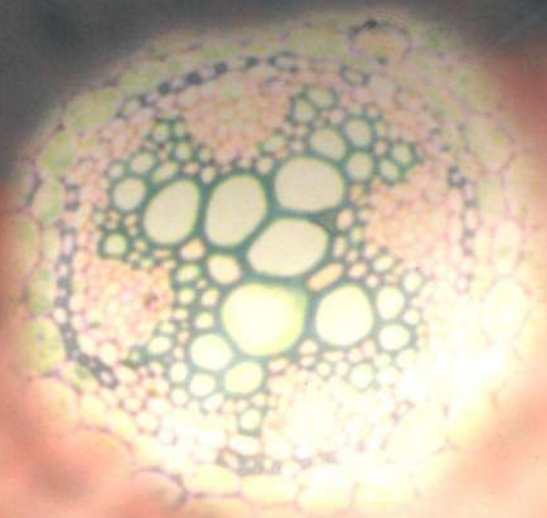


JOSÉ BELLO GUTIÉRREZ
ADELA LÓPEZ DE CERAIN SALSAMENDI

FUNDAMENTOS DE CIENCIA TOXICOLÓGICA



FUNDAMENTOS DE CIENCIA TOXICOLOGICA

JOSÉ BELLO GUTIÉRREZ
ADELA LÓPEZ DE CERAIN SALSAMENDI
Profesores del Departamento de Bromatología, Tecnología de Alimentos
y Toxicología. Universidad de Navarra

FUNDAMENTOS DE CIENCIA TOXICOLOGICA



© José Bello Gutiérrez y Adela López de Cerain Salsamendi, 2001

Reservados todos los derechos.

«No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright.»

Ediciones Díaz de Santos, S. A.
Juan Bravo, 3-A
28006 Madrid (España)
Internet: <http://www.diazdesantos.es>
E-Mail: ediciones@diazdesantos.es

ISBN: 978-84-7978-472-0
Depósito legal: M. 5.523-2001

Diseño Cubierta: A. Calvete
Fotocomposición: Fer Fotocomposición, S. A.
Impresión: Edigrafos, S. A.
Encuadernación: Rustica-Hilo, S.L.

PRINTED IN SPAIN - IMPRESO EN ESPAÑA

Contenido

Presentación.....	XIII
--------------------------	-------------

PARTE I **INTRODUCCIÓN A LA CIENCIA TOXICOLÓGICA**

1. Panorama actual de la Toxicología.....	3
Concepto de toxicología.....	3
Breve desarrollo histórico de la toxicología.....	6
Objetivos actuales de la toxicología.....	13
Carácter multidisciplinar de la toxicología.....	15
Áreas fundamentales de la toxicología moderna.....	17
Principales ramas aplicadas de la toxicología: forense, clínica, ocupacional, ambiental, alimentaria.....	18
 2. Aspectos cualitativos y cuantitativos de la toxicología.....	 25
Concepto de tóxico.....	25
Clasificación de los agentes tóxicos.....	27
Concepto de intoxicación.....	28
Tipos de intoxicaciones.....	28
Concepto de toxicidad.....	32
Criterios aplicables al estudio de la toxicidad.....	34
Relaciones efecto-dosis-tiempo.....	37
Conceptos de selectividad, sensibilidad y margen de seguridad.....	42
Factores moleculares que influyen en la toxicidad de una sustancia.....	45

PARTE II

ASPECTOS GENERALES DEL FENÓMENO TÓXICO

3. Etapas que caracterizan al fenómeno tóxico: fase de exposición y fase toxicocinética.....	53
Consideraciones generales	53
La fase de exposición: disponibilidad física y absorción del tóxico...	55
Los procesos involucrados en la fase toxicocinética	64
4. Los procesos de biotransformación del tóxico.....	75
Consideraciones generales	75
Reacciones implicadas en la Fase I.....	78
Reacciones implicadas en la Fase II	90
Factores biológicos y ambientales que influyen en la cinética de la biotransformación	98
Implicaciones derivadas de la biotransformación de un xenobiótico	105
5. Fase tóxicodinámica.....	109
Características de la fase tóxicodinámica	109
Principales tipos de reacciones involucradas en los efectos tóxicos de los xenobióticos.....	113
Principales tipos de daños provocados por los xenobióticos sobre las funciones celulares	119

PARTE III

PRINCIPALES TIPOS DE EFECTOS TÓXICOS INDUCIDOS POR XENOBIÓTICOS

6. Mutagénesis	127
Consideraciones generales	127
Desarrollo histórico de la Toxicología genética	128
Mutagénesis	129
Tipos de efectos mutagénicos	132
Mecanismos moleculares	137
Impacto sobre la salud humana	140
Evaluación de la mutagenicidad	141
Modelos transgénicos.....	150
Valor predictivo de los ensayos de mutagenicidad.....	152

7. Carcinogénesis química	155
Introducción	155
Perspectiva histórica	156
Definición de agente carcinogénico	157
Mecanismos y etapas de la carcinogénesis	163
Tipos de carcinógenos	169
Evaluación de la carcinogenicidad	177
8. Teratogénesis	181
Concepto de teratogénesis, toxicología del desarrollo, toxicología de la reproducción	181
Desarrollo histórico	182
Principios que rigen la teratología	183
Principales factores que modulan la teratogenicidad	184
Manifestaciones de las alteraciones en el desarrollo	192
Evaluación de la teratogenicidad: ensayos con animales, métodos <i>in vitro</i> , estudios epidemiológicos	194
Principales xenobióticos teratogénicos	199
9. La respuesta tóxica del hígado	203
Introducción	203
Anatomía y funciones fisiológicas	203
Agentes hepatotóxicos	205
Mecanismos implicados en la hepatotoxicidad	206
Principales tipos de lesiones hepáticas	210
Factores moduladores de la lesión hepática	215
Evaluación de la hepatotoxicidad	217
10. La respuesta tóxica del riñón	219
Introducción	219
Anatomía y funciones fisiológicas	220
Agentes nefrotóxicos	221
Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad	222
Principales tipos de lesiones nefrotóxicas	224
Efecto de los principales xenobióticos nefrotóxicos	226
Evaluación de la nefrotoxicidad	232
11. La respuesta tóxica del tejido sanguíneo	235
Bases morfológicas	235
Lesiones tóxicas sobre la hematopoyesis	236
Lesiones tóxicas sobre los eritrocitos	239

Lesiones tóxicas sobre los leucocitos	243
Lesiones tóxicas sobre las plaquetas	243
12. La repuesta tóxica del tejido inmune	245
Elementos del sistema inmune	245
Mecanismos de los efectos tóxicos inmunológicos	248
Principales xenobióticos inmunomoduladores	249
Evaluación de la inmunotoxicidad	252
13. La respuesta tóxica del sistema nervioso	255
Introducción	255
Breve descripción anatómico-funcional del sistema nervioso	256
Alteraciones funcionales del sistema nervioso	259
Clasificación de los efectos neurotóxicos y principales xenobióticos que los inducen.....	260

PARTE IV PREVENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

14. La terapéutica antitóxica	271
Consideraciones generales	271
Conceptos de antagonista y de antídoto	272
Fundamentos de la terapéutica antitóxica.....	274
Terapéutica antitóxica basada en interferencias con la absorción del tóxico	276
Terapéutica antitóxica basada en el incremento de la velocidad de eli- minación del tóxico	279
Terapéutica antitóxica basada en una elevación del umbral de toxicidad ..	282
La terapéutica antitóxica y el diagnóstico de intoxicaciones	284
15. El análisis químico-toxicológico	287
Consideraciones generales	287
Características esenciales del procedimiento analítico	288
Objetivos del análisis químico-toxicológico	289
Significación de los resultados	291
Las pruebas analíticas y la prevención del riesgo tóxico	292
16. Los métodos biológicos.....	307
Consideraciones generales	307
Influencia de factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico	311

Influencia de factores relacionados con la relación dosis-respuesta..	312
Influencia de la especie animal en la relación entre la estructura química y la respuesta biológica	313
Influencia de factores estructurales que inciden sobre la actividad tóxica	315
Métodos experimentales de evaluación de la toxicidad	315
Criterios generales sobre el diseño de la experimentación toxicológica.....	319
Estudios de toxicidad aguda.....	321
Estudios de toxicidad subcrónica o prolongada	323
Estudios de toxicidad a largo plazo o crónica.....	324
17. Evaluación del riesgo tóxico.....	327
Introducción	327
Percepción del riesgo	328
Evaluación de riesgos.....	329
Estrategias de evaluación de riesgos para la salud humana	333
Conceptos relacionados con la evaluación del riesgo.....	334
Fases del proceso de evaluación del riesgo.....	335
Caracterización del riesgo: Utilización de los NOAEL, método de la dosis «benchmark»	341

PARTE V

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

Bibliografía de consulta	345
---------------------------------------	------------

Presentación

La Toxicología puede ser considerada como aquella parte de las Ciencias Experimentales relacionadas con el ser vivo, que estudia las posibles acciones nocivas ejercidas por las numerosas sustancias químicas capaces de incidir sobre los sistemas biológicos. Desde que se estructura como Ciencia, a raíz de los trabajos de Orfila, se ha ocupado de poner de manifiesto las interacciones químicas y biológicas que ocurren entre los seres vivos y los xenobióticos o sustancias químicas ajenas a sus organismos y que se traducen en fenómenos perjudiciales para la salud.

La consecución de este objetivo requiere alcanzar una profunda comprensión de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que rigen dichas interacciones, con el fin de disponer de un bagaje suficiente de conocimientos como para detectar, tratar y prevenir cualquier daño tóxico posible. En última instancia, el objetivo primordial de la toxicología tiende hacia la protección de la vida frente a cualquier factor externo que la pueda dañar.

Sin duda, todo ello ha exigido desde un primer momento la integración de otras muchas áreas de conocimientos, como han sido la Química Orgánica y la Bioquímica básica, el Análisis Químico, la Fisiología y la Patología médica. Precisamente, los avances experimentados por cada una de estas ramas científicas han sido ocasión de incremento, o de ampliaciones, en los objetivos actuales de la Ciencia Toxicológica, así como de que se hayan podido establecer unos principios toxicológicos que fundamenten los estudios sobre la toxicidad de los compuestos químicos y el planteamiento de las apropiadas metodologías para evaluarlo. En este sentido, cabe destacar cómo el último cuarto del siglo xx se ha caracterizado por la gran riqueza informativa proporcionada por la Biología celular y molecular acerca de las principales rutas bioquímicas que están implicadas en el fenómeno tóxico, así como de las consecuencias que se siguen de las exposiciones a los efectos nocivos de cualquier xenobiótico.

En los momentos actuales, se admite sin reserva que el desarrollo de la vida del ser humano, y de muchas especies animales, en el ámbito de la sociedad occidental se encuentra sometido a diversos riesgos de exposición a numerosas estructuras químicas, que contactan con esos organismos a través de orígenes diferentes: alimentación, vida en el hogar, ambiente profesional, medio ambiente, etc.; sin dejar de mencionar los peligros que pueden provenir de accidentes ocasionales.

Por todo ello, se hace bien patente la necesidad de ofrecer a los alumnos de algunas de nuestras licenciaturas experimentales una educación toxicológica apropiada para que puedan plantear su ejercicio profesional dentro de unas reglas que, respetadas, repercutan en una garantía de la salud pública. Ahora bien, la amplitud actual del ámbito propio de la Toxicología en cuanto Ciencia, así como la rapidez con la que se acumulan nuevas informaciones acerca del fenómeno tóxico, plantea la importancia de disponer de un texto de estudio que reúna los fundamentos de esta ciencia y proporcione una información suficiente para afrontar las soluciones demandadas por los diversos problemas toxicológicos de cierta entidad.

Este planteamiento constituye el principal objetivo que ha conducido a la redacción del presente libro. Es decir, en su elaboración se ha pretendido ofrecer una información adecuada y conveniente con la que los alumnos de nuestras Licenciaturas de Biología, Bioquímica, Ciencia y Tecnología de Alimentos, Farmacia, Química y Veterinaria, se puedan familiarizar con los conocimientos básicos y fundamentales de la Ciencia Toxicológica.

Para facilitar una visión integral y global de dicha ciencia, y de acuerdo con la experiencia acumulada durante muchos años de docencia, el conjunto de la materia ha sido distribuida en cinco partes.

Una *primera parte* introductoria hace referencia al concepto de Toxicología y su evolución histórica en cuanto a ciencia, así como al desarrollo de los conceptos básicos que se manejan en el estudio del tóxico y de su toxicidad. En ella se destacan la relación que existe entre la dosis y el efecto tóxico, y se subraya la influencia ejercida por el tiempo en la magnitud de la toxicidad.

La *segunda parte* versa sobre aquellos aspectos generales que caracterizan al fenómeno tóxico. A través de ella, el estudiante es introducido en las diferentes fases implicadas en el mecanismo de la acción tóxica, desde la exposición al tóxico hasta sus efectos toxicodinámicos, pasando por los procesos que determinan su toxicocinética: absorción, distribución, biotransformación y excreción. También se hace hincapié en las relaciones que existen entre las propiedades moleculares de una sustancia y los efectos tóxicos a que puedan dar lugar.

En la *tercera parte* se describen los principales tipos de efectos que pueden ser inducidos por los diversos xenobióticos: mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis o toxicología de la reproducción, así como las respuestas del hígado, riñón, tejido sanguíneo, sistema inmune y tejido nervioso a la toxicidad órgano-específica de algunos de ellos. En el modo de explicar estos efectos, se ha procurado reflejar el avance realizado por la Ciencia Toxicológica en estos últimos

años, manejando conceptos y conocimientos, puestos al día, acerca del papel de la apoptosis, las citoquinas, los oncogenes, los reguladores de genes, etc. Asimismo, se describe el papel que las funciones fisiológicas específicas de cada órgano y tejido pueden desempeñar en el desarrollo de la actividad tóxica de un xenobiótico concreto. Igualmente, se ha dedicado especial atención a los mecanismos implicados en los fenómenos de mutagénesis y cancerogenicidad de algunas estructuras químicas, o en los daños teratogénicos a nivel de reproducción.

En la *parte cuarta* se aborda el estudio de la prevención de la toxicidad y de su evaluación, describiendo las bases de la terapéutica antitóxica, las aplicaciones del análisis químico toxicológico en la identificación de tóxico y en la detección precoz del daño tóxico, los métodos biológicos de evaluación de la toxicidad, así como los modos y criterios existentes para evaluar el riesgo tóxico que puede afectar de algún modo a una persona o a una población.

Por último con la *quinta parte* no se ha querido concluir sin aportar, como bibliografía a recomendar, una relación de aquellos libros que han sido considerados de cierto interés para ampliar los temas tratados en cada uno de los capítulos.

Debido a que la redacción del presente libro se ha fundado y beneficiado de la atención prestada por los alumnos y de las sugerencias que han realizado a lo largo de tantos años de docencia, no es de extrañar que los autores deseen expresarles su agradecimiento desde aquí, como un deber de justicia.

Por último, los autores deben un profundo reconocimiento a Jorge Heredero, que con su saber informático ha facilitado la apropiada elaboración de textos, tablas y figuras.

Adela López de Cerain Salsamendi
Profesora Adjunta de la
Universidad de Navarra

José Bello Gutiérrez
Profesor Ordinario de la
Universidad de Navarra

PARTE I

INTRODUCCIÓN A LA CIENCIA TOXICOLOGICA



J. L. Davis. «*Sócrates bebiendo la cicuta*»
Metropolitan Museo, New York.

Panorama actual de la toxicología

- Concepto de toxicología
- Breve desarrollo histórico de la toxicología
- Objetivos actuales de la toxicología
- Carácter multidisciplinar de la toxicología
- Áreas fundamentales de la toxicología moderna
- Principales ramas aplicadas de la toxicología: forense, clínica, ocupacional, ambiental, alimentaria

Concepto de toxicología

Desde el punto de vista etimológico, la palabra Toxicología deriva de dos palabras griegas: *toxikon* (veneno) y *logos* (tratado), que quieren decir «Ciencia de los venenos». No obstante, si bien en los primeros momentos de su organización como Ciencia fuera definida de este modo —así lo hizo Orfila— bien pronto quedaba claro que tal definición resultaba bastante incompleta, puesto que el objeto de esta Ciencia se extiende a un campo mucho más amplio, abarcando también el cuadro clínico provocado por la ingestión del compuesto tóxico.

En consecuencia han aparecido diversas definiciones, unas más exactas que otras, entre las que podemos destacar las siguientes:

- «Ciencia que se ocupa de las intoxicaciones y de las sustancias que las provocan». De este modo, la atención se orienta hacia el estudio de los efectos nocivos que una sustancia química es capaz de provocar sobre un tejido o sobre un mecanismo biológico.
- «Ciencia centrada en el estudio, descripción y comprensión de las interrelaciones entre las sustancias químicas y los organismos, así como de sus efectos sobre los seres vivos».
- «Ciencia que estudia los efectos nocivos originados por agentes químicos sobre los seres vivos, los mecanismos que dan lugar a tales pertur-

baciones, los medios y modos de contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar e identificar dichos agentes y valorar su toxicidad».

Sin duda, la Toxicología puede ser considerada como una disciplina científica que ha tenido un desarrollo relativamente reciente, sin embargo la observación de los efectos dañinos de algunos productos naturales llevada a cabo por el ser humano, tiene sus raíces en los tiempos prehistóricos.

Desde los mismos comienzos de sus vidas sobre la tierra, los seres humanos tuvieron necesidad de buscar materias con las que alimentarse. En esta constante búsqueda de alimentos observaron cómo ciertos frutos, bayas y raíces no sólo carecían de propiedades nutritivas, sino que daban lugar a efectos nocivos. De este modo, fueron aprendiendo a través de la propia experiencia cómo unos productos eran de gran utilidad en cuanto integrantes de la dieta alimenticia, mientras que otros podían provocar graves trastornos al ser ingeridos que, incluso, podían conducir a la muerte.

A su vez, fue comprobada la peligrosidad de algunas mordeduras de insectos y reptiles. Y es posible que, en sus intentos de aplicar medios curativos para las enfermedades y lesiones, se experimentaran los resultados dañinos provocados por algunas plantas y minerales, también en personas saludables.

Probablemente, junto a la cuestión primordial de la búsqueda de alimentos, el descubrimiento de la existencia de productos naturales con efectos perniciosos debió excitar la imaginación de algunas personas, que tuvieron la ocurrencia de aplicar tales agentes a la caza y a la pesca. En consecuencia, algunos pueblos primitivos consiguieron la enorme ventaja de una mayor facilidad para obtener diversas fuentes alimenticias.

No es de extrañar, por tanto, que como consecuencia práctica de esta experiencia empírica, poco a poco el ser humano haya ido formándose un criterio selectivo que le llevó a clasificar los productos naturales disponibles en dos tipos:

- Unos, beneficiosos y necesarios para el buen desarrollo de sus funciones vitales, que fueron considerados como alimentos.
- Otros, claramente peligrosos para la salud humana, que fueron catalogados como venenos.

Es decir, a lo largo de los siglos, se ha ido creando una concepción dualista de los productos naturales, que ha persistido hasta nuestros días.

Sin embargo, desde un punto de vista meramente científico, esta clasificación no resulta justificable, porque hoy día no es posible trazar una línea que permita una demarcación estricta entre los productos que son buenos para la salud de aquellos otros que resultan venenosos. De acuerdo con la experiencia actual, es más razonable reconocer la existencia de ciertas gradaciones, tanto en lo que atañe a la peligrosidad, como en lo que se refiere a la seguridad de uso, para cualquier tipo de producto: las sustancias más inocuas pueden dejar de

serlo, cuando son ingeridas en cantidades suficientes para llegar a ser claramente peligrosas, o cuando menos indeseables. Por el contrario, la mayoría de los productos con efectos nocivos, pueden ser ingeridas en cantidades lo suficientemente pequeñas para que en el organismo vivo no se manifieste ningún tipo de perturbación. Solamente aparecerán los efectos tóxicos cuando una estructura química específica tome contacto con su receptor biológico. Con ello se quiere dar a entender que son los factores implicados en el proceso biológico, desde la penetración de la sustancia en el organismo vivo hasta su eliminación, los que se conjugan para conferir a dicha sustancia una *propiedad* tóxica, propiedad que nunca será algo fijo e inherente a esa sustancia, como lo son las propiedades físicas (densidad, índice de refracción, etc.).

