapia física y bio-retroalimentación, con escasos resultados. Los tratamientos quirúrgicos comprenden lesiones estereotácticas, la miotomía del esternocleidomastoideo, la denervación periférica y el estimulación de la médula espinal (Shima y cols. 1988), generalmente producen beneficios modestos y pueden originar lesiones irreversibles. Se ha sugerido la talamotomía bilateral pero puede alterar el lenguaje. Los medicamentos empleados son los anticolinérgicos, las benzodiazepinas, el baclofeno, los neurolépticos, los antidepresivos tricíclicos y los depleccionadores de dopamina. Para Gauthier (1986), el 39,5% logra un beneficio significativo con anticolinérgicos, el 11% con baclofeno y el 21% con clonazepam, beneficio que queda a menudo sin efecto por la presentación de reacciones adversas.

Como las demás distonías focales, el tratamiento de elección de la distonía cervical es la toxina botulínica que alivia siempre el dolor y mejora la incapacidad funcional en el 65% de los casos. Antes de tratar a los enfermos debe determinarse los músculos que más contribuyen a la postura.

La toxina se inyecta en diferentes puntos de uno o más músculos que producen la desviación del cuello. La mejoría se aprecia entre el primer y el tercer día, manteniéndose entre 1 y 6 meses, por lo que hay que repetir las aplicaciones al menos pasados dos meses y mejor seis meses ajustando la dosis según los resultados de las anteriores tandas. Como reacciones adversas específicas de esta indicación tenemos la paresia de los músculos afectados, con debilidad del cuello,

disfagia o dificultad para deglutir en el 10% de los tratados que puede hacer necesaria la sonda nasogástrica y babeo.

El medicamento que da mejores resultados es la toxina botulínica en los músculos afectados (1990), introducida en 1984. Se inyecta un máximo de 200 U de toxina en los músculos del cuello que desvían al mismo, sin pasar de 50 U por músculo si se inyecta en dos y de 0,25 ml si se hace en tres músculos; a partir de las 20 horas a 3 días se aprecia mejoría que se mantiene entre 1 y 6 meses, pudiendo repetirse la pauta ajustando la dosis la eficaz de acuerdo con lo observado en la primera aplicación. El dolor se alivia siempre y la incapacidad funcional mejora en el 60 a 70% de los casos.

Las reinyecciones después de al menos dos meses puede ajustarse la dosis según los resultados de la primera pauta sin sobrepasar las dosis adecuadas.

PARÁLISIS ESPÁSTICAS

La toxina está indicada en los músculos espásticos de las cuatro extremidades, secuelas de la esclerosis múltiple y sobre todo de la parálisis cerebral, proceso que causa subnormalidad y deformidades muy invalidantes. El 10% se debe a anoxia al nacer y por ello es más frecuente en prematuros, pero la mayoría de los casos se debe a procesos perinatales. Su prevalencia es de unas 1.200 personas por cada 10^5 (1). La incidencia en el RU es de 250 por 10^5 nacidos vivos. La toxina botulínica inyectada en los músculos flexores del brazo y antebrazo rebaja su tonicidad, aumenta la amplitud de los movimientos y la función de las extremidades. Es un tratamiento muy efectivo y seguro para disminuir la contractura muscular, reducir la espasticidad y mejorar las funciones motoras. En la hemiplejía se puede inyectar intramuscularmente previa sedación, ya que las inyecciones son dolorosas 4 a 6 U/Kg con máximo de 15 sin sobrepasar las 1.000 U en cada paciente, en los músculos contraídos del miembro o miembros afectados, que facilita la limpieza por los cuidadores, la escritura y la manipulación de objetos durante 3 a 6 meses. La pauta se puede repetir a los dos meses. El tratamiento debe comenzarse antes de que se hayan producido acortamientos de los músculos y de los tendones, reduciendo las indicaciones quirúrgicas.

LUMBAGIA CRÓNICA

La toxina botulínica reduce al menos a la mitad el dolor durante una media de 6 meses. Foster y cols. (2001) encontraron en 31 pacientes que, a las 8 semanas, se redujo el dolor al menos un 50% (evaluado por escala analógica visual) en el 60%, mientras que en los no tratados fue de 12,5% ($p = 0,0009$). La mayoría de las escoliosis y de otras deformidades vertebrales se deben a distonías de los grandes músculos vertebrales para los que la toxina podría ser útil.

ESPASMO HEMIFACIAL

Se debe a la contracción irregular de los músculos de un lado de la cara. En realidad no es una distonía: con frecuencia se debe a una inflamación. La toxina botulínica reduce en un 95% la intensidad del dolor, y mejora en un 90% la movilidad y en un 94% el dolor de los pacientes con distonía cervical; la variación en la escala de Columbia permite objetivar la eficacia de la toxina botulínica.

DISTONÍA LARÍNGEA

O disfonía es la distonía focal que afecta a los músculos laríngeos con espasmo de las cuerdas vocales que dificultan el habla. La electromiografía podría ayudar a delimitar las zonas de mayor actividad de las cuerdas. Se trata inyectando una pequeña cantidad de toxina en los músculos contraídos. Algunos preconizan hacer electromiografía mientras que para otros puede dar resultados incorrectos. Una posible indicación es la de relajar al músculo de la vejiga urinaria cuando se requiere cateterismo, para soslayar la obstrucción debida a una contracción muscular intensa.

El síndrome de Meige es la distonía orofacial, u oromandibular, debida a la contracción irregular de los músculos de la parte inferior de la cara.

BLEFAROSPASMO

Es el cierre involuntario de uno o de ambos párpados, por hiperactividad de la placa motora de los músculos extrínsecos del ojo, contrayéndolos durante unos minutos a varias horas, causando ptosis palpebral. Se desencadena por una situación ansiosa o por el estímulo de la luz solar, o por el contacto con los párpados; la contracción se extiende a veces a los músculos de las mejillas y de las cejas. Fue atribuido a una alteración psíquica. En los casos graves, el paciente no puede parpadear y tiene que abrirse los ojos con las manos para poder ver. Los primeros síntomas suelen aparecer a los 50 ó 60 años.