Con frecuencia, en el ámbito toxicológico se emplea la denominación de *sustancia peligrosa*. Con este concepto se pretende poner de manifiesto un aspecto muy importante en el fenómeno toxicológico: el riesgo ofrecido por una sustancia dada no sólo depende de su naturaleza química, sino también viene determinado por la posibilidad que tiene un organismo vivo de quedar expuesto a ella, así como de la cuantía de la cantidad absorbida por tal organismo durante esa exposición.

Con ello, la ciencia toxicológica ha ido tomando otras amplitudes conceptuales, hasta el punto que en los momentos actuales no sólo se centra en el estudio del ser humano en cuanto objeto de una agresión tóxica, sino que también se preocupa por los daños que afectan al medio ambiente. Por ello, se ha dicho que el desarrollo de la Toxicología es un reflejo de la evolución socioeconómica de la sociedad actual, que ha dado lugar a la aparición de nuevos problemas vinculados a los efectos tóxicos de los productos que a menudo se manejan.

Muchos autores opinan que la Toxicología puede ser considerada como una ciencia, pero también como un arte: ciencia en cuanto observa y registra el fenómeno tóxico; arte en cuanto utiliza esos datos para predecir el resultado de la exposición a los agentes tóxicos de los organismos vivos. Es frecuente que ambos aspectos se encuentren perfectamente entrelazados, porque los datos establecidos por la ciencia toxicológica suelen ser aplicados al desarrollo de extrapolaciones e hipótesis con la finalidad de explicar los efectos adversos observados en aquellas situaciones de las que se dispone una información escasa o nula. De todos modos, es importante distinguir los hechos reales de las predicciones, con el fin de evitar que se les conceda a todos la misma validez, cuando claramente no la tienen.

No hay que olvidar que en Toxicología, al igual que en cualquier otra Ciencia, las teorías se sitúan en niveles de certidumbre siempre superiores a los que se les debe otorgar a las hipótesis de trabajo, que a su vez poseen una mayor certeza que las especulaciones, opiniones, conjeturas o suposiciones.

En resumen, se puede considerar a la Toxicología como la parte de la Ciencia que se ocupa del estudio de las sustancias tóxicas desde diversos puntos de vista:

- Origen y propiedades.
- Actividad tóxica y características de las intoxicaciones.
- Relaciones entre estructura química y actividad tóxica.
- Aspectos cualitativos de la actividad tóxica: exposición al tóxico; fases toxicocinética y toxicodinámica; biotransformación del tóxico y sus consecuencias prácticas; interacciones entre tóxico y receptor.
- Aspectos cuantitativos de la actividad tóxica: relación dosis-respuesta; relación dosis-tiempo-efectos; efectos agudos y efectos crónicos; niveles sin efectos; suma de efectos; sinergismos; selectividad de acción.
- Terapéutica antitóxica.
- Protección general frente a toda clase de intoxicaciones.

Breve desarrollo histórico de la toxicología

Los primeros datos sobre hechos toxicológicos se remontan prácticamente a la prehistoria humana, donde los pueblos cazadores usaban los venenos contenidos en animales y plantas para matar a las piezas de caza, fuente principal de materia alimenticia. Por consiguiente, el conocimiento de la existencia de los venenos y de sus efectos nocivos se puede situar en la primera etapa del ser humano sobre la tierra, con una expansión que ha corrido paralela con la misma evolución de sus condiciones de vida.

No obstante, desde un punto de vista puramente científico, en el desarrollo histórico de la ciencia toxicológica cabe considerar dos etapas claramente diferenciadas, tanto por sus objetivos como por sus planteamientos científicos:

1. La etapa primitiva: muy prolongada en el tiempo, ha mantenido sus características primitivas vinculadas al uso de los venenos para la caza, la guerra o envenenamientos, unas veces legales y otras criminales, siempre aureolado de un ambiente de misterio. Durante siglos, sus conocimientos han tenido unos fundamentos totalmente empíricos, porque hasta los finales del siglo XVIII les ha faltado la base química y biológica necesaria para interpretar el fenómeno tóxico. Su rasgo esencial lo constituye la observación y registro del hecho tóxico de modo simple, sin abordar su verdadero significado, al carecer para ello de unas bases científicas adecuadas.
2. La etapa moderna: arranca de los comienzos del siglo XIX, momento histórico en el que tiene lugar su organización como ciencia, es decir, en cuanto todo el conjunto de conocimientos toxicológicos se agrupa de una manera sistematizada. Como rasgo característico se puede señalar la preocupación por interpretar los mecanismos responsables del suceso tóxico, contando con el apoyo de los nuevos conocimientos aportados por los avances de otras ciencias experimentales. De acuerdo con la opinión más generalizada, puede afirmarse que la Toxicología moderna tiene su inicio con los brillantes trabajos del español Orfila.

Etapa primitiva

La primera referencia que merece la pena destacar es el denominado papiro de Ebers (en torno al año 1500 a. C), en el que se pone de manifiesto cómo en el antiguo Egipto se disponía de un conocimiento extensivo de los venenos y de las propiedades curativas de los productos naturales, a la vez que se citan como productos nocivos la cicuta, el acónito y el opio, o los minerales cobre, plomo y antimonio.

Muy posteriormente, pero todavía en el siglo V a. de C, en algunas obras del médico griego Hipócrates se alude a numerosas sustancias, calificadas por el autor como venenosas; tales sustancias son mencionadas dentro del ámbito terapéutico, precisamente por los efectos de sobredosis observados. Un siglo más tarde, uno de los libros bíblicos titulado *Libro de Job* (alrededor del 400 a.C.) incluye referencias al empleo de flechas envenenadas. Posteriormente, también cabe citar al griego Teofrasto (307-256 a.C), un discípulo de Aristóteles, que en su libro *De Historia Plantarum* hace referencia a numerosas plantas venenosas.

Los romanos, al igual que los griegos, también tuvieron un amplio conocimiento de las aplicaciones, legales o penales, de los productos tóxicos naturales. Aparte de las diversas referencias que se encuentran repartidas por toda su literatura, merece recordar la *Lex Cornelia* (en torno al año 82 a.C), en cuanto que puede ser considerada como la primera de las leyes promulgadas sobre los envenenamientos y que más tarde llega a ser un estatuto regulador de las negligencias cometidas por los dispensadores de drogas.

En el primer siglo de la era cristiana se encuentra Dioscórides, médico griego de la corte romana de Nerón: además de realizar la descripción y dibujo de muchos productos venenosos, fue el primero en establecer una ordenación de los venenos mediante su distribución en productos del reino animal, vegetal y mineral. Con ello, aportó una clasificación que ha perdurado hasta época reciente.

Alcanzada la Edad Media, merece especial mención la figura del cordobés Maimónides (1135-1204), médico árabe autor del tratado titulado *Venenos y antidotos* en el que describe envenenamientos provocados por picaduras de insectos, mordeduras de serpientes o perros rabiosos, además de prescribir sus antidotos y aconsejar sobre la forma de evitarlos. Incluso, recogiendo ideas de la época helenística, hace observaciones sobre la biodisponibilidad de las sustancias aportadas por los productos naturales, haciendo notar cómo la presencia de leche, mantequilla y nata podían obstaculizar la absorción intestinal de algunos venenos ingeridos. No obstante, es en el siglo xv cuando el uso del veneno fue llevado por los italianos a su nivel culminante, tal vez como una consecuencia de sus implicaciones en las actividades políticas.

En el pleno florecer del Renacimiento científico, ocurrido en el siglo xvi, aparece la figura médica del suizo Paracelsus (1493-1541) cuyas aportaciones significaron nuevos puntos de vista bastante revolucionarios y que, en parte, son

todavía aceptados en los ámbitos toxicológicos. Fue el primero en relacionar la actividad de un producto con la dosis y estableció un principio, que todavía se considera válido: «*Dosis sola facit venenum*».

Debido a la influencia de su pensamiento científico, fueron establecidos unos corolarios, que han resultado muy importantes para el desarrollo posterior de los fundamentos de la ciencia toxicológica:

- La experimentación es algo esencial para conocer la respuesta del organismo vivo a la acción de los venenos, que el denominaba *toxicon*.
- Hay que distinguir entre propiedades terapéuticas y propiedades tóxicas de los productos naturales.
- Tales propiedades vienen marcadas por la dosis.
- Es posible llegar a conocer el grado de especificidad de los productos naturales, en relación con sus efectos terapéuticos y tóxicos.

Por otra parte, hay que señalar cómo en aquellos tiempos los envenenamientos podían tener, a veces, el carácter de plagas o de verdaderos desastres ecológicos. Así por ejemplo, el hongo *Claviceps purpurea*, más conocido con el nombre de «cornezuelo del centeno», fue el responsable de las epidemias de ergotismo (para el vulgo: fuego sagrado y mal de San Antón), como consecuencia del consumo de pan de centeno, que se acompañaron de una gran mortandad entre la población humana. Hasta muchos años más tarde no se pudo conocer su origen: la ergotamina y otros alcaloides, producidos por el hongo durante su desarrollo, capaces de provocar, entre otras cosas, la contracción de la musculatura lisa.

Dentro de esta visión primitiva de la Toxicología, sólo cabe citar algunas aportaciones aisladas que nunca cuajaron en una metodología rigurosa capaz de ser conceptuada como un atisbo para formar una ciencia sistematizada. Así, Fodere publica en 1798 un tratado de medicina legal, en el que dedica un capítulo a las propiedades y efectos de los venenos. También se conoce por esa época de finales del siglo xvm un texto muy incompleto de Devergie, fundado en observaciones clínicas pero al margen de toda experimentación. Así mismo, en la obra del italiano Giacomini, titulada *Trattato filosofico sperimentales de Socrosi terapeutica*, figura una curiosa clasificación de productos tóxicos, carente de todo valor práctico.

Sin embargo, la revolución industrial iniciada hacia finales del siglo xvm conduce a la adopción de nuevas profesiones y nuevas formas de vida en la sociedad, que implica la aparición de enfermedades profesionales con una etiología tóxica, propias de mineros, impresores, tejedores, alfareros, etc., cuyo estudio abre nuevos caminos a la Toxicología. Con ello, puede afirmarse que han sido el desarrollo científico acontecido durante el siglo XVIII y el progreso industrial del siglo xix los que han permitido el nacimiento de una nueva visión de la Toxicología, que le ha orientado hacia su actual formación en cuanto Ciencia con entidad propia y específica.

Etapa moderna

A finales de la anterior etapa primitiva, fueron establecidos algunos planteamientos científicos que permitieron conocer el tipo de sustancias químicas contenidas en los productos tóxicos naturales y se pudieron iniciar los estudios acerca de su toxicidad, así como de las relaciones «dosis-respuesta», diferenciadoras entre los efectos tóxicos y los efectos farmacológicos.

Aunque Plenck sostenía en los comienzos del siglo xix que la única prueba posible de conocer un envenenamiento era la identificación del tóxico dentro del organismo, sin embargo todavía en esos momentos se carecía de la adecuada metodología analítica para llevar a la práctica y hacer realidad esta aseveración. Habría que esperar a los trabajos del español Orfila (1787-1853) para que los estudios sobre venenos perdieran su carácter esotérico y se pusieran las bases de la Toxicología como Ciencia. Nacido en Mahón, Orfila estudió primero Matemáticas y Química en España, para cursar después Medicina en París. Al no conseguir ser nombrado Profesor de Química en Madrid, se nacionaliza francés y ocupa la cátedra de Medicina Legal en la Universidad de París.

Cuando en abril de 1813 explicaba a sus alumnos de París, según relata en una Autobiografía, la forma de reconocer el ión arsenito, comprobó, con sorpresa, que los reactivos químicos normalmente empleados para detectar el arsénico en soluciones patrones daban lugar a reacciones anormales, al ser aplicados para descubrir la presencia de arsénico en alimentos, en concreto café o vino. Al reflexionar sobre esta observación, decidió emprender una investigación específica acerca del reconocimiento y valoración de sustancias tóxicas presentes en líquidos de origen animal o vegetal. Resultado de tan feliz decisión fue la publicación en 1814 de dos tomos bajo el título *Toxicología general*, que verdaderamente marca el hito del comienzo de la Toxicología en cuanto Ciencia.

Cuatro años más tarde, en 1818, publica su obra más popular con la extensión de cuatro tomos, que viene a ser un intento de divulgar los conocimientos toxicológicos adquiridos hasta el momento con el fin de excluir todo tipo de misterio de su novedosa Ciencia y evitar que pudiera ser vinculada a las manifestaciones de brujerías y alquimias tan en boga en aquellos tiempos. Con ello realizó una importante labor de sanidad pública y de higiene social.

Puede afirmarse sin error que Orfila no sólo desempeñó el papel de sistematizador de la Toxicología, sino también ha sido quien le dio la forma de una nueva Ciencia. En realidad, creó la Toxicología experimental, buscando los tóxicos en los tejidos corporales, dando más valor a las necropsias y a las autopsias sistematizadas que a unos simples análisis químicos o a unas revisiones de historias clínicas. Además, resulta magistral cuando organiza el estudio de los tóxicos en tres capítulos básicos: a) la acción de los tóxicos; b) la investigación de los mismos en Medicina Legal; c) los antidotos.

Durante los siglos anteriores, las indagaciones sobre los venenos se solían centrar en torno a su eficacia, pero con Orfila los estudios se orientan también hacia los medios apropiados para conseguir la neutralización de sus efectos. Por

ello, hay que considerarle como el verdadero descubridor del concepto de *antídoto*, en cuanto modo terapéutico de actuar en contra del tóxico. También se debe a Orilla la aclaración de cómo se propaga el tóxico en el interior del organismo vivo, al demostrar que se hace a expensas de la irrigación de los tejidos por medio del sistema circulatorio.

En esta línea, la Toxicología va tomando cuerpo de doctrina y adquiriendo un amplio desarrollo gracias también a los esfuerzos de otros investigadores, tanto seguidores de los supuestos científicos establecidos por Orilla como contrarios a ellos.

Es importante señalar cómo los descubrimientos en el campo analítico de las sustancias tóxicas supuso un gran avance para la Toxicología, especialmente aquellos que han marcado un hito en los cimientos de esta Ciencia (Tabla 1.1) Con ello, el tóxico que durante siglos fue conocido de un modo empírico, comienza a ser detectado y cuantificado a lo largo de todo el siglo xix con métodos analíticos bastantes precisos. El avance de la Química condujo al desarrollo de una Química Analítica cuyas técnicas aplicadas a la detección de los venenos dio comienzo al área forense de la Toxicología.

El primer caso que se conoce de las posibles transformaciones *in vivo* de una droga se sitúa en 1842, cuando Keller demostró que el organismo humano eliminaba, transformado en ácido hipúrico, el ácido benzoico que ingería. Años después, en 1867, fue descubierto cómo el benceno, administrado en dosis no mortales, se excretaba convertido en fenol. Puede considerarse como el primer hallazgo de un proceso de desintoxicación natural, que en cierto modo iniciaron los estudios sobre la biotransformación de los tóxicos.

Muy interesante resulta la incorporación de técnicas de experimentación fisiológica en el peritaje toxicológico, como una consecuencia de los estudios de Claude Bernard (1813-1878). El gran maestro de París había publicado en 1850 sus trabajos sobre la interpretación de la actividad tóxica del curare sobre el organismo humano. También cabe citar sus estudios sobre el mecanismo de la intoxicación por monóxido de carbono, así como sobre los efectos del opio, la estricnina y los anestésicos, que le condujeron a inferir las bases del actual conocimiento del sistema nervioso autónomo.

TABLA 1.1. Hitos históricos en el desarrollo de la Toxicología Analítica

- La técnica para la identificación del arsénico, propuesta por Marsh en 1836.
 - El método para la investigación sistemática de los tóxicos minerales, una vez destruida la materia orgánica, establecido por Fresenius y Babo en 1840.
 - La extracción, separación e identificación de alcaloides, sugerida por Stass en 1850.
 - La demostración de la formación de ptomaínas, realizada por Selmi y Gautier en 1870.
 - La publicación por Berthelot en 1906 del tratado sobre *Análisis de los Gases*, instrumento básico para la investigación de tóxicos volátiles y gaseosos.
-

Todos estos trabajos han marcado los fundamentos para la investigación tóxicobiológica, pues para Bernard no hay efecto sin causa y, por consiguiente, no puede haber intoxicación sin una lesión fisiológica, que debe ser específica de cada tipo de sustancia tóxica. De acuerdo con ello, Tardieu y Roussin plantearon en 1863 la extracción de la digitalina, que debería estar en las vísceras de los cadáveres intoxicados, y confirmar la presencia del alcaloide provocando sus efectos mediante suministro de dicho extracto a grupos experimentales de animales. De este modo, se van asentando profundamente los conocimientos adquiridos en el ámbito de la Toxicología, que hasta este momento histórico podría ser considerada casi exclusivamente como una Toxicología Forense.

Hacia finales del siglo xix se produce, en muchos países desarrollados, una gran expansión de la industria química, que dura hasta nuestros días con un ritmo cada vez más acelerado. En consecuencia, aparece una grave amenaza para la salud de la población por el riesgo tóxico que comporta el empleo generalizado de tantas sustancias químicas a todos los niveles: industriales, agrícolas, domésticos, etc., que en contacto con el organismo humano pueden resultar tóxicos a largo plazo. Con ello, la atención de los estudios toxicológicos toman nuevos rumbos y se amplían en gran manera los objetivos de esta Ciencia. Ya en 1866, una empresa alemana (la Badische Anilin und Soda Fabrik) había contratado los servicios de un médico especializado para que se ocupara de prevenir las enfermedades profesionales, o de tratarlas si fuera el caso, protegiendo de este modo la salud de los operarios. Esta iniciativa tuvo una pronta acogida por el conjunto de la industria química alemana y en 1906 se celebró en Milán el Primer Congreso Internacional de Higiene del Trabajo. No obstante, hay que esperar al final de la Segunda Guerra Mundial para que surja, a nivel de naciones, una verdadera preocupación científica por los peligros toxicológicos procedentes de la industria química.

Si bien la Toxicología se había puesto en marcha para estudiar y combatir las intoxicaciones de tipo crónico, todavía la intoxicación aguda —el envenenamiento por excelencia— no acababa de tener un tratamiento adecuado; así por ejemplo, las estadísticas de 1950 ponían de manifiesto que un 25 % de las intoxicaciones por barbitúricos habían sido casos mortales. De aquí que, en la segunda mitad del siglo xx, haya existido una revitalización de lo que se suele denominar Toxicología Clínica con el fin de afrontar con éxito este problema, dando lugar a la aparición de los llamados Centros Antitóxicos, encargados de proporcionar una adecuada información toxicológica acerca de las intoxicaciones agudas y sus tratamientos.

El ritmo que la sociedad occidental ha impuesto a su civilización industrial, donde parece casi imposible imaginar una agricultura sin insecticidas o unas labores domésticas sin detergentes de síntesis, ha convertido en peligroso el mismo medio ambiente donde se desarrolla la vida de algunos grupos de población. Así, el progreso industrial, la concentración masiva de habitantes en grandes núcleos de población, la imposibilidad de alcanzar por medios naturales una

dilución de contaminantes, etc., están provocando un deterioro paulatino del medio vital y de la salud humana.