En 1973 el oftalmólogo americano Alan Scott del Smith-Kettewell Institut de San Francisco ideó usar la toxina botulínica como terapia relajante en el blefarospasmo, basado en que debilitaba los músculos oculares de primates al inyectar localmente cantidades ínfimas de toxina botulínica intramuscularmente. La toxina es efectiva en el 80% de los casos y es de elección en este proceso. Para el blefaro espasmo unilateral se inyecta 0,05 a 0,1 ml (1 ml contiene 200 U) en varios puntos de los orbicularis oculi pretarsal medio y lateral del párpado superior y en el orbicularis oculi pretarsal lateral del párpado inferior con un total de 1,25 a 2,5 U, hace mejorar mucho los síntomas en el 98 de los casos. Las inyecciones se repiten cada 3 meses, pudiendo disminuirse la dosis o aumentarla hasta duplicarlas si la respuesta fue insatisfactoria, sin exceder las 100 U cada tres meses. Rara vez puede causar doble visión o sequedad ocular que desaparecen con el tiempo. Dosis superiores a las indicadas pueden presentarse efectos secundarios transitorios como la ptosis, hecho que se debe tener en cuenta en posteriores administraciones inyectando menor cantidad de toxina. La toxina A ha desplazado a la cirugía y a la farmacología que sólo producían beneficios marginales y algunas veces acarreaban importantes efectos secundarios.

ESTRABISMO

En 1971, Alan Scott después de haberlo estudiado en monos, trató el estrabismo inyectando la toxina botulínica en los músculos extraoculares en mayores de 12 años, 1,25 a 5 U con un volumen

máximo de 0,15 ml por músculo. Luego aplicaron este tratamiento Roggenkaemper en Dressler, Benecke en Alemania y Poewe y Auff en Austria. Andériz y col. (1999), entre otros, prefieren la toxina a la cirugía clásica para tratar la esotropía congénita. Scott en 1980 la empleó con control EMG audible, con dosis de 2,5 U, 3,75 U y 5 U según el ángulo de desviación, en una y en algunos casos dos aplicaciones. El tratamiento mejora la mirada cruzada de los pacientes, reduciendo la desviación horizontal media previa de 47,89 a la de 14,8, aunque puede ocasionar ptosis, hiper e hipotropías. Resultados similares son obtenidos por Mc Neer y cols. (1994) y por Gómez de Liaño y cols. (1996). Su utilidad parece mayor en la esotropía congénita en los 3 primeros años de vida, aunque la mayoría necesitó tratamiento quirúrgico.

ESPASTICIDAD BRAQUIAL

No está autorizado explícitamente el empleo de la toxina en esta distonía, que suele deberse a ictus. Es útil la inyección de 1.000 U de toxina distribuidas en los flexores común profundo y superficial de los dedos, en el cubital anterior, palmar mayor, y bíceps braquial, repitiendo la pauta cada 4 meses pero no antes de los dos meses.

PIE EQUINO

En esta y en otras deformidades del pie causadas por parálisis cerebral o por poliomielitis, las inyecciones locales de toxina debilitan a los músculos hiperactivos, disminuyen la espasticidad y mejoran sensiblemente la marcha al menos durante tres 3 meses con menos efectos adversos que las tablillas correctoras. La toxina no se debe aplicar hasta pasados los dos años.

ACHALASIA O ACALASIA

Es la distonía debida a la contracción permanente de la musculatura esofágica, generalmente del esfínter inferior, dificultando el tránsito alimenticio hacia el estómago, sin relajarse en respuesta a

la deglución, causando pérdida del peristaltismo con el consiguiente estasis de los alimentos y dilatación esofágica a la que se debe la mayoría de los síntomas. Fue descrito por Thomas Willis en 1679. Su incidencia al menos en EEUU y Europa es de 5 a 10 por 10⁶ habitantes (Wong y cols. 1989, Veme y cols. 1997. Niwamoto y cols. 1995) pensaron que podría deberse a un herpes virus humano o al del sarampión que negaron Birgisson y cols. (1997) al no haberlo visualizado en los plexos nerviosos ni en las neuronas del ganglio del vago; sí se han hallado anticuerpos anti-neurona entérica por Veme y cols. (1997). Sea cual fuere su causa, la base patogénica radica en la pérdida de neuronas en el plexo mioentérico del esfínter esofágico inferior, y en la degeneración de las células ganglionares que se rodean de leucocitos especialmente de eosinófilos (Goldblum y cols. 1994, 1996). La pérdida de neuronas en la región del esfínter esofágico inferior impide la relajación muscular, con aumento de presión sobre el esfínter.

La disfagia funcional es el síntoma más frecuente y está presente en el 97% de los pacientes (Moreno y cols. 1988, Desa y cols. 1990). Aparece al deglutir alimentos de diversa consistencia. Se puede lograr el paso de los alimentos retenidos, extendiendo los hombros y la cabeza hacia atrás, colocando los brazos detrás de la cabeza, realizando la maniobra de Valsalva, tragando repetidamente o ingiriendo líquidos. Una amplia mayoría de pacientes sufren de regurgitaciones que a menudo se confunden con las del reflujo gastroesofágico, que frecuentemente coexiste con la acalasia, pero el producto regurgitado no es ácido, ya que no procede del estómago. Es frecuente que la regurgitación se produzca durante el sueño favoreciendo la presentación de neumonía aspirativa, de absceso pulmonar y de bronquitis crónica. La tercera parte de los casos experimentan dolor torácico que suele irradiarse al cuello, hombros, brazos y espalda, que lleva a limitar la ingesta. El lactato producido por la fermentación anaerobia de los alimentos irrita al esófago y causa pirosis. Campos (1990) encontró en 27 pacientes con acalasia tratados en el Hospital Calderón Guardia estos síntomas cuya proporción depende de la antigüedad del proceso, de la observación detenida que se lleva en los hospitales, etc.

TABLA 3

<i>Síntoma</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Síntoma</i>	<i>Porcentaje</i>
Disfagia	100	Vómitos	52
Dolor torácico	44	Pérdida de peso	41
Reflujo	30	Epigastralgia	30
Tos	22		

El tratamiento se basa en la dilatación por un balón endoscópico que rompe las fibras musculares del esfínter inferior (Sanderson y cols. 1970, Levine y cols. 1991) aunque la mitad de ellos requiere una segunda dilatación en los siguientes 5 años (Gadric y cols. 1999) pero las sucesivas dilataciones tienen menos efecto (Csendes y cols. 1989, Hashimoto y cols. 2000) y causan la perforación del esófago en el 1,4% al 10% (Scott y cols. 1985, Wong y cols. 1995, Reynolds y col. 1989). La cirugía haciendo esofagomiotomía submucosa de Heller, anterior sola o asociada a la posterior (Spence y col. 1989, Yong-xian 1983, Hirashima y cols. 1978) con acceso laparoscópico o toracoscópico (Hunter y cols. 1997, Holzman y cols. 1997, Ancona y cols. 1995, Zanimotto y cols. 2000, Vogt y cols. 1997, Bowey y col. 2000, Nguyen y cols. 2000). La farmacología mediante la administración de nitritos, de antagonistas del calcio (Swamy, 1977). La isosorbide y la nifedipina alivian la sintomatología (Gelfond y cols. 1982) pero tienen efectos adversos. Por último tenemos la inyección de 80 U. de toxina botulínica por endoscopia, en el esfínter esofágico inferior, al suprimir el espasmo, es un tratamiento seguro, efectivo y simple de la acalasia, ya que sus efectos persisten bastantes meses (Pasricha y cols. 1993, 1996). Se ha visto que al igual que las dilataciones neumáticas, hay que repetir las aplicaciones, teniendo en cuenta que conforme aumentan éstas se reduce la respuesta. Su mayor indicación es en pacientes mayores con síntomas leves que no son candidatos para cirugía ni dilataciones (Amnese y cols. 1998, Vaezi y cols. 1999, Gordon, 1997).

Se investiga su empleo en la obesidad mórbida, en el parkinson, en el bruxismo, los tics faciales, el síndrome de Persona Rígida, el tartamudeo, en el dolor lumbar, en el síndrome de túnel carpiano, en la prevención de úlceras y en los espasmos de los músculos vaginales y en otras muchas enfermedades.

En el futuro podrá utilizarse la toxina y aún mejor su cadena H como una palanca para introducir en las neuronas otras sustancias como fracciones de otras toxinas o inmunoglobulinas activas contra una diana terapéutica concreta para tratar enfermedades neurológicas y mentales, para evitar la formación de placas de glutamato en la esquizofrenia o las placas amiloides en la encefalopatía espongi-forme, etc. Ya se dispone de un preparado de inmunotoxina-ricina mAb 35, compuesta por ricina conjugada a un anticuerpo monoclonal contra el receptor nicotínico de la acetilcolina del músculo estriado, para tratar distonías focales, probada por Christiansen y cols. (2002), inyectando en un recto superior del conejo 0,2 microg/kg de ricina mAb 35 sin que disminuyera el número de fibras. Las áreas del corte transversal son muy heterogéneas a los 56 días anomalías que al año habían desaparecido aunque continuaba la heterogenidad del grosor de las microfibrillas. Los cambios más significativos en la cadena pesada de la miosina (MHC) se dio en la capa orbital en la que a los 56 y 105 días había aumentado del número de miofibras rápidas y neonatales con disminución de las lentas. En la capa global al cabo de 105 días y de un año, estaban disminuidas siendo positivas la expresión de la MHC en las fibras lentas, neonatales y en las desarrolladas.

ARRUGAS

Son pliegues producidos en la piel como consecuencia de la contracción de pequeñas fibras musculares. Los pliegues pueden ser permanentes causados por el envejecimiento, y especialmente por la irradiación solar, es decir, por el fotoenvejecimiento o dermatoheliosis. Histológicamente es una inflamación crónica, caracterizada por elastosis, es decir, por el aumento de fibras elásticas que están degeneradas hasta convertirse en masas amorfas, por aumento de los glucosaminglicanos, hiperplasia e hipertrofia de los fibroblastos, presencia de abundantes mastocitos despigmentados, aumento de mononucleares y de histiocitos, con disminución y hasta desaparición de la colágena mientras que la epidermis está engrosada y con atipias. Sobre las arrugas permanentes, no mejorables por la toxina, hay otras dinámicas, causadas por el fruncimiento de los ojos, de la boca al reír, etc., causadas por la contracción de pequeñas fibras

musculares en la dermis facial. La repetición estereotipada de esos gestos aumentan y consolidan las arrugas. Las arrugas más importantes y frecuentes son las periorculares y las periorales.

La toxina botulínica es más eficaz para eliminar las arrugas dinámicas que aparecen alrededor de los ojos, a los lados de la boca, en la frente, en las bandas musculares del cuello y en la papada. La toxina inyectada en el frontal elimina las arrugas de la frente pero la frente cae sobre los ojos. La toxina se aplica por medio de cremas o de microinyecciones, efectuadas por un especialista, por medio de una aguja finísima en una sola sesión en las zonas elegidas con o sin anestesia tópica; las zonas tratadas suelen ser la interciliar, a 1 cm por encima de las cejas, en éstas, en las patas de gallo y en los músculos periorbitales, pero no en los labios porque puede causar dificultades al hablar y comer. La toxina paraliza los músculos faciales, desde las placas motoras, evitando su contracción manteniendo la expresión facial, ya que queda indemne la musculatura no tratada. También parece útil para eliminar las arrugas del cuello relacionadas con el envejecimiento. La sesión dura unos cuantos minutos, después de los cuales se puede hacer vida normal, incluso gesticular y mover los músculos inyectados, pero al menos durante cuatro horas el paciente no se debe acostar ni inclinar la cabeza para evitar el desplazamiento de la toxina; por esa razón no se deben dar masajes en la zona hasta pasadas 24 horas.

Es un tratamiento muy eficaz para eliminar el ceño fruncido, alisar la frente, mejorar patas de gallo que son arrugas dinámicas, para elevar la cola de las cejas y para elevar los párpados caídos. No se debe aplicar a personas con inestabilidad psicológica, pues quedan defraudadas sus expectativas sobre los resultados.

Los resultados se pueden apreciar a las 24-72 horas, siendo evidentes entre cuatro a ocho días, persistiendo 3 a 8 meses (media de cinco), siendo mayor en los jóvenes. Se puede repetir el tratamiento cuantas veces lo desee el paciente, aunque se debe alargar los intervalos, ya que las repeticiones pueden causar atrofas musculares. Como reacción adversa específica se puede producir debilidad en el punto de inyección y si se difunde a las placas motoras puede aparecer ptosis palpebral durante 2 a 4 semanas y pérdida de expresión de la frente.

La FDA denunció este uso de la toxina porque es un «flagrante ejemplo de promoción de una sustancia potencialmente tóxica para propósitos cosméticos». La Agencia Española del Medicamento y en consecuencia el Ministerio de Sanidad han aceptado el 18 de febrero de 2004 esta indicación.