Todo ello ha traído como consecuencia nuevos problemas y preocupaciones para la ciencia toxicológica, que se ha de enfrentar con la evaluación a largo plazo de los riesgos que comporta la repetida absorción de sustancias que, de hecho, inciden en la salud humana. Cuando se conoció que la exposición no deliberada a un agente químico podría implicar la aparición de efectos adversos para la salud personal, como puede ocurrir en algunos lugares de trabajo profesional, la Toxicología tuvo que orientar parte de sus esfuerzos hacia la posible prevención de esos efectos nocivos, así como precisar las medidas de seguridad que deberán ser adoptadas para proteger a los organismos vivos de toda una serie de perjuicios de etiología química y física.

Por consiguiente, en los últimos años que ocupan esta etapa moderna de la Toxicología se ha procurado conocer aquellos datos que se relacionan con la toxicidad de nuevos compuestos, antes de que se extienda su uso y puedan llegar a ser peligrosos. En este sentido, la tarea básica de la higiene toxicológica actual es la de establecer con precisión y garantía los niveles máximos permisibles de una sustancia química en el medio ambiente: aire, agua, alimentos, atmósfera de trabajo, etc.

Asimismo, resultaba de notable interés determinar la posible dependencia entre las estructuras químicas y sus correspondientes actividades tóxicas, no sólo por la importancia de conocer un determinado compuesto en particular, sino también con la finalidad de establecer una teoría general de la subordinación de la actividad biológica de una sustancia a su estructura química precisa. Por ello, a lo largo de estos últimos años se ha puesto un énfasis especial en el estudio de los mecanismos de intoxicación y de los mecanismos de metabolización de los tóxicos. Sin duda, esta preocupación ha exigido que la Toxicología acuda a nuevos planteamientos que han recabado la colaboración coordinada de científicos y técnicos de otras disciplinas porque, en su mayor parte, ya no resultaban útiles los métodos clásicos y convencionales.

No en vano, la Toxicología ha tenido que pasar por diversas fases en su maduración como disciplina científica:

- Observación y fenomenología del hecho tóxico.
- Deducción de los mecanismos implicados en el fenómeno tóxico mediante experimentos con animales.
- Empleo de los datos obtenidos para establecer parámetros de referencia con utilidad práctica: valores umbrales límites, ingesta diaria recomendada, factores de seguridad, etc.
- Evaluación de riesgos.

Lo que antes eran problemas simplemente individuales o locales, ahora se han convertido en problemas nacionales o mundiales. Son varias las Organizaciones que, en época reciente, se han interesado por abordar estos problemas y estudiarlos: la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las

Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el Consejo de Europa, la Unión Internacional contra el cáncer (IUAC), el Comité Europeo Permanente para la Protección de las Poblaciones contra los Riesgos de Toxicidad a largo plazo (EUROTOX), etc. Desde 1955 funcionan Comités de Expertos promovidos por la OMS y la FAO, que se ocupan de establecer planteamientos y sugerir programas de investigación en torno a los problemas toxicológicos que afectan a la sociedad actual: contaminación ambiental, presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos, drogas de uso veterinario, consumo de aditivos que no deben ser admitidos, etc. Es decir, se han ido estableciendo poco a poco una serie de criterios que han resultado de gran utilidad para el desarrollo de la ciencia toxicológica moderna.

Puede afirmarse que desde 1960 la Toxicología ha adquirido un verdadero auge, apoyado por el creciente interés que nuestra sociedad occidental manifiesta por la protección del medio ambiente y la salud de su población. Tales planteamientos han favorecido todos los esfuerzos realizados para profundizar en el conocimiento de los riesgos asociados a las numerosas sustancias químicas producidas por las industrias y que pueden incidir sobre el organismo humano de alguna u otra manera.

En este sentido, nuestro país ha procurado sintonizar con estas preocupaciones sociales. Así, existe el Instituto Nacional de Toxicología, con sedes en Madrid, Barcelona y Sevilla, vinculado al Ministerio de Justicia; el Centro Nacional Técnico en Materia Toxicológica, que actúa como centro de asesoramiento e información, capacitado para emitir informes sobre las consultas que se les formulen relativas a la prevención y lucha contra las intoxicaciones. Así mismo, desde 1971 funciona en Madrid el primer Servicio de Información Toxicológica por teléfono.

Objetivos actuales de la toxicología

Al ser necesario un conocimiento apropiado de los efectos metabólicos y bioquímicos provocados por las sustancias químicas en uso, que sirva de base para las recomendaciones de inocuidad de su empleo, se ha forzado el perfeccionamiento de los métodos de análisis químicos, bioquímicos y fisiológicos, alcanzándose una gran sensibilidad. Así, los progresos en Biología molecular, la aplicación del microscopio electrónico y las técnicas de histoquímica, el manejo de cultivos celulares, la mejora del control genético de los animales de experimentación, etc., ha favorecido de modo muy notable la investigación toxicológica en el último tercio del siglo xx.

En tiempos pasados, la Toxicología hacía especial referencia a los efectos agudos del tóxico, que se investigaban mediante ensayos con animales de laboratorio. Sin embargo, los cambios sociales, anteriormente apuntados, dieron lugar a un desplazamiento de la atención del toxicólogo hacia aquellos efectos

que sólo se hacen patentes bastante tiempo después que el agente tóxico fue ingerido, o absorbido, por el organismo vivo. En este caso, no resulta eficaz la simple experimentación animal, entre otras razones porque las diferencias metabólicas entre las distintas especies no permiten comparar, ni extrapolar, las conclusiones.

En principio, toda evaluación toxicológica debe responder a unos principios generales considerados bajo dos aspectos:

- a) Las pruebas de laboratorio deben quedar inscritas en un contexto cuantitativo, aun cuando el estudio sea cualitativo.
- b) La interpretación de los resultados debe ser realizada con toda la cautela necesaria, teniendo en cuenta los planteamientos pluridisciplinarios que suelen caracterizar la evaluación toxicológica, y la aplicación de metodologías propias de otras ciencias fundamentales.

La finalidad de las actuales pruebas usadas en la Toxicología moderna es la de conseguir un mínimo razonable de seguridad, dado que la inocuidad absoluta nunca puede demostrarse y, posiblemente, no exista. Por ello, en Toxicología actual se impone una situación de quimicovigilancia para evitar que puedan darse graves consecuencias sobre la población.

En resumen, dentro de su etapa moderna, la Toxicología se ha ido desarrollando y expandiendo al asimilar conocimientos y métodos aportados por otras ramas de las ciencias experimentales, y va más allá del simple estudio de los efectos adversos de los xenobióticos al explorar los mecanismos a través de los cuales las estructuras químicas ejercen sus efectos adversos sobre los sistemas biológicos.

De aquí que su campo de acción resulta bastante amplio, porque abarca numerosos temas de gran interés actual:

- Obtención de datos que conciernen a la toxicidad de nuevas sustancias, antes que su uso se extienda y pueda llegar a ser peligroso.
- Aclarar la dependencia de una actividad tóxica con una estructura molecular determinada; un objetivo de gran relevancia por lo que supone de base para una teoría general de la actividad biológica de los tóxicos. Por ello, en los últimos años la Toxicología ha puesto especial énfasis en el estudio de los mecanismos de las intoxicaciones y de los sistemas enzimáticos implicados en su metabolización, para lo que hoy se cuenta con la eficaz ayuda de los nuevos métodos de la toxicología *in vitro*.
- Abordar el problema actual planteado por los agentes adictivos. Se admite, sin ninguna duda, que existe una estrecha relación entre el consumo de tabaco y la incidencia de algunas enfermedades cardiovasculares o el cáncer de pulmón. Y se considera ya muy elevado el número de personas que padecen lo que la OMS denomina una drogodependencia.
- También son muy numerosas las sustancias químicas capaces de provocar acciones profundas, diversas y complejas sobre los procesos mentales que,

en general, producen una dependencia psíquica o «habituación»; dando lugar, también, algunas de ellas a una dependencia psíquica y fisiológica o «adicción». El daño social consecuente al uso indebido de todas esas sustancias trae repercusiones muy graves para la sociedad. No cabe duda que todas estas circunstancias ha abierto un amplio campo de trabajo e investigación para la Toxicología y parte de sus logros ha permitido que la «Comisión de Estupefacientes», formada en el seno de las Naciones Unidas, haya podido establecer un reglamento que intenta controlar el uso de todas estas drogas a nivel mundial.

- El uso y abuso de los medicamentos ofrece un aspecto muy especial en lo que hace referencia al consumo de sustancias que afectan al sistema nervioso central, como son los denominados psicofármacos. Merece una particular atención el problema que ello origina cuando afecta a la habilidad o a la capacidad de todos aquellos operarios (conductores de automóviles, maquinistas de trenes, operadores de grúas, etc.) que desarrollan su actividad profesional en situaciones peligrosas.
- El dopaje o uso de fármacos en el deporte cuando, para mejorar sus rendimientos, se administran a los atletas sustancias estimulantes, calmantes, andrógenos, anabolizantes, etc. Y lo mismo cabe decir para animales de competición, como caballos, galgos, gallos, etc.
- Toda una serie de circunstancias relacionadas con lo que algunos denominan Toxicología intencional por el modo en que el tóxico es empleado: uso de agentes debilitantes, etc. en espionaje y torturas; uso de gases lacrimógenos, ataráxicos, etc. en el control de manifestaciones y motines; uso de adyuvantes en los denominados *lavados de cerebro* o en pruebas de veracidad, conocidos como *truth drugs*.

En definitiva, los objetivos de la Toxicología moderna pueden ser recogidos en tres aspectos de gran importancia social:

1. Elucidar las propiedades tóxicas de las estructuras químicas del modo más amplio posible.
2. Evaluar los riesgos que implican la actividad de los agentes químicos sobre los organismos vivos, en función de las concentraciones a las que se encuentran en el ambiente.
3. Asesorar a la sociedad acerca de las medidas para el control y la prevención de los efectos perniciosos de los agentes químicos.

Carácter multidisciplinar de la toxicología

De acuerdo con su concepto y sus objetivos, la Toxicología puede ser considerada como aquella parte de la ciencia que estudia los efectos provocados por las sustancias químicas sobre los sistemas biológicos, con especial énfasis sobre

los mecanismos bajo los cuales se dan tales efectos perjudiciales. Sin embargo, para profundizar en los mecanismos y procesos fundamentales implicados en el fenómeno tóxico resulta necesario integrar las investigaciones toxicológicas con los conocimientos de otras ciencias químicas y biológicas básicas.

Por consiguiente, la Toxicología en cuanto ciencia se ha de beneficiar de los descubrimientos aparecidos en el campo de la Química, y más particularmente en el de la Bioquímica, así como en los de la Fisiología y Farmacología, sin olvidar la Anatomía Patológica o la Genética en lo que la actividad de un tóxico pueda tener de alteración de las células y los tejidos o el material hereditario. De hecho, la Toxicología actual fundamenta en estas disciplinas sus esfuerzos para dilucidar los comportamientos de las sustancias tóxicas, no sólo a niveles de órganos y tejidos, sino también a niveles moleculares dentro de las células.

Así pues, la Toxicología moderna debe ser considerada como una ciencia multidisciplinar que ha necesitado, y sigue necesitando, de la contribución de otras ciencias experimentales. Pero esta integración dentro de la Toxicología de las diversas disciplinas citadas, no representa simplemente un empleo simultáneo de cada una de esas ciencias para aclarar los aspectos que le puedan corresponder. Por el contrario, significa que esa integración conlleva el estudio de problemas específicos bajo un enfoque conjunto de todas las ciencias concurrentes.

Como fácilmente se deduce de todo lo expuesto, la ciencia toxicológica, que comenzó con los estudios y publicaciones de Orilla, ha ido ampliando su contenido con el concurso de otras ciencias experimentales. Resultado de todo ello ha sido un conjunto de conocimientos toxicológicos convenientemente sistematizados, para cuyo estudio global es obligado establecer divisiones que permitan fijar sus contenidos. No obstante, estas sistematizaciones pueden ser realizadas sobre la base de criterios diferentes y conducir a clasificaciones muy diversas.

En cuanto al objeto de su estudio, el contenido propio de la Toxicología puede ser considerada bajo dos puntos de vista:

- a) *General*- Se estudian las bases generales de la acción tóxica, e incluye en su consideración los principios generales involucrados en el mecanismo de acción de un tóxico, así como los modos de contrarrestar sus efectos.
- b) *Descriptiva*-Se agrupan los diferentes aspectos y enfoques que los estudios toxicológicos ponen de manifiesto acerca de las distintas sustancias químicas, dando como resultado diversos aspectos de la toxicidad muy especializados, que incluye:
 - ❑ *Toxicología de metales y compuestos.*
 - ❑ *Toxicología de disolventes orgánicos.*
 - ❑ *Toxicología de compuestos orgánicos: nitrados, aminas, colorantes, etc.*
 - ❑ *Toxicología de plaguicidas.*
 - ❑ *Toxicología de gases y vapores.*
 - ❑ *Etc.*

Áreas fundamentales de la toxicología moderna

La integración que el carácter multidisciplinar de la ciencia toxicológica ha de tener con otras disciplinas experimentales, puede tener dos características diferentes:

- a) Integración vertical, que amplía las fronteras de esta disciplina de acuerdo con la naturaleza de las relaciones que existan entre la investigación toxicológica y las disciplinas básicas: Análisis Químico, Anatomía Patológica, Bioquímica, Farmacología, Fisiología, Genética, Inmunología, etc. Como resultado de todo ello aparecen diversas subdisciplinas:
 - ❑ *Toxicología genética.*
 - ❑ *Toxicología molecular.*
 - ❑ *Inmunotoxicología*
 - ❑ *Neurotoxicología.*
 - ❑ *Etc.*
- b) Integración horizontal, que se orienta hacia las aplicaciones prácticas con repercusiones importantes para los estudios que afectan al medio ambiente y la salud humana. De este modo aparecen dos áreas principales que se definen por sus metodologías y planteamientos:
 - Una toxicología retrospectiva, propia de la *Rama Forense*, orientada hacia la investigación del tóxico en los órganos corporales, además de considerar aspectos médico-legales.
 - Una toxicología predictiva, que se orienta a la predicción de los posibles efectos de situaciones concretas, tales como el uso de drogas, las interacciones medicamentosas, las sustancias que inciden sobre los organismos vivos tanto en el medio ambiente como en los ámbitos profesionales, la presencia en los alimentos de contaminantes o de aditivos no permitidos, etc.

Todo ello da lugar a cuatro *ramas* con bastante interés práctico, cada una de las cuales se apoya en otras subdisciplinas:

- ❑ *Toxicología clínica:* química clínica y farmacología.
- ❑ *Toxicología ocupacional:* medicina del trabajo e higiene laboral.
- ❑ *Toxicología medio-ambiental:* ecología y química ambiental.
- ❑ *Toxicología alimentaria:* análisis químico, bromatología y nutrición.

Por otra parte, en función del modo de abordar el hecho tóxico, también pueden ser definidas tres tipos de áreas, que corresponden al tipo de trabajo y posible investigación que va a ser preciso desarrollar:

1. *Toxicología descriptiva:* orientada directamente al diseño de pruebas de toxicidad de los productos químicos, capaces de suministrar la informa-

ción adecuada para evaluar su seguridad. Es decir, notifica acerca del riesgo al que puede estar sometido una población, o su medio ambiente, como consecuencia de una exposición a sustancias químicas específicas. De este modo, se podrán establecer los correspondientes requerimientos legales para evitar daños personales o las perturbaciones sobre el equilibrio de los ecosistemas. Para ello se puede hacer uso de animales de experimentación, o establecer procedimientos complementarios *in vitro*.

2. *Toxicología mecanística*, en la que se incluyen la molecular y la genética: se ocupa del estudio de los mecanismos de actuación mediante los cuales las sustancias químicas ejercen sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Los resultados de los estudios mecanísticos resultan muy importantes para otras muchas áreas aplicadas de la Toxicología:
 - Contribuir al conocimiento de la fisiología, bioquímica y farmacología de un producto.
 - Facilitar el desarrollo de tests sensibles para predecir la toxicidad de algunos compuestos de interés social.
 - Facilitar el desarrollo de métodos complementarios a la experimentación con animales.
 - Permitir el desarrollo de análogos estructurales más seguros.
 - Desarrollar la terapia adecuada para combatir los síntomas vinculados a las perturbaciones ocasionadas.
3. *Toxicología reguladora*: sobre la base de los datos obtenidos por las áreas mecanísticas y descriptivas, dictamina acerca del nivel de riesgo, escaso o elevado, que pueda poseer el uso de un medicamento o de un aditivo alimentario y por tanto pueda permitirse su comercialización sin peligro para la salud. Además, regula sobre las cantidades admisibles para la presencia de una sustancia química en el aire, las aguas o los alimentos, que se consideran inocuas para ocasionar daños de tipo crónico.

Principales ramas aplicadas de la toxicología

Dentro de las *ramas* a que da lugar el sentido aplicado de la integración horizontal de la Toxicología con los ámbitos de otras ciencias, cabe destacar principalmente cinco: 1. forense; 2. clínica; 3. ocupacional; 4. medio-ambiental; 5. alimentaria.

Toxicología forense

Representa la rama aplicada más tradicional, que se relaciona con los aspectos médico-legales de los efectos nocivos que las sustancias químicas pueden provocar sobre los seres humanos. Desde siempre ha sido la Toxicología clásica,

que persigue como objetivo detectar y valorar el tóxico en el organismo cuando se sospecha de un envenenamiento intencionado, y por ello ha sido tributaria de la Medicina Legal. En ella, los signos clínicos, la autopsia y el análisis químico constituyen un todo inseparable, donde cada elemento contribuye, por su parte, a la interpretación del hecho toxicológico; hecho que ha quedado fijado de un modo definitivo y del que sólo cabe determinar su causa.

Los aspectos legales de esta Toxicología exigen conocer todo lo que concierne a la relación causa-efecto entre la exposición a la sustancia supuestamente tóxica y los efectos ocasionados. Los aspectos médicos hacen referencia al diagnóstico y a la terapéutica de los efectos nocivos. Y ambos aspectos exigen procedimientos químico-analíticos, que van dirigidos a la detección y cuantificación de las sustancias tóxicas en los tejidos corporales, por lo que el Laboratorio adquiere especial relevancia.

Dentro de esta rama, también se incluyen las indagaciones sobre alcoholemias, la verificación de la presencia de dopaje en los atletas, la identificación de sustancias que tienen una conexión con el tráfico de estupefacientes, etc. Igualmente, es importante un conocimiento profundo de antidotos y medidas de defensa, porque lo exige el procedimiento terapéutico requerido para contrarrestar los efectos de ciertas exposiciones a sustancias potencialmente letales.

Toxicología clínica

Se le puede definir como la rama aplicada que se orienta a contrarrestar los efectos provocados por los tóxicos sobre el ser humano mediante el diagnóstico de la intoxicación y aplicación de la terapéutica antitóxica, así como a una evaluación de los métodos para su detección. Por ello, se encuentra muy vinculada también a la Medicina y tiene su más viva expresión en los Centros Antitóxicos. Tiene como finalidad el tratamiento de las intoxicaciones agudas o crónicas en centros especializados, a la vez que suministra información sobre posibles intoxicaciones y educa en relación a la manipulación de productos domésticos y a la presentación comercial de los mismos. Se le considera de gran importancia porque, hoy día, la cifra de muertes ocurridas por intoxicaciones accidentales viene a ser comparable a la de muertes por accidentes.

Su principal objetivo radica en interferir la interacción organismo-tóxico mediante antidotos y tratamientos clínicos, de tal modo que sea posible reducir, o incluso anular, las consecuencias perjudiciales para la salud. La eficacia de su aplicación se encuentra obstaculizada por la imposibilidad de llevar a cabo experiencias controladas de laboratorio con seres humanos. Ante estas circunstancias cada organismo tiene que ser considerado como único y prácticamente irrepetible.

Por otra parte, las intoxicaciones agudas se suelen presentar de un modo extemporáneo y exigen intervenciones tan rápidas, que el riesgo de errores es elevado al no permitir la realización de investigaciones adecuadas para no con-

fundir los efectos propios de la sustancia tóxica con los que pueden aparecer derivados del propio tratamiento. Cada organismo humano no es una constante y presenta factores capaces de alterar de modo significativo la respuesta a la interacción «tóxico-organismo»: idiosincrasia individual, enfermedades previas, hipersensibilidad para una sustancia determinada, anteriores contactos con el tóxico. No obstante, el peligro de aplicar una información incierta, obtenida de las escasas y aisladas experiencias acaecidas en seres humanos, no es mayor que las consecuencias de extrapolar al ser humano los datos conseguidos en los laboratorios con modelos animales.

Toxicología ocupacional

Rama considerada en la actualidad de especial transcendencia por el ámbito en el que centra sus objetivos, ya que se ocupa de las intoxicaciones profesionales en su sentido más amplio. Aunque se inserta en cierto modo en la Toxicología médico-legal, sin embargo se pueden señalar importantes diferencias que le hacen exhibir unas características específicas: etiología de las intoxicaciones, los modos de penetración de los tóxicos y los medios de prevención a poner en práctica. El nombre de Toxicología e Higiene industrial fue introducido por Lehman en 1911. Su papel es el de salvaguardar la salud y poner en evidencia las perturbaciones funcionales que se provocan en los organismos, antes de que lleguen a ser profundas e irreversibles.

En el ámbito de la higiene ocupacional, el riesgo de toxicidad se puede manifestar bajo dos aspectos que deben ser claramente delimitados:

- a) El accidente de trabajo, circunstancia fortuita y puntual, cuyas consecuencias pueden ser diversas en lo que hace referencia a su gravedad.
- b) La enfermedad profesional, que se desarrolla bajo las habituales condiciones de la ocupación laboral, que implica aspectos médicos y aspectos legales.

Este es el caso que atañe a la Toxicología ocupacional, donde la intoxicación se manifiesta por lo general de forma menos brusca, aunque no por ello ha de ser menos grave. En sus episodios pueden tener una participación especial los posibles contactos del tóxico con la piel o su penetración a través de las vías respiratorias.

Con la excepción de las intoxicaciones agudas, el fenómeno toxicológico nunca queda constituido aquí de un modo definitivo, sino que por el contrario hay que situarlo en el inicio de una evolución en la que es preciso prevenir sus consecuencias para evitar sus efectos perjudiciales. Por consiguiente resulta de gran interés investigar aquellos parámetros clínicos que puedan ser usados por la medicina laboral como índices preventivos.

Los aspectos médicos hacen referencia al diagnóstico que hace falta emitir y al procedimiento terapéutico necesario para tratar las intoxicaciones potencial-

mente letales, agudas o crónicas, que se produzcan por unas continuadas exposiciones al tóxico. En cambio, para los aspectos legales se necesita disponer de los adecuados conocimientos en torno a la relación «causa-efecto» entre la exposición a la sustancia y los efectos que ocasiona.

Ambos aspectos exigen procedimientos analíticos que van dirigidos a la detección y cuantificación de la sustancia química en los tejidos corporales mediante métodos químicos. La significación de los resultados analíticos obtenidos se interpretan de acuerdo con los datos disponibles acerca de la relación «dosis-respuesta».

Este modo de proceder le reviste de un carácter propio, que supera el cuadro rígido de los exámenes tradicionales de laboratorio; no sólo se habla de análisis químico, sino también de química biológica: a la disección anatomopatológica, propia de la rama forense, le sustituye lo que podríamos denominar una «disección bioquímica»; junto a los métodos microanalíticos para detectar la presencia del tóxico en los tejidos incorpora los métodos experimentales de investigación y exploración adecuados para descubrir las modificaciones y perturbaciones bioquímicas incluso a nivel celular.

Su papel es el de salvaguardar la salud y para ello ha de poner de manifiesto las perturbaciones funcionales antes de que lleguen a ser profundas e irreversibles. Dentro de esta línea de actuación resulta necesario que para cada sustancia química, capaz de implicar un riesgo tóxico ocupacional, se establezca aquel valor que sea considerado como *concentración máxima admisible*.

Toxicología del medio ambiente

Se ocupa del estudio de los efectos tóxicos de las sustancias químicas tanto en el medio físico como en el medio biológico. Es decir, investiga lo que puede alterar el equilibrio de un ecosistema y trata de cuantificar los efectos no deseables de los contaminantes, su confirmación experimental y su mecanismo de acción, de tal modo que se pueda estimar, por extrapolación, los niveles de seguridad y la «carga» tolerable para todos los seres vivos. Incluye la contaminación ambiental urbana que, de una parte, incide sobre la salud de la población y, de otra, ocasiona una degradación de los inmuebles ciudadanos. Sin embargo, en cierto modo, habría que diferenciar la contaminación de tipo químico, debida a la acción química de los contaminantes presentes en el medio ambiente, de la contaminación de tipo físico vinculada a los materiales de desechos y a los productos radioactivos.

En esta rama de la Toxicología se estudia el tóxico en relación con el entorno, o su ecosistema; es decir, no en el medio interno corporal del ser humano, sino en el medio ambiente (aire, agua, alimentos, seres vivos etc.). Realmente investiga lo que pudiera llamarse *dosis sin efecto* (no effect level), comparable al valor de la *concentración máxima permisible*, que se usa en el área de la toxicología ocupacional.

Por consiguiente, es una ciencia de seguridad donde el tóxico se denomina «contaminante», que por su gran ubicuidad (son sustancias que se encuentran por todas partes) necesitan que se establezcan unos límites de tolerancia. En definitiva, hay que delimitar lo *soportable* de lo *no aceptable*.

Un nuevo campo de investigación dentro de los aspectos tóxicos relacionados con la incidencia ambiental se conoce hoy día como *Toxicología conductista*. En ella se estudian los cambios en el comportamiento y en la función neurológica, que son la consecuencia de las acciones ejercidas sobre personas por la exposiciones a niveles muy bajos de una amplia variedad de agentes físicos y químicos.

Es un nuevo campo, relacionado con la Toxicología ambiental, que va tomando cuerpo al aumentar las investigaciones sobre la seguridad ocupacional y la salud. Un factor clave para conceptuar el fenómeno tóxico dentro de esta especialización radica en que los efectos tóxicos provocados sobre el ser humano deben aparecer como perturbaciones sutiles del comportamiento, o de la función neurológica, mucho antes de que lleguen a manifestarse como cualquier síntoma clásico de intoxicación.

Por otra parte, también se ha encontrado cómo algunas sustancias químicas de síntesis, aplicadas a los diversos campos de la vida humana, son mutagénicas a nivel experimental, lo que constituye un peligro genético potencial tanto para la población actual como para las futuras generaciones, ante el riesgo de cambios en el ADN que den lugar a mutaciones genéticas transmisibles. Sin duda, estos hechos amplían el campo de estudio de esta rama de la Toxicología, que debe establecer los métodos más adecuados para caracterizar los posibles cambios inducidos.

Toxicología alimentaria

Rama aplicada de la Toxicología que centra su atención sobre los aspectos tóxicos de los componentes de los alimentos y de los hábitos nutricionales. En la práctica, se ocupa de modo fundamental de aquellos riesgos tóxicos que se encuentran vinculados a la ingestión de alimentos; unas veces, porque aportan estructuras tóxicas que provienen de sus ingredientes naturales; otras, porque se han formado como consecuencias de los procesos tecnológicos empleados; en ocasiones, porque han sido adicionadas intencionadamente con algún fin especial.

La Toxicología Alimentaria está implicada en una serie de problemas bastante complejos, que afectan a la salud humana. Así, la producción agroalimentaria no es ajena a la contaminación accidental, que se puede presentar bajo múltiples formas, y que es preciso controlar, reducir, neutralizar, etc.; también, la actual tecnología de alimentos exige el empleo de aditivos y auxiliares tecnológicos, cuya inocuidad y peligrosidad preocupa, exigiendo la necesidad de vigilar su empleo para salvaguardar la salud y la higiene pública.

Por otra parte, tanto las deficiencias en la ingestión de nutrientes, como el tomarlos en cantidades excesivas comportan unos efectos nocivos para la salud humana. De aquí la inclusión de los trastornos de tipo nutricional entre los de más alto riesgo con referencia a la salubridad de la alimentación. En la actualidad, se conoce bastante bien la mayoría de los peligros potenciales planteados por ingestiones carenciales o excesivas de nutrientes; sin embargo, todavía queda mucho por aclarar acerca de los peligros tóxicos derivados del uso inadecuado de los alimentos. Por ello, la Toxicología nutricional forma parte de la Toxicología alimentaria, que en su conjunto abarca un campo más amplio que la primera.

En el momento actual, la Toxicología Alimentaria se presenta como una importante especialización de la Toxicología, que reclama la atención de numerosas Asociaciones Internacionales y es objeto del trabajo de numerosos investigadores. Su principal objetivo es el de establecer unos principios, revisables periódicamente, que regulen la utilización de las diversas sustancias químicas en la elaboración de los alimentos, muchas de ellas empleadas en cantidades reducidas, pero acumulables por el organismo vivo hasta alcanzar dosis con efectos tóxicos.

Para ello, la Toxicología Alimentaria recurre a disciplinas muy variadas, como un verdadero ejemplo de su carácter pluridisciplinar: la química estructural (cómo prever una toxicidad a partir de una estructura fisicoquímica dada), la biofísica y la bioquímica (ambas fundamentales para comprender el mecanismo tóxico y la genotoxicidad), el análisis químico, la nutrición, etc.

Aspectos cualitativos y cuantitativos de la toxicología

- Concepto de tóxico
- Clasificación de los agentes tóxicos
- Concepto de intoxicación
- Tipos de intoxicaciones
- Concepto de toxicidad
- Criterios aplicables al estudio de la toxicidad
- Relaciones efecto-tiempo-dosis
- Conceptos de selectividad, sensibilidad y margen de seguridad
- Factores moleculares que influyen en la toxicidad de una sustancia

Concepto de tóxico

En rigor, no resulta fácil definir con propiedad lo que debe entenderse como *Tóxico* y todas las definiciones que se han dado suelen adolecer de alguna imprecisión. En la práctica, no se dispone de un elemento definitorio que permita distinguir con claridad cuando, algunas sustancias deben ser consideradas como alimento, medicamento o tóxico. Es decir, de acuerdo con las circunstancias, una misma sustancia puede comportarse como una de las tres cosas, porque en la realidad no existen sustancias tóxicas absolutas sino relativas, que sólo se comportan como tales cuando su presencia en el organismo alcanza cierto nivel.

Así, la diferencia entre una actividad tóxica y otra medicamentosa puede radicar en la intensidad de la actividad y en los resultados alcanzados. Un medicamento es un agente modificador de un estado patológico, pero sólo hasta el límite de concentración en que es capaz de mejorar la situación patológica sin peligro para la salud. Una vez traspasado este límite, el medicamento se convierte en un tóxico.

A primera vista, parece que la bondad o la nocividad de una sustancia química es una propiedad que se relaciona con la cantidad presente en el organismo. Por consiguiente, el factor determinante de la peligrosidad de una estructura química es la dosis a la que actúa dentro del organismo, pues el efecto nocivo aparece cuando el contacto con el sistema biológico tiene lugar a concentraciones suficientes. Ya en el siglo XVI, Paracelso había postulado que ninguna sustancia es en sí misma un veneno y que sólo la dosis le convierte en tal; basado en ello se ha llegado a sugerir que el tóxico no existe en cuanto *entidad* sino como un *concepto*. Con esto se quiere dar a entender que son los factores implicados en el fenómeno tóxico los que se conjugan para conferir a una sustancia química la propiedad de ser tóxica, propiedad que nunca será algo fijo e inherente a esa sustancia, como lo son sus propiedades físicas.

De todos modos, entre otras, puede servir como definición de tóxico la siguiente:

«Toda sustancia química que, incorporada al organismo vivo a determinada concentración, produce en virtud de su estructura química y a través de mecanismos fisicoquímicos y bioquímicos, alteraciones de la fisicoquímica celular, que pueden ser transitorias o permanentes, siempre incompatibles con la salud y en algunos casos con la vida».

Normalmente, corresponden a sustancias exógenas al organismo y por ello también se les suele llamar *xenobióticos*. Es cierto que el concepto tóxico suele entenderse como sinónimo de algo nocivo, dañino, perjudicial y cuando se hace referencia a una sustancia como tóxica, se quiere expresar por lo general que es indeseable para el ser humano. Sin embargo, se debe tener presente que en Toxicología los efectos nocivos de las sustancias pueden ser selectivos de algunos organismos biológicos y son muchos los casos en los que sólo afecta a determinadas especies. De aquí que, aparte de la dosis aplicada, se encuentren sustancias que son mortales para ciertos organismos, como pueden ser los insectos, mientras que su actividad nociva ejerce de modo indirecto una acción que resulta beneficiosa y deseable para el ser humano. Tal es el fundamento de la aplicación de los plaguicidas a la mejora de los rendimientos de los cultivos.

Se suele emplear el término *toxina* cuando se trata de sustancias que han sido producidas por los seres vivos, bien sean animales, vegetales o bacterias, como por ejemplo, las toxinas presentes en el veneno de las serpientes o las toxinas botulínicas producidas por la bacteria *Clostridium botulinum*.

El resto de las sustancias con actividad tóxica pueden estar presentes en la naturaleza (origen natural) o haber sido originadas por una actividad humana (origen antropogénico). Conviene tener en cuenta que una misma sustancia puede manifestar ambos orígenes. En este sentido cabe citar dos ejemplos elocuentes: *a)* los hidrocarburos poliaromáticos se pueden formar tanto en procesos naturales de combustión de la materia orgánica (fuegos forestales), como a través de actividades antropogénicas (combustión del carbón para producir energía); *b)* el arsénico, puede encontrarse como contaminante natural de las aguas

terrestres, o bien proceder de una contaminación secundaria de dichas aguas por los vertidos de la actividad industrial.

Con cierta frecuencia, en el ámbito toxicológico se emplea la denominación de *sustancia peligrosa*. Bajo este concepto se quiere manifestar un aspecto importante del fenómeno tóxico: el riesgo ofrecido por una sustancia dada no sólo depende de su estructura química, sino también viene determinado por la posibilidad que tiene un organismo para quedar expuesto a la actividad de la misma, así como la cuantía de su absorción durante esa exposición.

Clasificación de los agentes tóxicos

No existe una clasificación que con carácter general permita reunir de modo perfecto a todas las sustancias poseedoras de algún tipo de actividad tóxica. Sin embargo, se pueden citar diversos tipos de sistematización de acuerdo con los diversos criterios que han servido para agruparlos:

- *Estado físico*: sólidos, líquidos y gaseosos.
- *Constitución química*: inorgánicos y orgánicos; metales, aminas aromáticas, hidrocarburos halogenados, etc.
- *Origen*: animal, vegetal, bacteriano, mineral.
- *Sistemática analítica*: fijos (metálicos, orgánicos) y volátiles (gaseosos, arrastrables por vapor).
- *Modo de actuación*: locales (irritantes y corrosivos) y sistémicos (ejercen su efecto en puntos distantes al de contacto).
- *Órgano diana*: hepáticos, renales, musculares, nerviosos (inhibidores de la función motora, exaltación de reflejos, etc.), hemáticos (proteínas plasmáticas, glóbulos rojos).
- *Efectos específicos*: mutagénicos, teratogénicos, cancerígenos, etc.
- *Uso*: aditivos alimentarios, pesticidas, disolventes, medicamentos, etc.
- *Mecanismo bioquímico de acción*: inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, productores de metahemoglobina, bloqueadores de grupos sulfhidrilos, etc.
- *Potencial tóxico*: extremadamente tóxico, muy tóxico, ligeramente tóxico, etcétera.

Resulta evidente que ninguna de estas clasificaciones simplificadas pueden ser aplicables al espectro completo de los agentes tóxicos. Lo más apropiado es manejar una combinación de algunas de ellas en función de los propósitos especiales para los que son destinados.

Por otra parte, conviene señalar que aquellos sistemas que se basan a la vez en las propiedades químicas y biológicas de los agentes tóxicos y las características inherentes a la exposición a las mismas, son los más adecuados para ser aplicados con fines legislativos o de control.

Concepto de intoxicación

La presencia de un agente tóxico dentro de un organismo vivo puede dar lugar a una alteración del equilibrio fisiológico de tal magnitud, que dicho organismo deja de estar sano porque desarrolla una enfermedad. Tales perturbaciones se ponen de manifiesto a través de unos síntomas, o cuadro clínico, propios de un proceso patológico.

Por consiguiente, con la palabra *Intoxicación* se hace referencia a la enfermedad consecuente a la injuria ejercida por un agente tóxico sobre un organismo vivo. Estas lesiones pueden variar desde unos efectos locales restringidos hasta un síndrome complejo, capaz de causar la muerte al organismo afectado.

En la práctica, toda intoxicación puede ser considerada como la suma de unos eventos que arrancan de la exposición o contacto del organismo con el agente tóxico y siguen con su penetración (absorción), su distribución, su metabolización y su excreción o su retención. En consecuencia, el agente tóxico puede suscitar un daño siempre que alcance al correspondiente receptor biológico a unos niveles de concentración adecuados.

Es frecuente hacer un uso indiscriminado de dos términos que son sinónimos: *intoxicación* y *envenenamiento*, aunque en ambos haya que distinguir consideraciones de tipo social y jurídico que les matiza e impiden su identidad. Para hablar con cierta propiedad, la palabra «envenenamiento» se reserva para indicar aquellos casos en los que se presupone una voluntariedad o intención en el desencadenamiento del cuadro clínico, como ocurre con los hechos que pueden ser calificados de criminales, suicidas, agresiones químicas de guerra o de toxicomanías. En cambio, con la palabra «intoxicación» se designa aquellas patologías tóxicas que responden a situaciones puramente accidentales, como pueden ser los procesos derivados de situaciones profesionales o al uso de alimentos o medicamentos.

Tipos de intoxicaciones

Al igual que con los agentes tóxicos, las intoxicaciones que provocan pueden ser reunidas en diferentes grupos de acuerdo con los criterios que se sigan para calificarlas: magnitud de las características de los síntomas clínicos observados, tiempo de aparición de los síntomas, origen de ellos.

- En relación con la *magnitud* que alcanzan las perturbaciones clínicas en los individuos afectados, pueden ser calificadas según tres grados diferentes de intensidades:
 - Leves.
 - Moderadas.
 - Severas.

— De acuerdo con las *características* de su aparición se puede hablar de tres tipos:

- Intoxicaciones de efectos *inmediatos ver sus retardados*: algunas sustancias producen efectos tóxicos en pocos minutos, mientras que otras muestran una acción nociva más retardada, manifestada después de un cierto tiempo. Un ejemplo extremo de este segundo caso serían las sustancias cancerígenas, que suelen presentar un período de latencia de varios años.
- Intoxicaciones *reversibles versus irreversibles*. En el primer caso, se restituye la situación normal cuando el tóxico desaparece, mientras que el daño producido en el segundo resulta irreparable. En la práctica, depende del órgano o la función afectada: así, el hígado suele tener tal capacidad para alcanzar su recuperación que los daños que le afectan pueden ser reversibles, mientras que no se vea afectado todo el órgano; en cambio, la reversibilidad resulta prácticamente imposible en el sistema nervioso central.
- Intoxicación *local versus sistémica*. Algunos pocos agentes tóxicos producen el daño en el mismo sitio donde toman contacto con el organismo, como ocurre con las sustancias irritantes o los compuestos cáusticos. Otros en cambio, necesitan ser absorbidos y translocados para afectar a sus correspondientes órganos dianas y dar lugar de este modo a un efecto sistémico, como ocurre con los insecticidas órganoclorados, que se almacenan en los tejidos grasos pero ejercen sus efectos sobre el sistema nervioso central.

En función del *tiempo* de aparición de los síntomas. La enfermedad que caracteriza a toda intoxicación suele ofrecer un cuadro clínico, cuyos síntomas están normalmente relacionados con el tiempo de acción del tóxico. En este sentido, se conceptúan cuatro tipos: *agudas, subagudas, crónicas y recidivantes*.