PROCESOS ANALES

Hay una serie de procesos orgánicos como la fisura anal y otros como el absceso interesfinteriano, las complicaciones hemorroidales, los pólipos anales y los trastornos neurológicos secundarios a lesiones espinales y las afecciones pélvicas, la endometriosis, la prostatitis crónica y de otro lado patologías que no son orgánicas que producen dolor anal y alteraciones de la defecación que pueden ser tratados con la toxina botulínica. En la fisura del ano, la toxina botulínica hace desaparecer el dolor y acelera la cicatrización. La proctalgia fugax es un síndrome relacionado con el síndrome del intestino irritable más frecuente en hombres hacia la cuarentena, fue descrito en 1935 por Thaysen. Se caracteriza por dolor súbito, a menudo nocturno de tipo cólico, muy intenso, que dura menos de 20 minutos a nivel del esfínter anal externo. A veces se atenúa al doblar las rodillas sobre el abdomen o sentándose en el suelo en cuclillas. No se acompaña de alteraciones anorrectales. El proceso desaparece al cabo de unos años. La coccigodinia o síndrome del elevador, fue descrita en 1859 por Simpson como un dolor vago, continuo que se irradia hacia atrás y a los glúteos, “disconfort de estar sentado sobre una pelota” con exacerbaciones, que empeora con la sedestación y se alivia con la bipedestación, sin horario típico, siendo la palpación del coxis dolorosa. La prevalencia es mayor en mujeres de 50 a 70 años. El síndrome de periné descendente (SPD), o neuralgia pudenda. El DACI presenta dolor anal, perianal y perineal continuo, sensación de cuerpo extraño o de tenesmo, de predominio vespertino y a la palpación que se alivia con el decúbito y se exagera con la sedestación. La miopatía hipertrofica del esfínter interno es un proceso raro, descrito en 1991 como una proctalgia fugax y estreñimiento, hereditaria (Celik y cols. 1995).

Aparte de los analgésicos y de los antidepresivos, se han usado la esfínterotomía interna o la dilatación anal, por pensarse relaciona-

dos con hipertonia del esfínter anal o a complicaciones trombóticas recurrentes de hemorroides externas evanescentes, consiguiendo así, por lo general, poco alivio de los síntomas. Esto puede llevar a la estigmatización de los pacientes como portadores de lesiones recurrentes o de complicaciones post-quirúrgicas. El calor local, seco o húmedo, disminuye la presión anal basal, aunque este efecto es mayor entre los pacientes con lesiones o heridas anales que en los controles (Dodi y cols. 1986). La aplicación tópica de nitroglicerina tópica, que puede causar cefalea y es taquifiláctica, o de diltiazem tópico, mejor tolerado o 20 mg de nifedipino oral cada 12 h que reducen la presión anal en reposo en un 20% a 30%. El biofeedback se basa en que a cada contracción del esfínter externo le sigue una relajación refleja de ambos esfínteres, disminuyendo la presión basal junto con sesiones de reeducación trimestrales. Otra técnica es la electromodulación de las raíces sacras. Una alternativa puede ser la inyección de toxina botulínica en la masa del puborrectal (Hallan y cols. 1998) que reduce la presión anal basal y la de esfuerzo.

HIPERHIDROSIS

La producción de calor por el organismo es un proceso necesario para mantener la temperatura interna pero su exceso produce el temible golpe de calor; para evitarlo el organismo dispersa calórico por conducción, por convección y por la transpiratio insensibilis de unos 100 ml diarios de vapor de agua. Cuando se han superado esos mecanismos aún disponemos de la producción de sudor, que puede llegar a 50 ml por minuto durante un corto tiempo y hasta 12 litros al día. El sudor que se evapora arrastra calor de nuestra superficie. El sudor es producido por las glándulas sudoríparas controladas por el sistema nervioso simpático, de tipo colinérgico, controlado por centros hipotalámicos sobre los que actúan la temperatura ambiental, las emociones, especialmente por el miedo (la sudoración emocional, no se presenta durante el sueño), las situaciones estresantes y algunos alimentos. Una respuesta excesiva a estos estímulos aumenta el sudor especialmente en axilas, manos y pies ricas en glándulas. La hiperhidrosis no debida a la necesidad de eliminar calor puede ocasionar importantes trastornos psicológicos, perturbando la calidad de vida. La hiperhidrosis se trata con antiperspirantes tópicos como el

cloruro aluminico o aldehídos, con psicoterapia y con iontoforesis con agua del grifo, que son poco eficaces, y con anticolinérgicos que pueden ser tóxicos. La resección de la piel axilar y la simpatectomía torácica implican riesgos quirúrgicos. La toxina reduce la hipersecreción de sudor por las glándulas inervadas por el sistema parasimpático, por lo que constituye un método eficaz para la hiperhidrosis de axilas y palmas, al denervar funcionalmente a las glándulas sudoríparas, inyectando subcutáneamente 20 U. en cada uno de seis pinchazos, en cada palma y de 20 en cada axila, después de aplicar una crema anestésica. A los 3 a 7 días se reduce la cuarta parte de la sudoración que persiste 8 a 12 meses, sin que se produzca hiperhidrosis compensatoria en otras zonas. Dosis mayores difunden desde el pinchazo y pueden causar durante unos días, dificultades para deglutir y hasta para respirar y durante dos semanas debilidad de los músculos de la zona.

JAQUECA

Existe una teoría que atribuye a la contracción de los músculos de la frente la presentación de algunos casos de jaqueca, es decir, que sería una distonía para la cual Silberstein y cols. (2000) recomendaron hacer infiltraciones de 25 ó 75 U de toxina botulínica en la musculatura perifrontal para prevenir los accesos, pero aunque reduce la frecuencia y la intensidad de la cefalea, lo hace moderadamente y se presentan efectos secundarios mayores con 75 U. También se ha empleado en otras cefaleas esencialmente en la causada por la tensión de los músculos pericraneales.

TICS

Una frecuente distonía que afecta a personas de toda edad pero sobre todo a niños y jóvenes son los tics.

Los tics son movimientos involuntarios intermitentes de intensidad constante o fluctuante, que representan una prolongación de algunos movimientos rítmicos repetitivos, la mayoría complejos como guiñar un ojo, levantar un hombro, sacudir la cabeza, distor-

siones faciales, saltos o gestos obscenos (copropraxia) que pueden acompañarse de la expresión de obscenidades (coprolalia) o de repeticiones de palabras (ecolalia). En la mayoría de los casos duran unas pocas semanas desapareciendo espontáneamente. Un esfuerzo de la voluntad puede suprimir los espasmos, pero vuelven con mayor intensidad al relajarse la voluntad; los tics desaparecen con el sueño, sedantes, tranquilizantes o psicoterapia. Algunos tics son hereditarios, como la distonía paroxística, la coreoatetosis paroxística y la enfermedad de Lesch-Nyhan.