- Las intoxicaciones *agudas* se caracterizan por la aparición inmediata (por lo general, menos de 24 horas) del cuadro clínico patológico después de la absorción de una sola dosis, más o menos elevada, del agente tóxico. Su evolución puede conducir a una situación (c) de muerte, o bien a otra (b) que permite una recuperación parcial (d) o total (e), según puedan quedar o no secuelas o lesiones persistentes (Fig. 2.1).
- En algunas ocasiones se suele hablar de intoxicaciones *subagudas*, que no deben ser consideradas como una intoxicación aguda de menor cuantía. Se trata de una intoxicación que sigue un curso subclínico, es decir, sin que sus síntomas se presenten de inmediato de un modo aparente y claro, aunque sí se producen trastornos a distintos niveles biológicos. Son intoxicaciones que aparecen varios días después de la ingestión del tóxico y con relación al tiempo, se origina una caída lenta y progresiva en forma de pequeñas mesetas (a', a»,...) (Fig. 2.1). Tal ocurre con el paracuat, el plomo o el talio.

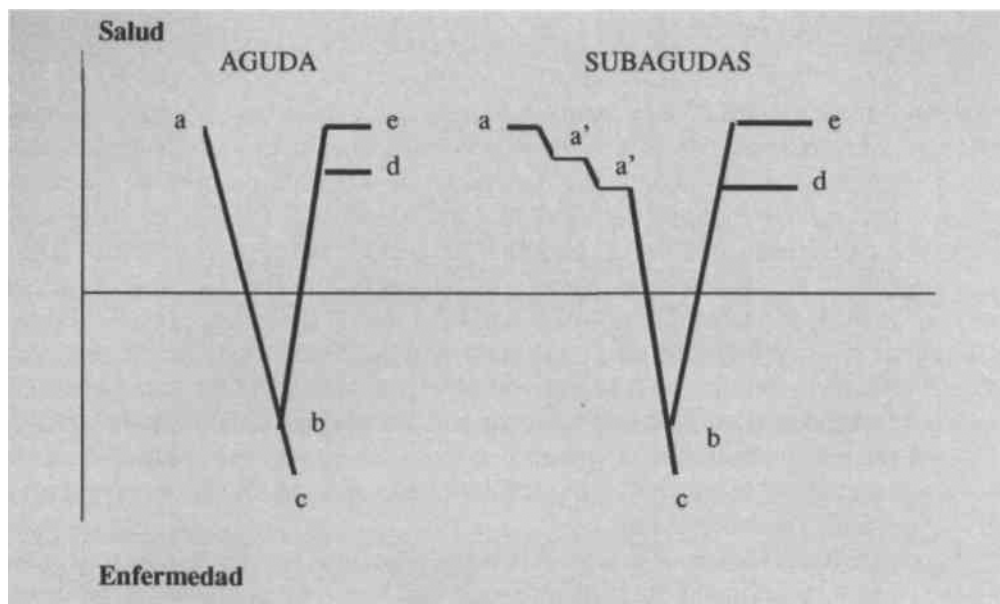


Figura 2.1. *Esquema gráfico de la evolución con el tiempo de las intoxicaciones agudas y subagudas.*

- Las intoxicaciones *crónicas* son consecuentes a la absorción repetida del agente tóxico. En muchas ocasiones, el tóxico es absorbido en cantidades muy pequeñas, pero su acumulación en el organismo permite con el tiempo alcanzar las dosis adecuadas para provocar sus efectos patológicos. En la actualidad es el tipo de intoxicación más frecuente, aunque la más difícil de detectar, porque sus síntomas van apareciendo muy poco a poco, aunque excepcionalmente también pueden surgir de modo repentino cuando el tóxico es movilizado de los depósitos en los que se acumula dentro del organismo. Normalmente son provocadas por el mal uso de medicamentos, aditivos alimentarios y plaguicidas, o por la incidencia de una contaminación ambiental, debida sobre todo a los vertidos industriales.
- En el caso de repeticiones en los cuadros clínicos, las intoxicaciones se suelen denominar *recidivantes*.
 - De acuerdo con su *etiología*, las intoxicaciones se suelen reunir en dos grandes grupos principales, aunque en cada uno de ellos se puedan considerar varios subgrupos:
- *Voluntarias*. -Son producidas por una acción intencionada, entre las que se pueden citar seis tipos diferentes:
 - Homicidios, cuando el sujeto activo difiere del pasivo.
 - Suicidio, cuando el sujeto activo y el pasivo son la misma persona.

- ❑ Abortos provocados por la ingestión de sustancias químicas, como ocurre con la mayoría de los anticonceptivos.
- ❑ Toxicofilias, o drogodependencias, determinadas por el uso inmoderado y habitual de sustancias que proporcionan ciertos estados de satisfacción, que pueden traducirse en estados de necesidad con imposición de dosis progresivas a través de diversas fases: tolerancia, acostumbramiento y necesidad. Tales suelen ser los casos de intoxicaciones por nicotina, etanol, cannabis, derivados del opio, anfetaminas, LSD, etc.
- ❑ Dopaje, como ocurre en los deportes al tomar sustancias excitantes.
- ❑ Afrodisíacos, como ocurre al ingerir sustancias alucinógenas, euforizantes, etc.
- *Accidentales.* -Son aquellas que ocurren generalmente por inadvertencia y sin ningún tipo de intencionalidad, destacando entre ellas cinco con ámbitos más o menos amplio:
 - ❑ *Ambientales:* tienen lugar como consecuencia de contaminaciones en el aire o en las aguas y, por lo general, afectan a un número elevado de personas. Sus causas pueden ser muy heterogéneas: evacuación en mares y ríos de vertidos industriales; residuos en alimentos de los plaguicidas utilizados en los tratamientos de cultivos; la emisión de plomo por los motores de explosión como consecuencia del uso de ciertos tipos de carburantes; las constantes emisiones de óxidos de azufre y de nitrógeno al ambiente en los países más industrializados; etc.
 - ❑ *Profesionales:* aparecen como resultado de la acción lenta, pero reiterada, de una sustancia tóxica que se encuentra en el ambiente propio del desarrollo laboral y que contacta durante meses o años con las personas que desarrollan en ese ambiente su ejercicio profesional sin la protección adecuada de ventilación y de higiene personal. Por consiguiente, son el resultado de las actividades insensibles y repetidas de ciertas estructuras químicas que se emplean dentro de algunas profesiones: anilinas en la fabricación de colorantes; sales de plata en la industria fotográfica; arsénico en la fabricación de papeles pintados; cloro en talleres de limpieza; cobre en fundiciones; mercurio en minas; disolventes orgánicos en talleres de pintura; plomo en la fabricación de pinturas, esmaltes, cerámicas, etc. Normalmente, la legislación establece los denominados *Valores umbrales límites*, que corresponden a las concentraciones de sustancia cuya exposición diaria no conlleva el desarrollo de efectos adversos y de este modo se regulan los niveles permisibles en cada ambiente laboral.
 - ❑ *Medicamentosas:* corresponden a una de las causas bastante frecuentes de intoxicaciones accidentales por los más diversos motivos:
 - Confusión de un medicamento por otro.
 - Sobredosificación, que por lo general responde al falso supuesto, por parte del enfermo o sus familiares, de conseguir una mejoría más rápida al tomar dosis más elevadas.

- Interacciones entre dos medicamentos, o entre un medicamento y otras sustancias, como puede ser el etanol.

Muchas veces, algunos medicamentos pueden ocasionar efectos colaterales y secundarios, que aunque sean efectos adversos e indeseables, no deben ser considerados propiamente como efectos tóxicos. Los efectos colaterales se deben a las diversas funciones que puede desarrollar el fármaco y afectar de modo simultáneo a distintos receptores.

- ❑ *Alimentarias*: relativamente frecuentes, sus causas pueden ser muy diversas:
 - Unas veces responden a la susceptibilidad individual frente a determinadas estructuras contenidas en los alimentos ingeridos (anafilaxis, alergias);
 - Otras, son consecuencia de contaminaciones bióticas o abióticas de los alimentos, que pueden contener toxinas producidas por microorganismos toxigénicos, o metales tóxicos, plaguicidas, etc.;
 - En ocasiones, se deben a estructuras naturales presentes en alimentos que se ingieren por confusión con otros; etc.
- ❑ *Domésticas*: son las que se originan dentro de la vivienda y suelen afectar a niños y ancianos que, por descuido, ingieren medicamentos, productos de limpieza, etc.

Concepto de toxicidad

Se denomina *toxicidad* «a la actividad tóxica, concreta y específica, vinculada a la estructura química de una sustancia exógena al organismo (xenobiótico) por su interacción con moléculas endógenas (receptor)».

Precisamente, esta actividad biológica es la que permite juzgar acerca de la capacidad que posee una sustancia para poder actuar como nociva para un organismo vivo bajo unas determinadas condiciones. Sin embargo, este concepto nunca se emplea de una manera absoluta sino relativa, porque no resulta posible establecer una definición exacta para la unidad de su medida, debido a que en su actividad biológica pueden incidir las más diversas variables.

En la práctica pueden señalarse tres parámetros que influyen en la toxicidad presentada por una estructura química:

- La concentración del xenobiótico en el sitio donde se encuentra su receptor, que depende de la biodisponibilidad determinada por sus propiedades fisicoquímicas, la dosis ingerida y su metabolización.
- La concentración del receptor, que depende de la especie animal, del tejido afectado, de la edad y sexo del organismo vivo, de su equilibrio hormonal, de su estado nutricional, etc.

- La afinidad del xenobiótico por el receptor, que depende de la naturaleza química del primero y de las características bioquímicas del segundo.

Por ello, es normal que se haga referencia a la toxicidad de una sustancia química como una propiedad relativa, cuya magnitud pueda estar modulada por diferentes factores: el medio ambiente y el tiempo de exposición, las características del individuo, la vía de administración, la estructura química y la dosis.

La toxicidad presentada por un xenobiótico puede ser calificada de dos maneras:

1. *Directa*: cuando el efecto nocivo es producido por la estructura primaria del xenobiótico, tal como penetra en el organismo vivo. Es el caso de muchas toxinas proteicas, de sustancias alcaloides y de agentes alquilantes.
2. *Indirecta*: cuando el efecto tóxico es provocado por algún metabolito formado en la metabolización del xenobiótico. En estos casos, se habla de la estructura primaria como *protóxica*. Tal es el caso de la toxicidad del hexano, debida a su conversión en el compuesto 2,5-hexano-diona.

Cuando los mecanismos disponibles por un organismo vivo tienen capacidad para neutralizar de modo rápido la actividad de una sustancia química extraña que ha penetrado en él, o incluso para eliminarla, suele ocurrir la recuperación de la normalidad fisiológica. Sin embargo, en el caso contrario de una superación de dichos mecanismos, resulta inevitable que se produzcan alteraciones bioquímicas o fisicoquímicas con la aparición de los síntomas conocidos como intoxicación.

Es importante señalar que los síntomas del fenómeno tóxico sólo se ponen de manifiesto cuando la concentración del agente tóxico sobrepasa ciertos límites a nivel de receptor, límites que pueden ser variables según los casos. De aquí que ningún agente químico deba ser considerado ni totalmente inocuo, ni totalmente nocivo, pues los resultados van a depender de las cantidades que tomen contacto con el sistema biológico diana. Esta circunstancia permite que algunas estructuras puedan actuar como medicamentos a unas dosis, mientras que a otras más elevadas se comporten como tóxicos, más o menos potentes.

En consecuencia, la actividad tóxica de una sustancia química puede ser concepuada como la conexión existente entre los niveles a los que se encuentra dentro de un organismo y los efectos nocivos que provoca en el mismo. El conocimiento de esta relación resulta muy importante para que la Toxicología actual desarrolle con éxito uno de sus objetivos principales: el estudio de la toxicidad de todas aquellas sustancias químicas que tienen el riesgo potencial de tomar contacto con el ser humano a lo largo de su vida.

Con relación al tiempo transcurrido entre la exposición al xenobiótico y la manifestación del daño tóxico, se puede hablar de dos tipos de toxicidad:

1. *Inmediata*: aquella donde los efectos provocados por una sola dosis de exposición aparecen los efectos nocivos dentro de un corto período de tiempo, siempre inferior a los 25 días.
2. *Diferida*: aquella en la que los efectos tóxicos aparecen después de una exposición al xenobiótico bastante prolongada.

A su vez, en esta segunda se pueden distinguir dos modalidades:

- a) *Prolongada o subcrónica*, que responde a una exposición frecuente al xenobiótico durante un tiempo superior a la décima parte de la vida del organismo vivo afectado.
- b) *A largo plazo*, que aparece como consecuencia de exposiciones a dosis muy débiles pero repetidas durante toda la vida del organismo afectado.

Criterios aplicables al estudio de la toxicidad

Para llevar a cabo los estudios sobre las actividades tóxicas de las diversas sustancias químicas, la Toxicología ha tenido la necesidad de precisar una serie de conceptos con el fin de hacer posible la interpretación adecuada de los resultados obtenidos en los diversos métodos de evaluación aplicados, y deducir conclusiones que puedan ser conceptuadas como correctas.

En primer lugar, hay que hacer referencia a los términos *efecto* y *respuesta*, que aunque a veces se utilizan como sinónimos, en cambio no lo son.

Se entiende como *efecto* cualquier cambio producido por una sustancia química sobre un sistema biológico concreto.

Una misma sustancia puede dar lugar a efectos muy diversos, desde subclínicos o inapreciables hasta mortales, siempre en función de las dosis a las que actúe. De acuerdo con esta gradación de la nocividad se distinguen dos calificaciones diferentes:

- a) *Efectos adversos*, aquellos que provocan una disminución en los niveles normales de las funciones anatómicas, fisiológicas o conductistas del individuo;
- b) *Efectos tóxicos*, aquellos resultados nocivos consecuentes a la acción del tóxico, que se manifiestan por una alteración del equilibrio fisiológico corporal. Estos efectos pueden ser de dos tipos:
 1. *Reversibles* cuando sean consecuencia de un enlace débil entre estructura tóxica y receptor. Dependen de la presencia del tóxico a una concentración determinada y desaparecen cuando se elimina el tóxico.
 2. *Irreversibles* cuando se deben a enlaces covalentes entre tóxico y receptor, difícilmente destruibles. El daño provocado persiste aún cuando el tóxico desaparezca del lugar.

En cambio, el término *respuesta* debe ser interpretado como la proporción de individuos de una población que manifiestan los efectos nocivos.

Sin duda, tanto los efectos como las respuestas siempre son una consecuencia de la actividad de una sustancia química dentro del organismo. En relación con este hecho cabe definir tres conceptos muy manejados por la Toxicología actual:

- *Exposición*.- Situación que hace posible la penetración o absorción de una sustancia tóxica por un organismo vivo.
- *Peligro*.- En el ámbito del concepto toxicidad, hace referencia a la posibilidad que tiene una sustancia de provocar un efecto adverso, una vez que ha penetrado en el organismo.
- *Riesgo*.- Representa la frecuencia con la que cabe esperar se presenten los efectos indeseables que proceden de la exposición a un agente tóxico. Corresponde al concepto estadístico de probabilidad.

Dentro de esta línea, a veces se emplea el término *seguridad* para dar a entender la existencia de una certidumbre hipotética acerca de la inocuidad que puede tener la exposición a una sustancia química, cuando ocurre bajo ciertas condiciones y a unas concentraciones determinadas.

Desde el punto de vista experimental hay que distinguir claramente entre dos términos que no son equivalentes:

Toma: Cantidad que se ingiere en una sola vez.

Dosis: Cantidad (en g o en mg) que se absorbe en 24 horas por unidad de peso corporal (generalmente en kg) y que puede estar fraccionada en varias tomas.

De acuerdo con los efectos ocasionados, las dosis pueden recibir varias calificaciones:

Nivel sin efecto observable (NISEO): la máxima cantidad de sustancia a la que todavía no se detecta ningún tipo de actividad.

La experiencia ha demostrado que no es prudente utilizar el concepto de *dosis sin efecto*, porque se conocen muchos casos en los que las consecuencias nocivas sólo se ponen de manifiesto de modo externo una vez transcurrido cierto tiempo, o incluso existen casos en los que nunca llegan a ser observadas.

Dosis terapéutica (Dt): la cantidad mínima de sustancia que careciendo de efectos tóxicos presenta, en cambio, una acción medicamentosa.

Dosis tóxica (DT): aquella cantidad de una sustancia capaz de manifestar un efecto tóxico. Cuando se trata de la más baja con capacidad tóxica se le conoce con el nombre de *Dosis tóxica mínima* (DTm).

Dosis letal (DL): aquella cantidad de sustancia que resulta mortal al ser administrada. Cuando se trata de la dosis más baja a la que se consigue la muerte recibe el nombre de *Dosis letal mínima* (DLm).

La cantidad de xenobiótico capaz de provocar unos cambios funcionales, reversibles o irreversibles, en una célula se denomina *concentración crítica celular*. El valor medio entre los alcanzados por cada una de las células de un órgano o tejido se llama *concentración crítica*. Se considera *órgano crítico* aquel que resulta ser el primero en alcanzar dicho nivel crítico en un individuo; no es equivalente al de *órgano diana*, entendiéndose como tal aquel que experimenta los mayores efectos nocivos, tanto para el individuo como para su descendencia.

La dependencia de los efectos de una sustancia química en relación con la dosis administrada se pone de manifiesto con bastante claridad cuando se trata de estudiar las aplicaciones medicamentosas de una sustancia.

De acuerdo con lo expuesto en la Figura 2.2, se pueden distinguir para los efectos observados cuatro áreas perfectamente delimitadas en función de las dosis administradas:

- A: Zona sin efectos observables.
- B: Zona de aplicación terapéutica.
- C: Zona de efectos tóxicos reversibles o transitorios.
- D: Zona de efectos tóxicos irreversibles.

Para poner de manifiesto tanto la absorción de un tóxico por un ser vivo, como su acumulación, se utiliza un grupo de parámetros bajo el nombre de *índices biológicos de exposición* (IBE). Suelen ser la expresión numérica de alguna de las variables biológicas afectadas por la incidencia de un agente externo sobre la salud del individuo.

Pueden corresponder a varios tipos de valoraciones:

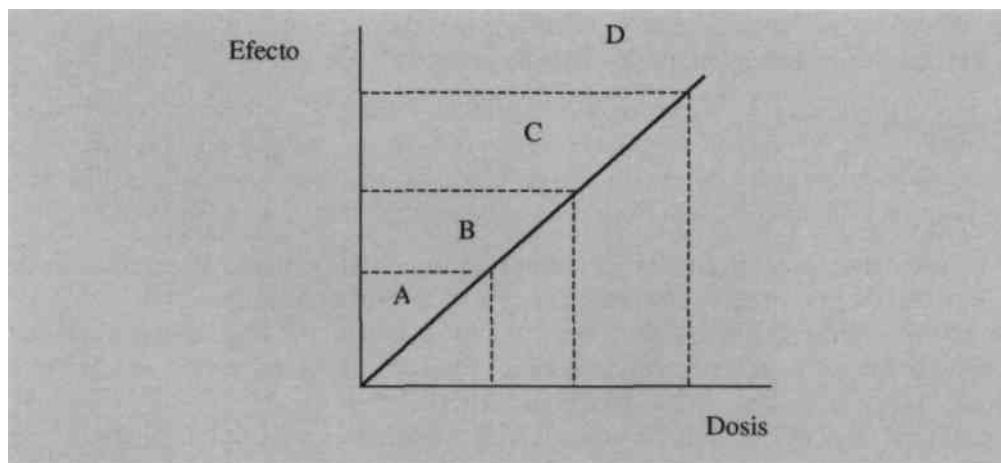


Figura 2.2. *Representación gráfica de la relación entre dosis y efecto de un medicamento.*

- Concentración del tóxico, o de sus metabolitos, en los tejidos o en los fluidos biológicos.
- Modificación de parámetros fisiológicos o bioquímicos, tales como las actividades enzimáticas, la formación de metahemoglobina, los niveles de azúcar, etc.
- Alteraciones en alguna función fisiológica, que pueden ser medidas de forma objetiva: reflejos nerviosos, diuresis renal, capacidad respiratoria, etc.