Los tics son más frecuentes en los enfermos mentales no debidos a lesiones de los ganglios basales ni de otras partes del cerebro. Pueden ser un efecto adverso de los fármacos antipsicóticos, fenotiacinas o butirofenonas. De las hidantoínas y algunos estimulantes, traumatismos, intoxicación por monóxido de carbono, encefalitis, epilepsia y corea. Aunque se ha sugerido la toxina como tratamiento de los "tics", no creemos que pueda ser eficaz.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ABBASOGLU, O. E.; SENER, E. C.; SANAC, A. S. (1996): Factors influencing success and dose-effect relation of botulinum A treatment. *Eye* 10: 385-391.
- (2) ADHAMI, T.; SHAY, S. S. (2001): Esophageal motility in fue assessment of esophageal function. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 13 (3): 234-240.
- (3) AGUILAR, L. A.; VALDOVINOS, M. A.; FLORES, C.; CARMONA, R.; VARGAS, F.; HERNÁNDEZ, M. F.; GARZA, L.; (1999): Evaluación prospectiva de reflujo gastroesofagico en pacientes con Acalasia tratados con dilatación neumática, miotomía torácica o abdominal. *Rev Invest Clin* 51: 345-350.
- (4) ALISON, K.; RICHARDSON, P. T.; ALLAWAY, D.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, T. A.; THOMPSON, D. E. (1992): Sequence of the gene encoding type F neurotoxin of *Clostridium botulinum*. *FEMS Microbiol Lett.* 96: 225-230.
- (5) AMNESE, V.; D'ONOFRIO, V.; ANDRIULLI, A. (1998): Botulinum toxin in long-term therapy for Acalasia. *Ann Intern Med*, 128: 696.
- (6) ANCONA, E.; ANSELMINO, M.; ZANIMOTTO, G. Y COLS. (1995): Esophageal achalasia: La-paroscopic versus conventional open Heller-Dor operation. *Am J Surg* 170: 265-270.
- (7) ANDERIZ, B.; CARDONA, L. (1999): Tratamiento de la esotropía congénita con toxina botulínica. *Archivos de la Soc Esp de Oftal N.º 11*.
- (8) ARCIDIACO, M.; PERRICELLI, D.; RUMI, A.; TESTONE, G.; POGGI, L. (1989): Esophageal achalasia. Diagnostic and therapeutic implications. *Ital J Surg Sci* 19: 331-336.

- (9) BIGLAN, A. W.; BURNSTINE, R. A.; ROGERS, G. L.; SAUNDERS, R. A. (1989): Management of strabismus with botulinum toxin. *Ophthalmology* 96: 935-943.
- (10) BINZ, T.; KURAZONO, H.; POPOFF, M. R. Y COLS. (1990): Nucleotide sequence of the gene encoding Clostridium botulinum neurotoxin type D. *Nucleic Acids Res.* 18: 5556-5557.
- (11) BINZ, T.; KURAZONO, H.; WILLE, M.; FREVERT, J.; WERNARS, K. NIEMAN, H. (1990): The complete sequence of botulinum neurotoxin type A Y comparison with otros clostridial neurotoxins. *J Biol Chem.* 265: 9153-9158.
- (12) BIRGISSON, S.; GALINSKI, M.; GOLDBLUM, J. Y COL. (1997): Achalasia is not associated with measles or known herpes and human papiloma viruses. *Dig Dis Sci* 42: 300-306.
- (13) BJORCK, S.; DEMEVIK, L.; GATZINSKY, P., SANDBERG, N. (1982): Oesophagocardiomyotomy and antireflux procedures. *Acta Chir Scand* 148: 525-529.
- (14) BOISSON, J.; DEBBASCH, L.; BENSUADE, A. (1966): Les algies anorectales essentielles. *Arch Fr Mal Appar Dig* 55: 3-24.
- (15) BOWEY, D.; PETERS, J. (2000): Laparoscopic esophageal surgery. *Surg Clin North Am* 80: 1213-1242.
- (16) BURKE, C. A.; ACHCAR, E.; FALK, G. W. (1997): Effect of pneumatic dilatation on gastroesophageal reflux in achalasia. *Dig Dis Sci* 42: 998-1002; 1997.
- (17) BURNS, C. L.; GAMMON, J. A.; GEMMILL, M. C. (1986): Ptosis associated with botulinum toxin treatment of strabismus and blepharospasm. *Ophthalmology* 93: 1.621-1.627.
- (18) CAMPBELL, K. D.; COLLINS, M. D.; EAST, A. K. (1993): Nucleotide sequence of the gene coding for Clostridium botulinum (Clostridium argentinense): type G neurotoxin: Genealogical comparison with otros clostridial neurotoxins. *Biochim Biophys Acta.* 1216: 487-491.
- (19) CAMPOS, A. (1990): Acalasia. *Acta Medica Costarricense* 33: 118-121.
- (20) Colegio de Médicos y Cirujanos de Costa Rica (2003): Estudio de 27 casos de acalasia en el Hospital "Calderón Guardia". *Acta Médica Costarricense.*
- (21) CHAN, J.; BRIN, M. F.; FAHN, S. (1991): Idiopathic cervical dystonia-clinical characteristics. *Mov Disord* 6: 119-126.
- (22) CHRISTIANSEN, J. (1998): Chronic idiopathic anal pain. *Eur J Surg.* 164: 83-88.
- (23) CHRISTIANSEN, J.; BRUUN, E.; SKJOLDBYE, B. (2001): Chronic idiopathic anal pain: Analysis of ultrasonography, pathology and treatment. *Dis Colon Rectum* 44: 661-665.
- (24) CHRISTIANSEN, S. P.; PETERSON, D.; TO, T.; YOULE, R.; McLOON, L. (2002): Long term effects of ricina mAb 35 on extraocular muscles of rabbits: potential treatment for strabismus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 679 85.
- (25) CSENDES, A.; BRAGHETTO L.; HENRIQUEZ, A.; CORTES, C. (1989): Late results of a prospective randomised study comparing forceful dilatation and oesophagomyotomy in patients with Acalasia. *Gut* 30: 299-304.
- (26) CUEVAS, C.; MADRAZO, I.; MAGALLON, E.; ZAMORANO, C. Y COL. (1995): Botulinum Toxin-A for the treatment of Hemifacial Spasm. *Arch Med Res* 26: 405-408.

- (27) DEMEESTER, T. R. (1982): Surgery for esophageal motor disorders. *Ano Thorac Surg* 34: 225-229.
- (28) DE OLIVEIRA, R.; REZENDE, F.; DANTAS, R.; LAZIGI, N. (1990): The spectrum of esophageal motor disorders in Chagas disease. *Am J Gastroenterol* 90: 1119-1124.
- (29) DESA, L. A.; SPENCER, J.; MCPHERSON, S. (1990): Surgery for achalasia cardia: the Dor operation. *Ann Royal College of Surgeons of England* 72: 128-131.
- (30) DOR, J.; HUMBERT, P.; PAOLI, J. M.; NOIRCLERC, M.; AUBERT, J. (1967): Traitement du reflux par la technique dite de Heller- Nissen modifiée. *Presse Med* 50: 2563-2565.
- (31) ECKARDT, V. F.; KOHNE, U.; JUNGINGER, T.; WESTERMEIER, T. (1997): Risk factors for diagnostic delay in achalasia. *Dig Dis Sci* 42: 580-585.
- (32) ECKARDT, V. F.; DODT, O.; KANZLER, G. Y COLS. (1996): Anorectal function and morphology in patients with sporadic proctalgia fugax. *Dis Colon Rectum* 39: 755-762.
- (33) Editorial (1990): American Academy of Neurology: Assessment: the clinical usefulness of botulinum toxin A in treating neurological disorders. Report of the Therapeutics and Technology sub-committee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 40: 1332-1336.
- (34) Editorial (1994): American Academy of Neurology. Assessment Subcommittee: Training guidelines for the use of botulinum toxin for the treatment of neurological disorders. *Neurology* 44: 2401-2403.
- (35) EISEL, U.; JARAUSCH, W.; GORETZKI, K. Y COL. (1986): Tetanus toxin: Primary structure, expression in E coli, and homology with botulinum toxins. *Embo J.* 10: 2495-2502.
- (36) ELLIS, F. H.; CROZIER, R. E.; GIBB, S. P. (1986): Reoperative achalasia Surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 859-65.
- (37) ELLIS, F. H.; CROZIER, R. E.; WATKINS, E. (1984): Operation for esophageal achalasia. Results of esophagomyotomy without an antireflux operation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 88: 344-351.
- (38) FAHN, S. (1986): Generalized dystonia: concept and treatment. *Clin Neuropharmacol* 9: S37-S48.
- (39) FAHN, S. (1988): Concept and classification of dystonia. *Adv Neurol* 50: 1-8.
- (40) FAHN, S. (1990): Recent concepts in the diagnosis and treatment of dystonias. In Chokroverty S, ed: *Movement Disorders*. Costa Mesa, CA; PMA Publishing Corp. 237-258.
- (41) FERGUSON, M. K. (1991): Achalasia: current evaluation and therapy. *Ano Thorac Surg* 52: 336-342.
- (42) FOSTER, L. Y COLS. (2001): Botulinum toxin A and chronic low back pain: A randomised, double blind study. *Neurology* 56, 1290-1293.
- (43) GADRIC, M.; SABATE, J. M.; ARTRU, P.; CHAUSSADE, S.; COUTURIER, D. (1999): Results of pneumatic dilatation in patients with dysphagia after antireflux surgery. *Br J Surg* 86(8): 1088-1091.
- (44) GAUTHIER, S. (1986): Idiopathic spasmodic torticollis. Pathophysiology and treatment. *Can J Neurol Sci* 1986; 13: 88-90.

- (45) GELFOND, M.; ROZEN, P.; GILAT, T. (1982): Isosorbide dinitrate and nifedipine treatment of achalasi: a clinical, manometric and radionuclide evaluation. *Gastroenterology* 83: 963-969.
- (46) GOLDBLUM, J. R.; WHYTE, R. I.; ORRINGER, M. B.; APPELMAN, I. D. (1994): Achalasia. A morphologic study of 42 resected specimens. *Am J Surg Pathol* 18: 327-337.
- (47) GOLDBLUM, J. R.; RICE, T. W.; RICHTER, J. E. (1996): Histopathologic features in esop-hagomyotomy specimens from patients with achalasia. *Gastroenterology* 111: 648-654.
- (48) GOLDSTEIN, J. L.; YERSON, R. G.W.; BROWN, M. S. (1979): Coated pits, coated vesicles Y receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 279: 679-689.
- (49) GÓMEZ DE LIAÑO SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, J. M.; DE ANDRÉS, M. L. Y COL. (1996): Tratamiento del estrabismo convergente con cirugía o con toxina botulínica. *Acta Estrabológica* 1996; 25: 147-153.
- (50) GÓMEZ VILLAESCUSA, F.; GARCÍA GARCÍA, N.; ARIAS LÓPEZ, M. C. (1996): Estudio de pacientes inicialmente tratados con toxina botulínica y que han precisado cirugía convencional. *Acta Estrabológica* 25: 107-153.
- (51) GORDON, M.; EAKER, E. Y. (1997): Prospective study of esophageal botulinum toxin injection in high risk. *Dig Dis Sci*. 42: 724-7.
- (52) GRIMAUD, J. C.; BOUVIER, M.; NAUDY, B. Y COLS. (1991): Manometric and radiologic investigations and biofeed-back treatment of chronic idiopathic anal pain. *Dis Colon Rectum*; 34: 690-695.
- (53) HABERMANN, E. (1974): ¹²⁵I labeled neurotoxin from Clostridium botulinu A. *Arch Pharmakol*. 281: 47.
- (54) HABERMANN, E. (1989): Clostridial neurotoxins and the central nervous system: Funcional studies on isolated preparations. En: Simpson LL, ed. Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin. New York, NY: *Academic Press, Inc.* 53-67.
- (55) HARVEY, S. M.; STURGEON, J.; DASSEY, D. E. (2002): Botulism due to Clostridium baratii type F toxin. *J Clin Microbiol*. 40: 2260-2.
- (56) HASHIMOTO, T.; UCHIDA, Y.; NOGUCHI, T.; TAHARA, K. (2000): Clinical management of esophageal achalasia. *Nippon Geka Gakkai Zashi* 101: 342-344.
- (57) HAUSOR, D.; POPOFF, M. R.; KURAZONO, H. Y COL. (1990): Complete sequence of botulinal C1 neurotoxin. *Nucleic Acids Res*. 18: 4924-4928.
- (58) HENDERSON, R. D.; RYDER, D. E. (1982): Reflux Control Following myotomy in diffuse Esophageal Spasm. *Ano Thorac Surg* 34 (3): 230-236.
- (59) HIRASHIMA, T.; SATO, H.; RARA, T.; NAKAMURA, H.; KAWAMURA, L.; TAKEUCHI, H.; MUTO, M.; OHKAWA, H. (1978): Results of Esophagocardioplasty with Gastric Pouch in the Treatment of Esophageal Achalasia. *Ann Surg* 188: 38-42.
- (60) HOLZMAN, M. D.; SHARP, K. W.; ELLER, R. F. (1997): Laparoscopic surgical treatment of achalasia. *Am J Surg* 173: 308-311.
- (61) HOOGERWERF, W. A. PASRICHA, P. J. (2000): Achalasia: treatment options revisited. *Can J Gastroenterology* 14: 406-409.