Cuando se desea establecer las respuestas de los organismos vivos a determinadas situaciones ambientales se acude a lo que se conoce como *índice de Calidad Ambiental* (ICA). La magnitud de los parámetros valorados en ese ser vivo bajo esas condiciones ambientales han permitido establecer cuatro grados o niveles de dicho ICA: admisible, alerta, alarma y peligro.

Admisible: representa aquella situación ambiental en la que no se pone de manifiesto ningún tipo de alteración fisiológica.

Alerta: corresponde a situaciones en las que aparecen ciertas reacciones de molestias, que inducen réplicas fisiológicas reflejas.

Alarma: situaciones en las que se producen patologías de tipo crónico, o se agravan las ya existentes, con un previsible incremento de la morbilidad y la mortalidad.

Peligro: cuando da lugar a patologías agudas en la mayor parte de los individuos de una población.

Relaciones «efecto-dosis-tiempo»

En Toxicología, la actividad nociva de una sustancia química se traduce en la réplica del ser vivo bajo la forma de unos efectos tóxicos. Es decir, como ocurre en todo proceso biológico, los resultados están vinculados a los individuos y, por tanto, resulta necesario trabajar siempre con metodologías que implican planteamientos estadísticos.

La cuantificación de la toxicidad de una sustancia sólo resulta fácilmente medible cuando se comprende muy bien los mecanismos de su toxicidad, de tal modo que sea posible diseñar un sistema modelo para llevarla a cabo. Sin embargo, esta situación no es la habitual en los estudios toxicológicos, donde la mayoría de las veces se conoce únicamente la estructura química del tóxico. Bajo estas circunstancias, el tratamiento dado al problema toxicológico puede quedar reducido a una determinación de la dosis capaz de provocar efectos tóxicos sobre los seres vivos con los que contacta. En la mayoría de los casos no interesa obtener el dato de una toxicidad absoluta, sino el dato «relativo» que permita comparar los efectos tóxicos de esa sustancia con otros ya conocidos.

En la práctica se manejan dos conceptos de *efecto tóxico*:

a) *Efecto tóxico gradual*: el que aumenta de modo progresivo con el incremento de la dosis hasta llegar a una dosis (D_m) en la que se alcanza un efecto máximo (E_m) (Fig. 2.3).

La representación gráfica de los efectos (E) en función de las dosis (D) viene determinada en los casos ideales por una hipérbole, que se hace asintótica a partir de la dosis (D_m) de efecto máximo (E_m); sin embargo, lo normal es que se obtenga una curva sigmoidea. Esta curva sigmoidea puede ser transformada en una línea recta cuando se representa en papel semilogarítmico.

Este es el tipo de efecto que aparece con frecuencia en los estudios *in vitro* sobre órganos aislados, tejidos o células, que resultan muy útiles para estudiar los mecanismos de toxicidad. También se puede observar en animales intactos, aunque la interpretación se hace más difícil porque los efectos graduales suelen quedar enmascarados por los diversos mecanismos de regulación que funcionan en los diversos sistemas del animal entero: nervioso, endocrino, de transporte, etc. En estos casos, los tipos de efectos graduales corresponden a parámetros que, generalmente, en un animal sano se mantienen dentro de ciertos límites gracias a la homeostasis: cambios en la tasa de crecimiento, peso de los órganos, presión sanguínea, nivel de glucosa, etc.

Las sustancias capaces de ocasionar efectos beneficiosos a dosis pequeñas únicas, pero que dan lugar a efectos tóxicos cuando se administran a unas sola dosis más elevadas, o bien de forma repetida alcanzan concentraciones tisulares elevadas, han recibido el nombre de *hormetinas*.

b) *Efecto tóxico cuántico*: es aquel en el que un individuo puede manifestar una alteración, que será la máxima posible, o bien no experimentará modificación alguna. Es decir, responde a la ley del «todo o nada».

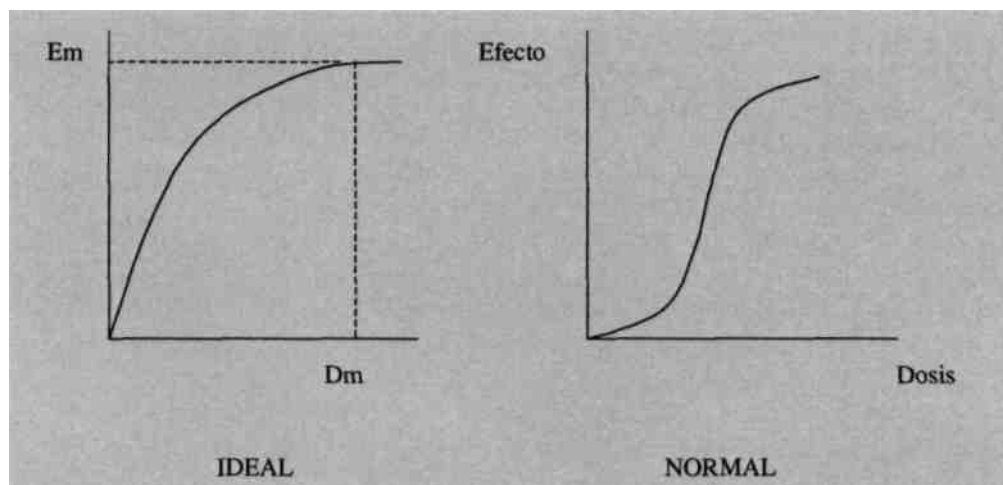


Figura 2.3. *Representaciones de la relación dosis-efecto.*

Es el tipo de efecto determinado en primer lugar en muchos estudios toxicológicos, porque se le considera como un punto de partida: se mide la toxicidad correspondiente a la administración de una sola dosis, normalmente en ratas y por vía oral. Para realizar este tipo de estudios, se parte de una población de animales distribuidos aleatoriamente en grupos, cada uno de los cuales recibe la misma dosis de sustancia problema. Para la evaluación de los efectos tóxicos se acude al parámetro conocido como *letalidad*, medido por el número de animales que mueren en cada grupo expuesto a la misma concentración de sustancia. Precisamente, este es el dato que se conoce bajo el nombre de *respuesta*, es decir, porcentaje de individuos que manifiesta un efecto referido a la población total. Sin duda, deben ser realizadas otras investigaciones complementarias como la observación del comportamiento animal antes de morir y el análisis histológico de preparaciones de órganos importantes obtenidas en la necropsia.

Debido a la variabilidad que siempre existe en una población biológica, los efectos obtenidos pueden ser muy heterogéneos y para cada dosis habrá una determinada proporción de individuos que reaccionarán de una manera determinada. Así mismo, a medida que las dosis son de mayor nivel se incrementa la frecuencia de individuos que mueren. Experimentalmente ha sido comprobado que las curvas dosis respuestas de letalidad suelen mostrar una distribución normal, representada por una campana de Gauss (Fig. 2.4). En el caso de realizar una representación acumulativa de frecuencia se obtienen curvas sigmoideas, que permiten conocer para cada sustancia su DL_{50} , es decir, aquella que provoca el 50 % de muertes dentro de la población.

La mayor parte de la curva acumulativa es lineal y, en ella, la incidencia de la mortandad se relaciona de modo directo con la concentración del compuesto presente. También permite comparar entre sí la potencia de dos o más sustancias tóxicas: será más potente aquella sustancia (A, B,...) que disponga de una pL_{50} menor. Como es frecuente emplear un número pequeño de dosis para la determinación de estas curvas dosis-respuesta, resulta difícil la determinación sobre las curvas sigmoideas del valor que se corresponda con la DL_{50} . Para soslayar este inconveniente han sido propuestos diversos procedimientos más prácticos, entre los que destaca el empleo de la probabilidad de que se produzcan las respuestas. Para ello se utilizan las unidades de probabilidad, denominadas «probits», que se corresponden con las desviaciones (sigmas) con respecto de la media.

Por consiguiente, los porcentajes de respuestas se pueden transformar en unidades de desviación típica con respecto de la media. De este modo, el correspondiente a la DL_{50} tendría valor cero, aunque para que no existan valores probits negativos se le suma de modo arbitrario 5 por lo que una respuesta del 50 % se representa por 5 probits (Fig. 2.5).

En un principio, la toxicidad era expresada en función de las intoxicaciones agudas letales provocadas por la acción de una sola toma. Estas dosis letales se calculan de modo experimental a partir de un número suficiente de animales para que los resultados obtenidos puedan tener una significación estadística. De este modo se obtienen:

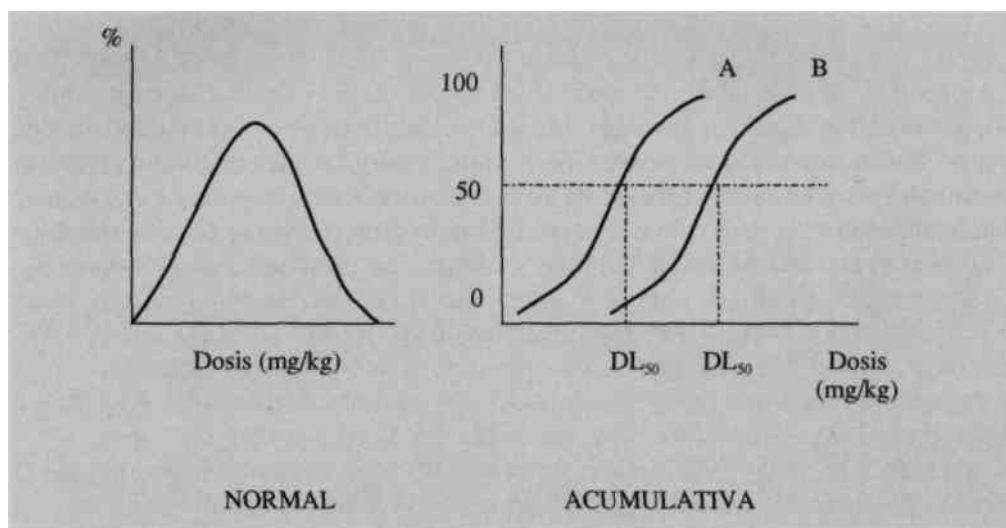


Figura 2.4. *Representación gráfica de las relaciones dosis-respuesta en una distribución normal de la frecuencia de mortalidad y en una acumulativa.*

- La *Dosis letal absoluta* (DL_{100}), que responde a la mínima cantidad de sustancia con capacidad para provocar la muerte de todos los animales del grupo ensayado bajo condiciones definidas.
- La *Dosis letal 50* (DL_{50}), que equivale a la cantidad de sustancia que mata al 50 % de la población.
- La *Dosis letal mínima* (DL_d), que corresponde a la menor cantidad de sustancia capaz de provocar la muerte de algún animal en el grupo experimental.

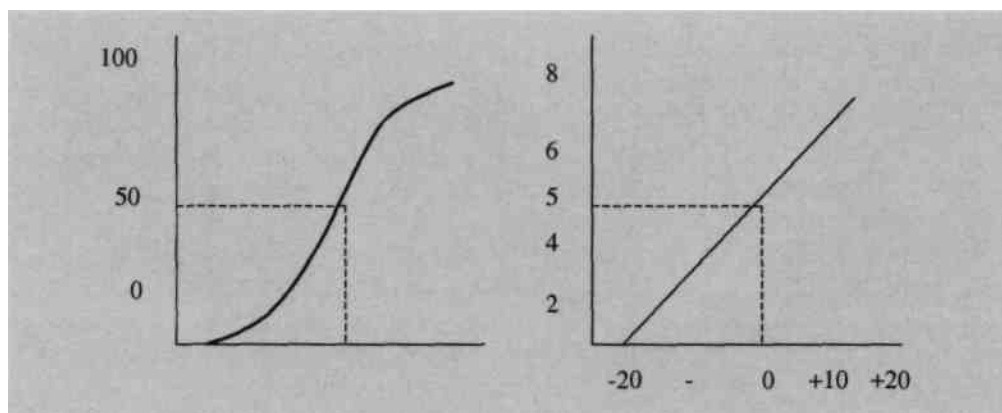


Figura 2.5. *Representación gráfica que relaciona las respuestas con la distribución normal de las dosis o la conversión de los porcentajes de respuestas en unidades probits.*

- La *Dosis umbral* (D_u), que concierne al nivel de sustancia por debajo del cual no se espera que aparezcan efectos nocivos, aunque sean de carácter leve.

Por lo general, se determinaba la toxicidad aguda representada por la DL_{50} en mg de sustancia por Kg de peso corporal. Sin embargo, como la toxicidad de una sustancia (considerada en función de su peligrosidad) y la potencia de esa sustancia (expresada en relación con la cantidad de tóxico presente) no son términos absolutos sino relativos, necesitan para su aplicación unos patrones de referencia.

En este sentido, para indicar la potencia de cualquier tipo de tóxico se ha venido utilizando una escala de valores basada en la DL_{50} de la sustancia:

	DL_{50}
1. Extremadamente tóxico	< 1 mg/kg
2. Altamente tóxico.....	1-50 mg/kg
3. Moderadamente tóxico	50-500 mg/kg
4. Ligeramente tóxico	0,5-5 g/kg
5. Prácticamente no tóxico	5-15 g/kg

Pero cuando se trata de cuantificar el efecto tóxico de una sustancia debe ser tenido en consideración un factor de gran importancia: *el tiempo de exposición*. En la práctica, los síntomas que aparecen después de un tiempo corto de exposición a una dosis relativamente elevada pueden diferir de modo notable de aquellos otros que surgen después de una exposición más prolongada en el tiempo y a una dosis relativamente baja. En el primer caso se habla de *toxicidad aguda*, mientras que en el segundo se le califica de *toxicidad crónica*. Incluso, son muchas las sustancias que no presentan de manera inmediata los efectos nocivos de una exposición crónica. Cuando se dan estas circunstancias, el tiempo que transcurre entre el inicio de la exposición y la aparición de los primeros síntomas de toxicidad se denomina *período de latencia*.

Se ha podido comprobar la insuficiencia de la DL_{50} para estimar la toxicidad de una sustancia en las situaciones más frecuentes de toxicidad crónica. Así por ejemplo, una sustancia con valores elevados para la DL_{50} , indicadora de una escasa toxicidad aguda, puede ser muy peligrosa cuando se absorbe de forma crónica. Por ello, la DL_{50} ha quedado en la actualidad como un parámetro de referencia y su determinación se utiliza como punto de arranque para la obtención de otros parámetros toxicométricos.

En este sentido se han introducido dos coeficientes que tienen en cuenta las dosis umbrales (D_u):

- *Coeficiente de acción tóxica aguda* (CATA): relación entre la DL_{50} y la D_u .

$$CATA = \frac{DL_{50}}{D_u}$$

- *Coefficiente de acción tóxica crónica* (CATC): relación entre la D_u para una sola exposición a la sustancia y la D_u correspondiente a una exposición de tipo crónico.

$$CATC = \frac{D_u \text{ (única exposición)}}{D_u \text{ (exposición frecuente)}}$$

La determinación de estos dos coeficientes ha permitido establecer una nueva clasificación de la potencialidad tóxica de una sustancia química:

Potencialidad	CATA	CATC
1. Sumamente tóxica.....	<6	> 10,0
2. Muy tóxica	< 18	> 5,0
3. Moderadamente tóxica.....	< 50	> 2,5
4. Ligeramente tóxica	>50	< 2,5

Conceptos de selectividad, sensibilidad y margen de seguridad

Dentro del estudio de la toxicidad que una sustancia química es capaz de provocar sobre una población de individuos hay que distinguir tres conceptos de cierta transcendencia:

a) Selectividad: La toxicidad de una sustancia suele ser un fenómeno selectivo, es decir, los distintos sistemas biológicos integrados en un ser vivo pueden ofrecer respuestas diferentes a la agresión de un agente tóxico.

Aunque a primera vista todos los seres vivos puedan parecer similares, porque se componen de células que utilizan los mismos nutrientes para crecer y desarrollarse, transforman la energía de la misma manera, disponen de sistemas enzimáticos similares, etc., sin embargo también presentan diferencias morfológicas, anatómicas, bioquímicas, etc. Aún siendo pequeñas, tales diferencias ponen de manifiesto en el agente tóxico una cierta capacidad para actuar de modo selectivo frente a los diferentes tipos de células o sistemas biológicos.

Los ejemplos a citar pueden ser variados:

- Las hojas de dos plantas diferentes pueden ofrecer áreas superficiales muy distintas, que dan lugar a variaciones en la cantidad absorbida de una sustancia insecticida rociada sobre ellas.
- Los insectos presentan menor resistencia que los mamíferos frente a los insecticidas aplicados porque, a diferencia de ellos, carecen de ciertas enzimas esterasas.

- El caparazón de muchos insectos es muy permeable al DDT, de tal modo que un simple contacto resulta suficiente para que penetre y provoque sus efectos mortales, cosa que no ocurre con la piel de los mamíferos.
- Algunas bacterias son únicas en utilizar como insólito componente de su pared celular el aminoácido D-alanina. De aquí que la cicloserina y otros antimetabolitos de este aminoácido puedan actuar como antibióticos eficaces y selectivos.

La aplicación de esta propiedad selectiva de la toxicidad ha sido de gran utilidad, porque ha permitido destruir, o dañar, algunas especies animales perjudiciales sin que otras se vean afectadas. Así, para destruir un parásito sin ocasionar algún tipo de perjuicio a su hospedador hace falta que la sustancia tóxica aplicada sea selectiva de ese parásito.

Para que se dé este fenómeno de toxicidad selectiva vinculado a una estructura química, hacen falta, por lo menos, dos condiciones fundamentales:

1. La existencia de órganos dianas susceptibles de responder a la actividad del agente tóxico.
2. La existencia de mecanismos capaces de concentrar a dicha estructura en las proximidades de los lugares efectores.

b) *Sensibilidad*: se trata de otro concepto de interés a tener en cuenta en los estudios toxicológicos. Los métodos para la evaluación de la toxicidad de una sustancia implican planteamientos estadísticos, que exigen trabajar sobre una población de individuos.

En la gráfica dosis-respuesta representativa de la vinculación tóxico-efecto (Fig. 2.6) se pueden establecer tres grupos diferentes de individuos en función de dicha relación: normales, hiposensibles e hipersensibles. Este fenómeno de sensibilidad diferente respecto del efecto de un determinado tóxico puede

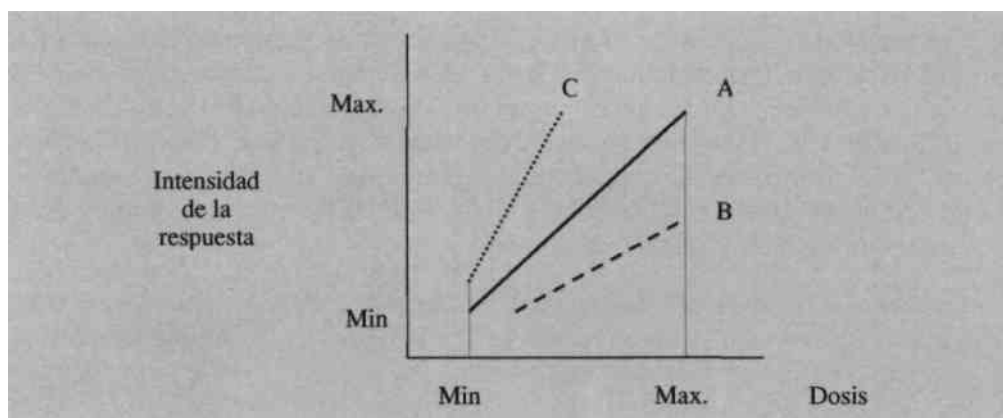


Figura 2.6. *Respuestas de individuos normales (A), hiposensibles (B) e hipersensibles (C) en una representación gráfica dosis-respuesta.*

presentarse entre grupos de individuos de una misma población, entre razas de una misma especie, entre especies etc.

Precisamente, en este hecho se basa la aplicación de agentes químicos antimicrobianos, herbicidas, pesticidas, etc., porque unas especies responden a ellos de modo hipersensibles, mientras que otras lo hacen de modo hiposensible.

c) Margen de seguridad: Se trata de un concepto de gran transcendencia en Toxicología, que viene determinado por los dos extremos a considerar en las dosis administradas: dosis inocua (DO) y dosis letal (Di). Cuando se representa el porcentaje acumulado de respuesta frente a las dosis (Fig. 2.7), se pueden distinguir tres zonas: de efecto nulo (1), de efecto reversible (2) y de efecto irreversible (3).

El margen de seguridad viene dado por la distancia entre la D_i y D_j , indicado en la gráfica por la pendiente angular de la recta, que será tanto menor cuanto mayor sea la diferencia entre las dosis inocua y letal. Por consiguiente, la sustancia A tendrá un margen de seguridad inferior a las B y C por corresponderle una recta con una pendiente más pronunciada.

Cuando se evalúa la peligrosidad o inocuidad de un agente tóxico resulta muy conveniente conocer además cuál es la zona de efectos reversibles (2), porque también puede ser índice de dosis nocivas o indeseables. Este concepto adquiere especial relevancia en la aplicación de fármacos, porque su uso terapéutico debe ser limitado a las dosis que sólo provocan efectos deseables, porque cuando se supera este nivel se puede influir lo suficiente sobre el proceso vital como para que se provoquen efectos nocivos. Por otra parte, muchos medicamentos presentan efectos colaterales que se suman a su acción básica y que la mayoría de las veces no son deseables. Así por ejemplo, la morfina que se admi-

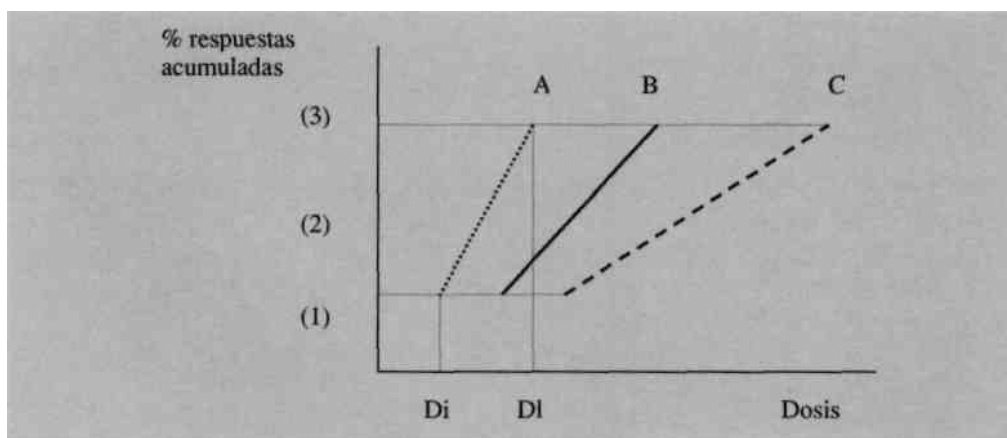


Figura 2.7. *Representación gráfica de la relación dosis respuesta para tres sustancias (A, B, C) con diferentes márgenes de seguridad: (1) zona de efecto nulo; (2) zona de efecto reversible; (3) zona de efecto irreversible.*

nistra para obtener un efecto analgésico, puede a su vez provocar una depresión respiratoria.

La Toxicología ambiental y la Toxicología alimentaria (en lo que hace referencia al empleo de aditivos) son los ámbitos toxicológicos en los que adquiere una mayor utilidad la aplicación del concepto de margen de seguridad. Como resultado de ello se suelen manejar dos parámetros importantes:

Ingesta Diaria Admisible (IDA): máxima cantidad que cada día puede ser ingerida de un aditivo dentro de la alimentación durante toda la vida sin que aparezcan efectos nocivos.

Valor Umbral Limite (VUL): corresponde al valor medio de las relaciones entre «concentración-peso corporal-tiempo», considerado como techo máximo para una exposición ambiental a un agente químico. Generalmente, expresa la concentración de ese agente a la que un organismo vivo puede estar sometido durante 8 horas diarias y 5 días por semana, sin que su salud experimente daño alguno.

Factores moleculares que influyen en la toxicidad de una sustancia

La Toxicología intenta describir y comprender los efectos nocivos que aparecen en un ser vivo como consecuencia de la actividad de una sustancia xenobiótica que ha penetrado en ese organismo. Desde hace unos años, esta toxicidad se pretende explicar en relación con la estructura molecular.

En la actualidad se está en condiciones de exponer un elenco de propiedades moleculares de un agente tóxico capaces de incidir sobre la acción tóxica y que, de hecho, resultan de gran importancia porque suelen ser determinantes de la potencia que manifiesta ese tóxico:

Coefficiente de reparto lípido/agua

Ya en el siglo xix se tenía la convicción de que la actividad biológica de una sustancia era, de alguna manera, una función de su estructura química. Más tarde, se conoció que la actividad de una serie de agentes con efectos narcóticos era proporcional a su coeficiente de partición, una medida fisicoquímica de su distribución entre dos disolventes no miscibles. En este caso se trataba de un disolvente orgánico y el agua, con una actividad tanto más potente cuanto más elevado era ese coeficiente.

En una serie homóloga, como la formada por los alcoholes de cadena recta, la magnitud de la actividad de cualquier miembro de la serie viene a ser, de un modo aproximado, tres veces superior a la del homólogo inmediato inferior; esto quiere decir que en las series estructurales homólogas la potencia activa se

incrementa en la proporción 1, 3, 9, 27,... También en 1939 se observó una elevada correlación a escala logarítmica entre la acción bactericida de esos alcoholes con toda una gama de propiedades fisicoquímicas: la solubilidad acuosa decreciente, el incremento de tensoactividad, la disminución de la presión de vapor, el aumento en el coeficiente de partición, etc.

Esta correlación se explica por la dependencia de esas propiedades de la partición entre dos fases, una lipídica y otra acuosa. Cualquier tóxico o fármaco situado en el medio extracelular del organismo ha de pasar a través de membranas lipoideas antes de alcanzar el contacto con su receptor. Por ello, toda actividad que no sea exclusivamente específica, ha de presentar un paralelismo entre su actividad biológica y todos los parámetros fisicoquímicos que dependan del coeficiente de reparto entre las fases lipídicas y acuosas. La termodinámica propia del fenómeno de la partición justifica la naturaleza logarítmica de la correlación.

La constante de equilibrio (K) que relaciona la concentración del tóxico en la fase lipídica (1) con la de la fase acuosa (a),

$$K = \frac{[\text{tóxico}]_l}{[\text{tóxico}]_a}$$

es una función exponencial de la diferencia de energía libre entre dos estados, de acuerdo con la ley de Nernst:

$$K = e^{-\Delta G/RT}$$

Así, para la serie homóloga alcohólica anterior, cada metileno añadido a la cadena carbonada contribuye con un incremento igual a la energía libre de partición, por lo que ésta corresponderá a la suma de todas las contribuciones.

En estos casos, las constantes de equilibrio, equiparables a los coeficientes de partición, vendrán dadas por los productos de lo que se conoce como *constantes microscópicas de asociación*. Por ello su actividad biológica será una función lineal logarítmica del número de metilenos.

En relación con la toxicidad de una sustancia, todavía se puede señalar una propiedad estructural que incide de modo importante sobre el coeficiente de partición: su condición hidrofílica (que determina la solubilidad en agua), o su carácter lipofílico (que precisa la solubilidad en grasa). Las sustancias hidrófilas se concentrarán casi exclusivamente en la fase acuosa, mientras que las sustancias lipófilas lo hacen en la fase orgánica o lipídica.

A nivel molecular se puede explicar la distribución de una sustancia química en términos de las interacciones que sufre con las moléculas que le rodean en uno y otro medio. Incluso el receptor puede ser considerado como un sistema lipófilo, en el cual la adsorción (o reacción con la sustancia) viene determinado por el equilibrio de fuerzas hidrófobas e hidrófilas.

Algunas veces, puede tratarse de los denominados agentes tensoactivos, que corresponden a lo que pudiéramos considerar sustancias intermedias, que tienen en sus moléculas un grupo grande de carácter lipófilo y otro pequeño de naturaleza hidrófila. Estos tipos de estructuras se suelen acumular en la zona interfacial, permitiendo la formación de *núcelas*, que viene a ser un modo de hacer llegar al medio acuoso una sustancia que no es soluble en agua.

Constante y grado de ionización

Muchas estructuras químicas con interés toxicológico se suelen encontrar en solución, tanto en su forma ionizada como en la forma no disociada. Este hecho tiene una notable transcendencia sobre la intensidad de su actividad biológica: las formas ionizadas suelen presentar un carácter marcadamente hidrófilo y resultan incapaces de penetrar a través de las capas lipídicas de las membranas celulares; por el contrario, las formas no disociadas son liposolubles y con facilidad difunden a través de dichas membranas.

El pH del medio va a ser determinante de la cantidad de sustancia que atraviesa las membranas biológicas, al influir sobre el porcentaje de formas ionizadas que se forman de acuerdo con el pK_a de cada sustancia. Como las bases orgánicas débiles están ionizadas en soluciones que tengan pH ácido, en una mezcla de grasa-agua se han de acumular en la fase acuosa. En cambio, en un medio alcalino se encontrarán bajo la forma no disociada sin cargas y se acumularán de modo principal en la fase orgánica.

Todo ello resulta de una importancia primordial para la distribución de los agentes tóxicos por todo el organismo, proceso en el que cada sustancia debe superar numerosas membranas biológicas ricas en lípidos, al igual que para su absorción por el tracto gastrointestinal en su penetración por la vía oral. Así mismo, adquiere especial relevancia para la eliminación o reabsorción por los túbulos renales. Como resultado de todo ello, en un medio ácido las bases orgánicas débiles tendrán mayor dificultad para ser absorbidas, o reabsorbidas; mientras que en los medios básicos, la dificultad corresponderán a los ácidos orgánicos débiles. Hay que tener en cuenta que las moléculas orgánicas, normalmente de alto peso molecular, no pueden pasar a través de los poros de las membranas de la pared intestinal o de los túbulos renales, por lo que necesitan pasar por difusión o por mecanismos de transporte activo.

No obstante, no hay que confundir los efectos de una no disociación como consecuencia de los valores del pH, con el enmascaramiento de la actividad tóxica provocado por la formación de un complejo molecular no disociable. Así por ejemplo, las sales de los ácidos arsenicales son tóxicas, pero no el ácido cacodilo, un derivado dimetilado ácido del arsénico que no se disocia en agua y, por tanto, no deja libre iones arsenicales. Igualmente, la toxicidad de las sales mercuriales está en razón directa con su grado de ionización. Así mismo, cuando un ión tóxico como el CN^- forma parte de un complejo mole-

cular, como el ferrocianuro o el ferricianuro, su acción tóxica se atenúa hasta desaparecer.

Acción caótrópica o desestabilización de membrana

Todo el proceso que caracteriza el conjunto del fenómeno tóxico, desde la penetración del tóxico en el organismo hasta su eliminación, implica por lo general el paso a través de diversas membranas separadoras de los compartimentos en los que se localizan los fluidos corporales. En los compartimentos líquidos del cuerpo caben distinguir una *fase lipoidea*, localizada en las membranas y en el tejido adiposo, y otra *fase acuosa*, constituida por los fluidos externos e internos.

En los *fluidos acuosos externos* se incluyen el contenido del tracto gastrointestinal, la orina, las secreciones mucosales, etc. En cambio, los *fluidos acuosos internos* comprenden tanto el fluido intracelular como el fluido extracelular formado por el plasma sanguíneo, los fluidos intersticiales, los humores acuosos y vitreos de los ojos, el líquido cefalorraquídeo y el líquido sinovial.

Consideradas en su estado natural, las membranas biológicas pueden ser conceptuadas como una bicapa de fosfolípidos muy estructurada, recubierta por moléculas de agua en uno y otro lado, conteniendo suspendidas en su interior diversas proteínas funcionales. Las moléculas muy pequeñas e hidrófilas, como la urea o los iones Cl^- y Na^+ , pueden atravesar dichas membranas por los poros acuosos, mientras que las de mayor tamaño, por lo general liposolubles, han de hacerlo a través de la fase lipoidea.

Algunas sustancias químicas pueden presentar la capacidad de integrarse dentro de la estructura de las membranas biológicas, modificando con ello su funcionalidad. A este efecto disruptivo del estado normal de una membrana se le llama *acción caótrópica*. La presencia de un agente caótrópico, como suelen ser los compuestos detergentes, destruyen la homogeneidad de la bicapa lipoidea con alteración de la permeabilidad selectiva, además de transformar sus proteínas. Este efecto caótrópico puede ser *reversible*, como ocurre en el caso de la actividad de los anestésicos locales sobre las membranas de los nervios periféricos, o bien *irreversible*, como sucede con la hemólisis provocada por los detergentes.

Afinidad por algunos compuestos celulares

Un aspecto especial de la distribución de los xenobióticos por el organismo es su *asociación* con algunos compuestos tisulares en base a una afinidad química. Dentro de estas asociaciones desempeñan un papel importante las proteínas del plasma sanguíneo y en particular las albúminas: con ello hacen posible que sustancias relativamente lipófilas, normalmente poco solubles en agua, puedan circular sin problemas por la fase acuosa que constituye el plasma sanguíneo.

En este fenómeno fisicoquímico también deben ser considerados algunos aspectos de gran transcendencia para el hecho tóxico: en el plasma sanguíneo existe un equilibrio químico entre una concentración más o menos elevada de la forma xenobiótica enlazada a las proteínas y la forma libre, por lo general, a baja concentración. Precisamente, esta forma libre es la responsable del nivel de concentración que el tóxico puede alcanzar en los fluidos intersticiales o en los órganos, siempre regulado por la forma asociada a las proteínas del plasma.

En aquellos órganos donde el tóxico se metabolice, o se elimine, se produce una reducción de la concentración de la forma libre con un cierto desplazamiento del equilibrio hacia la disociación del complejo proteico. De este modo, todo el xenobiótico queda disponible para una biotransformación o una excreción, a la vez que permite mantener una baja concentración de la forma libre en los tejidos, sin que alcance el nivel suficiente para ocasionar el daño tóxico.

Como la asociación con las proteínas plasmáticas es un proceso bastante inespecífico y muchas sustancias compiten con los puntos de asociación a pesar de presentar poca similitud estructural, no sorprende que puedan darse con frecuencia casos de desplazamientos de un xenobiótico por cualquier otro tipo de compuesto.

Acción quelante

Mediante la formación de un complejo químico con un agente quelante, se puede conseguir que una sustancia química no pueda ejercer la capacidad reactiva propia de su estructura específica. Los agentes quelantes suelen ser sustancias con la posibilidad de enlazar de modo primordial y selectivo ciertos iones metálicos polivalentes, con lo que tales iones pierden la posibilidad de ejercer su actividad biológica.

Desde el punto de vista toxicológico, estos agentes quelantes resultan bastante útiles siempre que dé lugar a un quelato muy soluble en agua, porque de este modo pueden ser excretados con facilidad por la vía renal. Tal ocurre con el quelato formado por la penicilamina con los cationes Ca^{2+} o Pb^{2+} , o por el EDTA con el Pb^{2+} . Además resulta una manera de restringir su presencia en aquellos compartimentos extracelulares en los que se distribuye: la formación del quelato hace que se reduzca de modo intenso la concentración en el líquido extracelular del ión metálico libre y se limite su presencia en los tejidos.

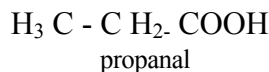
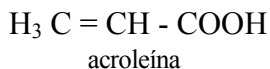
En la práctica de la terapéutica antitóxica representa un modo importante de controlar la distribución por el organismo vivo de metales pesados con efectos tóxicos.

Particularidades estructurales

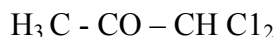
Los estudios de la Toxicología molecular han puesto de manifiesto la incidencia de algunas características estructurales específicas sobre la actividad

tóxica de una familia química determinada, unas veces neutralizando esa actividad, otras incrementándola. Entre las conclusiones más importantes podemos destacar las siguientes:

1. La existencia de una insaturación en la cadena carbonada acentúa la actividad tóxica. Tal es el caso de la acroleína, siempre más tóxica que el propanal.



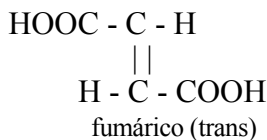
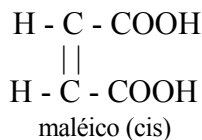
2. Los compuestos con una simetría estructural presentan unos efectos tóxicos que los asimétricos no presentan, como el carácter irritante de la forma simétrica de la dicloropropanona.



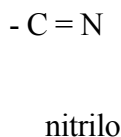
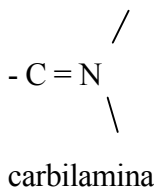
3. Las isomerías de posición suelen ser determinantes de la mayor o menor actividad tóxica. Así los alcoholes terciarios son más tóxicos que los secundarios y éstos que los primarios. También la actividad de los bifenoles sigue la serie siguiente:

orto > para > meta

4. La disposición espacial hace que las formas *levo* sean más tóxicas que las formas *dextro*, También las estructuras con dobles enlaces *cis* suelen ser más tóxicas que las *trans*, siempre más estables. Tal es caso del ácido maléico (*cis*) frente al ácido fumárico (*trans*)



5. La tautomería molecular influye en la actividad tóxica. Así, las carbilaminas son más tóxicas que los nitritos.



PARTE II

ASPECTOS GENERALES DEL FENÓMENO TÓXICO



Dalechamps, Lacques (1513-1588). «*Historia generalis plantarum. ...*»
Editado por Gulielmum Rovillium, 1587.

Etapas que caracterizan al fenómeno tóxico: fase de exposición y fase toxicocinética

- Consideraciones generales
- La fase de exposición: disponibilidad física y absorción del tóxico
- Los procesos involucrados en la fase toxicocinética

Consideraciones generales

El organismo vivo es un complejo biológico integrado por una serie de órganos, protegido de su medio ambiente por membranas o cubiertas especializadas, que además de resguardarle de las temperaturas extremas, evita las pérdidas de fluidos o los daños mecánicos, así como de bloquear la libre transferencia de sustancias químicas hacia el interior de órganos y células.

Para que una estructura química, ajena al ser vivo pueda ocasionar algún tipo de efecto sobre los mecanismos biológicos es preciso que tenga lugar una reacción, de naturaleza química o fisicoquímica, entre esa estructura y algunos de los compuestos químicos presentes en el sistema biológico. El desarrollo de estas reacciones ha de seguir los mismos criterios que rigen para los mecanismos no biológicos:

- a) Contacto físico entre las sustancias reaccionantes.
- b) Solubilidad en los fluidos, para que haga posible el contacto entre ellas.
- c) Eliminación de los productos de la reacción, para que el equilibrio químico no impida que la reacción se complete.

Todo ello debe cumplirse para que aparezca el fenómeno tóxico vinculado a la actividad perniciosa de una sustancia química extraña (xenobiótico) que ha

penetrado en un organismo vivo: los efectos nocivos de sustancias biológicamente activas son una consecuencia de la interacción, a nivel molecular, entre su estructura química y algunos de los sistemas biológicos. Por consiguiente, para realizar su actividad tóxica una sustancia química determinada resulta necesario que no solo tome contacto con un ser vivo, sino que la mayoría de las veces penetre en su interior.