- (62) HOWARD, P. J.; MAHER, L.; PRYDE, A. Y COLS. (1992): Five year prospective study of in-cidence, clinical features and diagnosis of achalasia in Edinburg. *Gut* 33: 1011-1015.
- (63) HUNTER, J. G.; TRUS, T. L.; BRANUM, G. D.; WARING, J. P. (1997): Laparoscopic Heller myotomy and funduplication for achalasia. *Ann Surg* 225: 655-664.
- (64) IHARA, H.; KOHDA, T.; MORIMOTO, F.; TSUKAMOTO, K.; KARASAWA, T.; NAKAMURA, S.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S. (2003): Sequence of the gene for Clostridium botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C terminal half of heavy chain and its binding activity. *Biochim Biophys Acta*. 1625: 19-26.
- (65) JANKOVIC, J.; ORMAN, J. (1987): Botulinum A Toxin for cranial - cervical dystonia: a double-blind, placebo - controlled study. *Neurology* 37: 616-623.
- (66) JARA, F. M.; TOLEDO-PEREIRA, L. H.; MAGILLIGAN, D. J. (1979): Long-term results of esophagomyotomy for Achalasia of esophagus. *Arch Surg* 114: 935-936.
- (67) JONGENEEL, C. V.; BOUVIER, J.; BAIROCH, A. (2001): A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett*. 242: 211-214.
- (68) JORDAN, P. H. (2001): Long-term results of esophageal myotomy for achalasia. *J Am Coll Surg* 193: 137-145.
- (69) JUST, I.; HOFMANN, F.; GENTH, H.; GERHARD, R. (2001): Bacterial protein toxins inhibiting low molecular mass GTP binding proteins. *Int J Med Microbiol*. 291: 243-50.
- (70) KAMM, M. A.; HOYLE, C. H. V.; BURLEIGH, D. E. (1991): Hereditary internal anal sphincter myopathy causing proctalga fugax and constipation. *Gastroenterology* 100: 805-810.
- (71) KJELLIN, A. P.; GRANQVIST, S.; RAMEL, S.; THOR, K. B. (1999): Laparoscopic myotomy without funduplication in patients with achalasia. *Eur J Surg* 165: 1162-1166.
- (72) LEVINE, M. L.; MOSKOWITZ, G. W.; DORF, D. S.; BANK, S. (1991): Pneumatic dilatation in patients with achalasia with modified Gruntzig dilator (Levine): under direct endoscopic control. Results after 5 years. *Am J Gastroenterology* 86: 1581.
- (73) LIMMROTH, V.; MICHEL, M. C. (2000): The prevention of migraine: a critical review with special emphasis on beta-adrenoceptor blockers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52: 237-243.
- (74) MAGNI, G.; BERTOLINI, C.; DODI, G. (1986): Douleur perianal chronique: Considerations psychopathologiques caracteristiques. *Psicopathologie* 19: 170-174.
- (75) Mainieri-Hidalgo, J. A.; Schmitz-Gerstlauer, I.; Mainieri-Breedy, G. (2002): *Rev Mex Neuroci* 3: 23325.
- (76) MARTÍ, M. J.; KULISEVSKY, J.; TOLOSA, E. (1987): Tratamiento del blefarospasmo distónico y el espasmo hemifacial con toxina botulinica *Med Clin (Barc)*: 89: 321-323.

- (77) MAULLON, J.; THOUMAS, D.; LEROI, A. M. Y COLS. (1999): Results of pudendal nerve neurolysis-transposition in twelve patients suffering from pudendal neuralgia. *Dis Colon Rectum* 42: 186-192.
- (78) McNEER, K. W.; SPENCER, R. F.; TUCKER, M. G. (1994): Observations on bilateral simultaneous botulinum toxin injection in infantile esotropia. *J Pediatric Ophthalmol Strabismus* 31: 214-219.
- (79) MIDDLEBROOK, J. L. (1989): Cell surface receptors for protein toxins. In: Simpson LL, ed. *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. New York, NY: *Academic Press Inc.* 95-119.
- (80) MIDDLEBROOK, J. L. (1993): Contribuciones of the U.S. Army to botulinum toxin research. En Das Gupta B, ed. *Botulinum and Tetanus Neurotoxins Y Biomedical Aspects*. New York, NY: *Plenum Press* 515-519.
- (81) MIDDLEBROOK, J. L. (1996): Franz Inv y C Marzo.
- (82) MONNI, S.; RODDI, R.; BROCCARDO, M.; TURCI, R.; SAMPIETRO, L.; VILLA, E. M. (1984): Prevention of gastroesophageal reflux. Validity of hemifunduplica-tion according to Cor-Casolo *Chir Ital* 36: 151-178.
- (83) MORENO, E.; GARCÍA, A.; GARCÍA, L.; GÓMEZ, M.; RICO, P.; JOVER, J. M.; ARIAS, J. (1988): Results of Surgical Treatment of Esophageal Achalasia. Multicen-tric Retrospective Study of 1.856 Cases. *Int Surg* 73: 69-77.
- (84) MOSCA, F.; CONSOLI, A.; LATTERI, S. (1992): Esophageal achalasia: cardiomyo-tomy or pneumatic dilation? *Minerva Chir* 47: 1421-1428.
- (85) NEILL, M. E.; SWASH, M. (1982): Chronic perianal pain: An unsolved pro-blem. *J R Soc Med* 75: 96-101.
- (86) NGUYEN, N. T.; WANG, P.; FOLLETT, D. (2000): Laparoscopy or thoracoscopy for achalasia. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 12 (3): 201-5.
- (87) NICOSIA, J. F.; ABCARIAN, H. (1985): Levator syndrome. A treatment that wor-ks. *Dis Colon Rectum* 28: 406-408.
- (88) NIWAMOTO, H.; OKAMOTO, E.; FUJIMOTO, J. (1995): Are human herpes virus or meas-les associated with esophageal achalasia? *Dig Dis Sci* 40: 859-863.
- (89) ORRINGER, M. B.; ORRINGER, J. S. (1982): Esophagectomy: Definitive Treat-ment for Esophageal Neuromotor Dysfunction. *Ann Thorac Surg* 34: 237-248.
- (90) OTT, D. J.; RICHTER, J. E.; CHEN, Y. M. Y COL. (1987): Esophageal radiography and mano-metry: Correlation 172 patients with dysphagia. *AJR* 149: 307-311.
- (91) PAIG, G. P.; ELLISON, R. G.; RUBIN, J. W.; MOORE, H. V. (1984): Two decades of experience with modified Heller's myotomy for achalasia. *Ann Thorac Surg* 38: 201-206.
- (92) PARICHA, P. J.; RAI, R.; RAVICH, W. J. Y COL. (1996): Botulinum toxin for achalasia. Long-term outcome and predictors of response. *Gastroenterology* 110: 1410-1415.
- (93) PASRICHA, P. J.; RAVICH, W. J.; KALOO, A. N. (1993): Effects of intraesphinc-teric botulinum toxin on the lower esophageal sphincter in piglets. *Gas-troenterology* 105: 1045-1049.

- (94) PATER, J. B.; LEE, J. P. (1992): The value of high quality Electromyographic monitoring for botulinum toxin therapy. *ESA*.
- (95) RICHTER, J. E. (1995): Motility disorders of the esophagus. En: Yamada T, Alpers DH, Owyang C, Powel DW, Silverstein FES. Eds. *Textbook of Gastroenterology*. Vol. 1 (2.^a ed.): Philadelphia, JB Lippencott Comp. 1174-1213.
- (96) REYNOLDS, J. C.; PARKMAN, H. P. (1989): Achalasia. *Gastroenterol Clin North Am* 18: 223-255.
- (97) RICHARDS, W. O.; CLEMENTS, R. H.; WANG, P. C.; LIND, C. D.; MERTZ, H.; LADIPO, J. K.; HOLZMAN, M. D.; SHARP, K. W. (1999): Prevalence of gastroesophageal reflux after laparoscopic Heller myotomy. *Surg Endosc* 13: 1010-1014.
- (98) RODRÍGUEZ, J. M.; GÓMEZ DE LIAÑO, P.; GÓMEZ DE LIAÑO, R. (1992): Tratamiento del estrabismo con toxina botulínica. *Acta Estrabológica* 1992; 21-27.
- (99) ROSSY, L. A.; BUCKELEW, S. P.; DORR, N. Y COLS. (1999): A meta-analysis of fibromyalgia treatment interventions. *Ann Behav Med* 21: 180-191.
- (100) SANDERSON, D. R.; ELLIS, F. H.; OLSEN, A. M. (1970): Achalasia of the esophagus: Re-sults of therapy by dilatation. 1950-1967. *Chest*. 58: 116-21.
- (101) SANDLER, R. S.; NYREN, O.; EKBOM, A. Y COL. (1996): The risk of esophageal cancer in patients with achalasia: A population-based study. *JAMA* 274: 359-362.
- (102) SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A. (1992): Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in Medicine. *Microbiol Rev* 56: 80-99.
- (103) SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B. Y COL. (1992): Tetanus Y botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 359: 832-835.
- (104) SCOTT, A. B. (1980): Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatric Ophthalmol Strabismus* 17: 21-25.
- (105) SCOTT, A. B. (1989): Botulinum toxin treatment of strabismus. Focal points. *Clinical Modules for Ophthalmologists*. San Francisco, American Academy of Ophthalmology. 7: 1-11.
- (106) SCOTT, A. B.; MAGOON, E. H.; MCNEER, K. W. Y COL. (1997): Botulinum toxin of childhood strabismus. *Ophthalmology* 1990; 97: 1435-1438; SHOENUT, F.; DUERKSEN, D., YAFFE, C. S. (1990): A prospective assesement of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 92: 1109-1112.
- (107) SHIINO, Y.; FILIPI, C. J.; AWARD, Z. T.; TOMONAGA, T.; MARSH, R. E. (1999): Surgery for achalasia. *J GastroIntest Surg* 3: 447-455.
- (108) SHIMA, F.; FUKUI, M.; KITAMURA, K.; KUROMATSU, C.; OKAMURA, T. (1988): Diagnosis and surgical treatment of spasmodic torticollis of the nerve origin. *Neurosurgery* 22: 358-363.
- (109) SILBERSTEIN, S. Y COLS. (2000): Botulinum toxin type as a migraine preventive treatment 40: 445-450.
- (110) SIMPSON, L. L. (1989): Peripheral accions of the botulinum toxins. En Simpson LL, ed. *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. New York, NY: Academic Press Inc 153-178.

- (111) SPENCE, P. (1989): Heller's Contribution to the surgical treatment of achalasia of the esophagus. *Ann Thorac Surg* 48: 876-881.
- (112) STEIN, H. J.; KORN, O.; LIEBERMANN-MEFFERT, D. (1995): Manometric vector volume analysis to assess lower esophageal sphincter function. *Ann Chir Gynaecol* 84 (2): 151-8.
- (113) STREITZ, M.; EILIS, F. H.; GIPP, S. P.; HEATLEY, G. M. (1995): Achalasia and squamous cell carcinoma of the esophagus: analysis of 241 patients. *Ann Thorac Surg* 59: 1604-1609.
- (114) SWAMY, N. (1977): Esophageal spasm: clinical and manometric response to nitroglycerine and long acting nitrites. *Gastroenterology* 72 (1): 23-27.
- (115) THOMPSON, D. E.; BREHM, J. K.; OULTRAM, J. D. Y COL. (1990): The complete amino acid sequence of the Clostridium botulinum type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. *Eur J Biochem.* 189: 73-81.
- (116) TRACEY, J. P.; TRAUBE, M. (1994): Difficulties in the diagnosis of pseudoachalasia. *Am J Gastroenterol* 89: 2014-2019.
- (117) VAEZI, M. F.; RICHTER, J. E.; WILCOX, C. M. Y COL. (1999): Botulinum toxin versus pneumatic dilation in the treatment of achalasia: A randomised trial. *Gut* 44: 231-239.
- (118) VEME, G.; SALLUSTIO, J.; BAKER, E. (1997): Anti-myenteric antibodies in patients with achalasia. A prospective study. *Dig Dis Sci* 42: 307-313.
- (119) WHELAN, S. M.; ELMORE, M. J.; BODSWORTH, N. J.; ATKINSON, T.; MINTON, N. P. (1992): The complete amino acid sequence of the Clostridium botulinum type-E neurotoxin, derived by nucleotide-sequence analysis of the encoding gene. *Eur J Biochem.* 204: 657-667.
- (120) VOGT, D.; CURET, M.; PITCHER, M. Y COL. (1997): Successful treatment of esophageal Achalasia with laparoscopic Heller myotomy and Toupet fundoplication. *Am J Surg* 174: 709-714.
- (121) WONG, R. K.; MAYDONOVITCH, C. L. (1995): Achalasia. In: The esophagus, 2nd ed, Castel, Do (Ed), Little Brown, Boston.
- (122) WONG, R.; MAYDONOVITCH, C.; METZ, S.; BAKER, J. (1989): Significant DQW1 association in achalasia. *Dig Dis Sci* 34: 349-352.
- (123) YONG-XIAN, Y. (1983): Treatment of Esophageal Achalasia (Cardiospasm): with Diaphragmatic Graft: Report of 44 Patients. *Ann Thorac Surg* 35: 249-252.
- (124) ZAAIJER, J. (1923): Cardiospasm in the aged. *Ann Surg.* 77; 615.
- (125) ZANIMOTTO, G.; COSTANTINI, M.; MOLENA, D.; BUIN, F.; CARTA, A.; NICOLETTI, L.; ANCONA, E. (2000): Treatment of esophageal Achalasia with laparoscopic Heller myotomy and Dor partial anterior fundoplication: prospective evaluation of 100 consecutive patients. *J Gastrointest Surg* 4: 282-289.