En consecuencia, el contacto con una sustancia tóxica puede afectar al ser vivo de dos maneras diferentes:

- En el mismo lugar de contacto y, por ello, esas sustancias reciben el nombre de *tóxicos de acción local*. Son los que ejercen su acción de un modo inmediato sobre la piel, el aparato respiratorio, las mucosas corporales, etc. Suelen actuar por destrucción de la estructura celular al romper sus membranas mediante una alteración de las estructuras secundarias y terciarias de sus proteínas. A este grupo corresponden los productos químicos conocidos como corrosivos, cáusticos y vesicantes: ácidos, lejías, disolventes orgánicos, etc. Son sustancias con capacidad para ocasionar daños *in situ* bajo los trastornos más diversos, tales como bronquitis, conjuntivitis, etc., o bien forman un antígeno con las proteínas cutáneas, dando lugar a una dermatitis.
- En un lugar distante al de penetración y, en este caso, se les denomina *tóxico de acción sistémica*. Suelen ser la mayoría de las sustancias tóxicas, que mediante una translocación llegan a contactar con los puntos específicos sobre los que pueden ejercer su actividad nociva.

Genéricamente, la penetración de una estructura química en el interior de un organismo vivo se denomina *absorción*, fenómeno que en la práctica puede suceder a través de un amplio espectro de posibilidades. De acuerdo con lo indicado en la Figura 3.1, las posibles rutas de penetración son muy variadas, como diferentes resultan los caminos que han de recorrer para alcanzar sus sistemas biológicos específicos aquellas que han conseguido penetrar. Todo ello desemboca en numerosas interacciones posibles con los resultados mas variados. Para desembocar en el efecto tóxico, el mecanismo implicado en las acciones tóxicas sistémicas exige la concatenación de una serie de procesos.

Desde un punto de vista conceptual hay que distinguir claramente entre dos términos:

- *Acción tóxica*: conjunto de procesos vinculados a la presencia de una estructura química que conduce a un efecto tóxico como resultado final.
- *Efecto tóxico*: resultado pernicioso que resulta de una alteración provocada sobre algún equilibrio fisiológico, o bioquímico, propio de un organismo vivo. En la práctica, este efecto nocivo puede ser reversible o irreversible.

La génesis de un efecto tóxico, que pudiéramos calificar de «clínicamente observable», responde a la suma de toda una serie de procesos bastante complejos

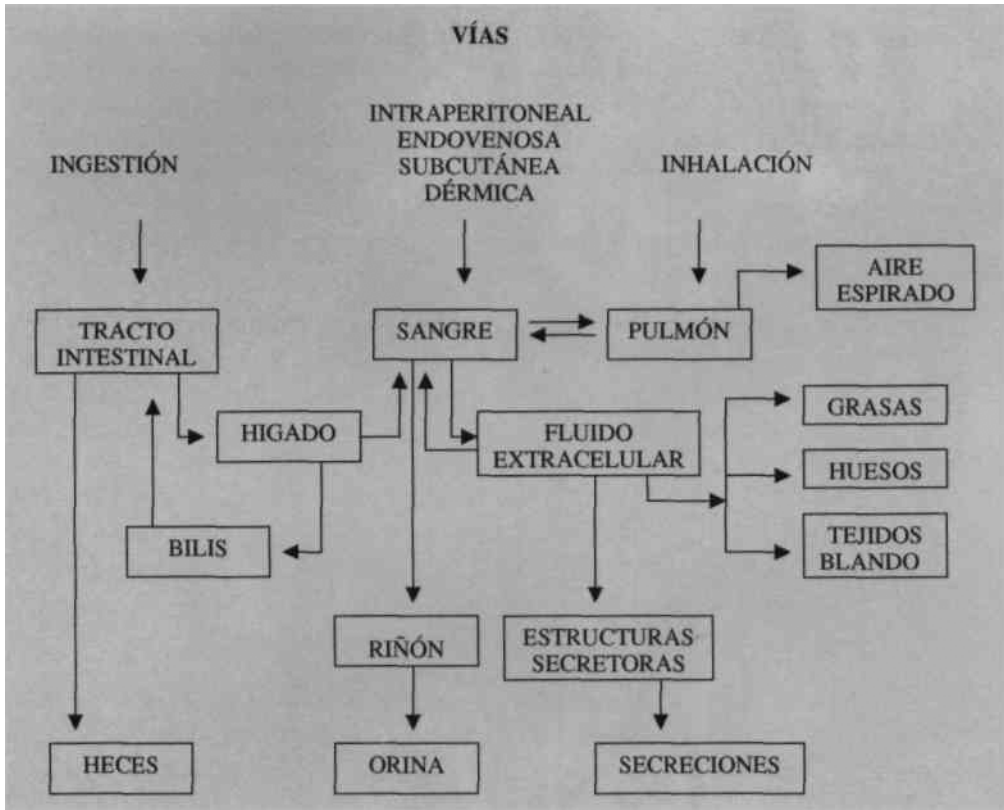


Figura 3.1. *Posibles rutas a seguir por una sustancia tóxica que contacta con un organismo vivo.*

que, de un modo arbitrario, se suelen agrupar en tres fases diferenciadas: Exposición, Toxicocinética y Toxicodinámica. En la Figura 3.2 se representa una sinopsis del mecanismo vinculado a la acción tóxica de una sustancia que permite llegar, a través de cada una de estas fases, desde el contacto hasta el efecto tóxico.

La fase de exposición: disponibilidad física y absorción del tóxico

En primer lugar, hay que considerar todo lo relacionado con la posible incidencia externa de una estructura a través de las eventualidades más diversas: el medio ambiente, la alimentación, la medicación, etc.

En este sentido, recibe el nombre de *fase de exposición* el conjunto de factores que permiten la penetración, o absorción, de una estructura química externa hasta el interior del organismo vivo.

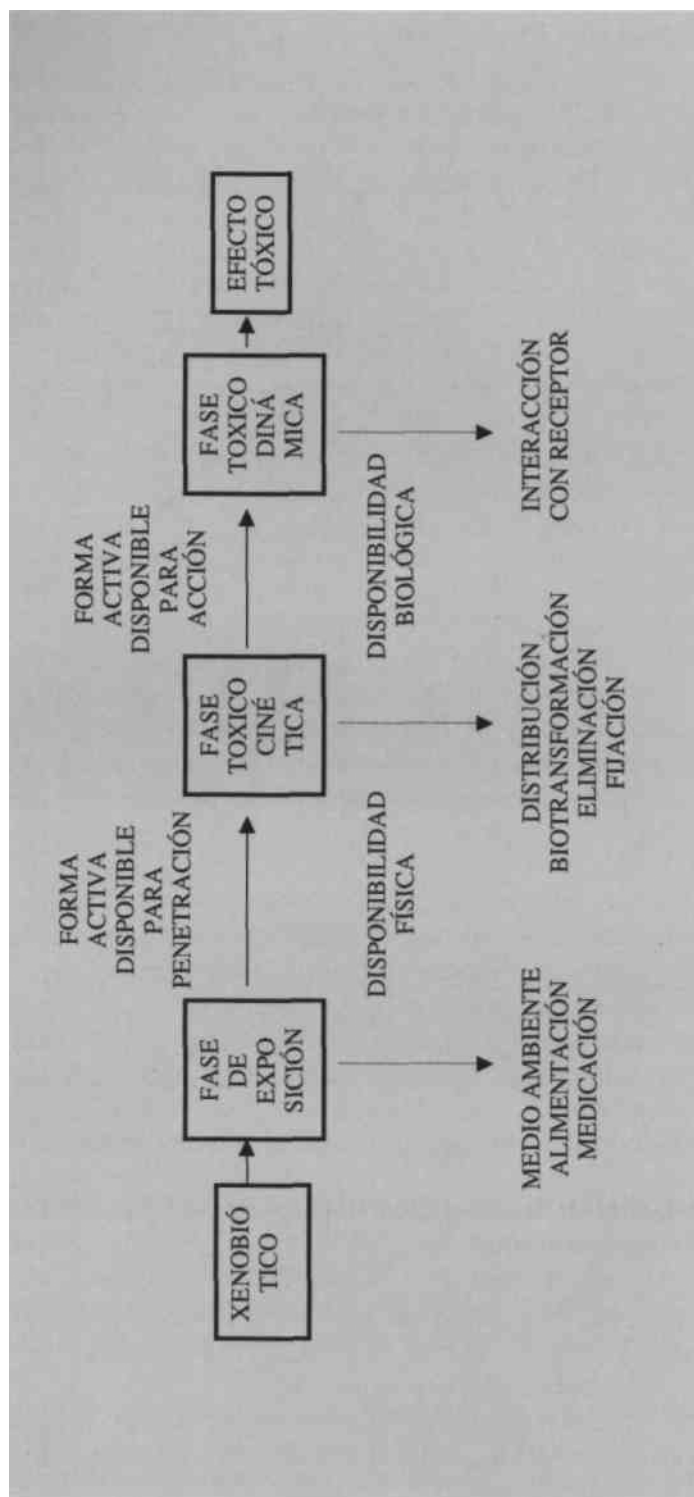


Figura 3.2. Fases de la acción de una sustancia tóxica.

Disponibilidad física del tóxico

En esta fase inicial del mecanismo tóxico, puede ocurrir que la molécula química alcance la forma activa que le capacita, o le dispone, para su penetración. Su resultado es lo que se suele conocer bajo el concepto de *disponibilidad física*.

Para poder cuantificar el nivel de exposición de un organismo vivo frente a la actividad nociva de una sustancia tóxica es preciso que se conozcan algunos datos relacionados con la procedencia de dicho tóxico y con su cinética ambiental. La liberación de sustancias químicas a la atmósfera se conoce con el nombre de *emisión*, mientras que el vertido en las aguas de ríos, lagos, mares, etc. se denomina *descarga*.

Cuando se trata de un accidente, el proceso suele ser ocasional, o esporádico, y casi siempre muy concentrado; en cambio, cuando responde a un hecho habitual y frecuente los niveles de vertido son más bajos, pero generalmente continuos durante un largo período de tiempo. Estos niveles se miden en masa/unidad de tiempo, aunque en las proximidades de la fuente de producción es interesante valorar también la concentración de la sustancia vertida en el medio, con el fin de poder prevenir la posibilidad de que aparezcan intoxicaciones agudas.

El proceso de transmisión de una sustancia química al medio ambiente se denomina *dispersión*; en él suele tener lugar una dilución en el aire o en el agua. Cuando se trata de una sedimentación en suelo, aguas subterráneas, suelo forestal, etc. recibe el nombre de *deposición*, que puede ser «seca» si resulta por la acción de la gravedad o «húmeda» si es ocasionada por el agua de lluvia (deposición húmeda).

Como resultado de una u otra se tiene una *concentración de exposición*, que se expresa en masa/unidad de superficie/unidad de tiempo. Para poder cuantificar una previsible exposición futura, resulta importante conocer tanto la concentración ambiental como la deposición. En principio, cuando se trata de sustancias que ejercen su acción tóxica de un modo inmediato, interesa saber los valores de las concentraciones en un momento determinado, pero en el caso de sustancias que se acumulan y dan lugar a una toxicidad crónica resulta más importante disponer de los valores medios correspondientes a largos períodos de tiempo.

Por lo general, el nivel de exposición al que puede estar sometida una población se valora de diversas formas:

- Como *exposición externa*. Se estima la cantidad de tóxico ingerida, o inhalada, a partir de sus concentraciones en los alimentos, bebidas, medio ambiente, etc.
- Como *exposición interna*. Se determina la presencia del tóxico dentro del organismo a partir de los valores del tóxico, o de sus metabolitos, en sangre y orina. Lo ideal sería conocer estas concentraciones en el órgano diana, pero pocas veces resulta factible.

Cuando las valoraciones de tipo ambiental (exposición externa) o de tipo biológico (exposición interna) se realizan con cierta regularidad durante un período, más o menos largo, de tiempo se habla de una *monitorización*.

Uno de los problemas que se le plantea a la Toxicología, de modo especial a la ambiental y ocupacional, radica en el hecho frecuente de una implicación de otras sustancias en el proceso de exposición al tóxico. Además, el conjunto de sustancias que pueden interaccionar con el tóxico en el ambiente puede ser diverso, no sólo desde un punto de vista cualitativo (sustancias muy diferentes), sino también cuantitativo (concentraciones relativas muy distintas). En todos estos casos puede resultar muy difícil hacer una predicción adecuada de los riesgos que implica la exposición a ese tipo de tóxico. Dentro de los límites técnicos y económicos, se debe intentar mantener en el medio ambiente unas concentraciones mínimas de esas sustancias para que sea posible alcanzar los niveles requeridos para lograr un *riesgo cero*.

Dentro de los numerosos casos posibles en la práctica, hay que destacar aquellas *combinaciones peligrosas* de sustancias que, por el peligro implicado en la capacidad de reaccionar entre sí, puede obligar a un empaquetado, transporte y almacenamiento por separado. También en algunos de los incendios se puede formar mezclas de gases y vapores tóxicos. Así mismo, el empleo de agua para extinguir aquellos incendios que ocurren en industrias químicas implica un grave problema por el riesgo de formación de sustancias tóxicas. En lo que respecta al medio ambiente, cabe citar el peligro de los *smogs* (mezcla de humo y niebla) cuando incluyen anhídrido sulfuroso o tricloroetileno. Un ejemplo muy particular es el caso de los vertidos en óxido de mesitilo que algunas industrias hacen a los ríos. Por lo general, este producto suele ser vertido a concentraciones muy bajas y apenas resulta molesto; sin embargo, cuando coincide con la presencia de SH_2 , formado en esas aguas por un proceso independiente de putrefacción bacteriana, se transforma en un derivado mercaptano (4-mercapto-4-metil-pentan-2-ona), que incluso a muy bajas concentraciones presenta un desagradable olor a «orina de gato».

De una parte, la presencia de varias sustancias en el medio ambiente puede dar lugar a que sean absorbidas de modo simultáneo o bien por separado. De otra, cuando dos xenobióticos coinciden en el medio ambiente pueden ocurrir tres posibilidades:

- a) Que den lugar a efectos tóxicos diferentes.
- b) Que potencien su actividad tóxica.
- c) Que se reduzcan sus actividades tóxicas.

En los dos últimos casos se puede hablar de una interacción entre los dos xenobióticos, durante la fase de exposición. Ante el riesgo de que se produzca la segunda posibilidad, hay que evitar la coincidencia de sustancias peligrosas, es decir, no se deben mezclar aquellas sustancias que presenten peligros especiales cuando están juntas. Así por ejemplo, no se deben mezclar cianuros y ácidos, porque enseguida se produce ácido cianhídrico fuertemente tóxico; tanto los

metales alcalinos, como el Al y Mg finamente divididos, deben ser mantenidos separados de los halógenos y los hidrocarburos halogenados, porque pueden reaccionar entre ellos de un modo violento. Las consecuencias de estas interrelaciones pueden ser de lo más diversas: unas veces, pueden suponer un aumento del tiempo en el que las sustancias tóxicas quedan disponibles; por el contrario, otras veces se reduce este tiempo y con ello se disminuye el riesgo tóxico. No deben ser confundidas estas situaciones con la combinación intencionada de sustancias peligrosas.

La absorción o penetración del tóxico

Las principales fuentes de sustancias químicas capaces de contactar con los organismos humanos suelen proceder del medio ambiente y de los alimentos. Como ha sido puesto de manifiesto con anterioridad en la Figura 3.1, los xenobióticos que toman contacto con los seres vivos pueden llegar a su interior a través de las rutas más diversas.

En general, suelen ser las propiedades físicas y químicas de cada compuesto los factores determinantes del modo de penetración, muchas veces accidental y en algunas otras voluntario. Así, lo normal de una sustancia volátil es su penetración por las vías respiratorias, mientras que los productos sólidos han de hacerlo por la vía oral.

Por tanto, el estudio del mecanismo implicado en el fenómeno tóxico ha de comenzar por tomar en consideración todos aquellos factores que permiten, o facilitan, la absorción o penetración del tóxico.

En realidad, se trata de conocer la exposición de nuestros organismos a la posible actividad de tales agentes químicos, porque de su magnitud van a depender las concentraciones que pueden alcanzar dentro de los diferentes puntos del organismo. De aquí, que esta etapa resulte esencial para que un tóxico logre alcanzar a nivel de su receptor la dosis que hace factible la asociación con el órgano diana y dar lugar al efecto nocivo.

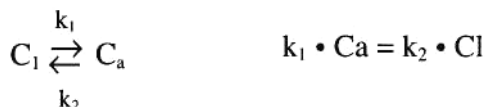
Aunque se podrían señalar diversos factores como determinantes del *Grado de riesgo* vinculado a la fase de exposición, sin embargo cabe destacar tres como los más relevantes:

- a) Factores relacionados con la higiene y la seguridad del lugar de trabajo, con la vivienda, o con el lugar donde se desarrolle la vida de las personas.
- b) Factores vinculados a los hábitos alimentarios de las personas.
- c) Factores fisicoquímicos ligados a la estructura química, reguladores de la posibilidad de atravesar las membranas biológicas que se le oponen a su paso hasta localizar al receptor biológico. Normalmente, las estructuras de los xenobióticos han de atravesar las barreras biológicas a través de mecanismos de difusión pasiva, porque los sistemas de transporte activo quedan reservados a las moléculas que tengan una analogía estructural con las biológicas naturales.

Una propiedad molecular esencial para facilitar la difusión a través de las barreras biológicas, por lo normal ricas en componentes lipídicos, es precisamente la liposolubilidad, hasta el punto que sólo las sustancias liposolubles tienen capacidad para ser difundidas con cierta velocidad. En este sentido cabe destacar tres parámetros, relacionados entre sí de alguna manera, que inciden sobre ella: el pH, el grado de ionización de la molécula y el coeficiente de reparto.

El pH es un factor determinante del grado de ionización, o de disociación, de una molécula y por tanto de su solubilidad en los lípidos, porque las formas no ionizadas, o no disociadas, son más liposolubles.

La difusión pasiva tiende a equilibrar las concentraciones a uno y otro lado de una membrana biológica, pero siempre en función de las distintas capacidades que tenga una sustancia para disolverse en la fase lipídica y en la fase acuosa, es decir, en función del coeficiente de reparto. De aquí la importancia práctica que adquiere la relación entre las concentraciones del agente tóxico en la fase lipídica (C_l) y en la fase acuosa (C_a), relación que se denomina *factor de bioacumulación* (K_b).



$$\frac{C_l}{C_a} = \frac{k_1}{k_2} = K_b$$

En relación con los agentes externos que pueden incidir sobre los seres vivos, el tiempo que tarda un organismo en equilibrarse con su medio ambiente va a depender de varios factores:

- Grado de lipofilia del agente extraño.
- Concentración del tóxico en el medio exterior.
- Superficie de intercambio.
- Volumen total del organismo.
- Masa grasa que caracterice al organismo.

En el caso de alimentos, el tracto gastrointestinal representa una superficie de intercambio muy importante: en el medio exterior, los enterocitos de la mucosa intestinal enriquecen su contenido en el tóxico, mientras que en el medio interior del tejido la concentración del tóxico viene a ser muy baja, por lo que se facilita la difusión pasiva.

Para la absorción de un xenobiótico por el organismo vivo no existen vías especializadas, sino que las estructuras tóxicas han de seguir las mismas vías disponibles para las sustancias que pueden ser consideradas como fisiológicamente normales. Por ello, dejando a un lado las vías especiales utilizadas en la

experimentación toxicológica, sólo existen tres vías que pueden ser conceptuadas como *naturales* para la penetración de los xenobióticos que llegan a través de la alimentación o del medio ambiente: la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal.

Penetración por la piel

La piel del ser humano puede estar en contacto con numerosos agentes tóxicos, pero por fortuna son muy pocos los que tienen capacidad para penetrarla. Dispone de unas barreras lipídicas que separa al organismo de su medio y le hace bastante impermeable. No obstante, existen estructuras químicas que pueden ser absorbidas por el tejido cutáneo en cantidades suficientes para llegar a provocar efectos sistémicos. Así, por ejemplo, el $C_{14}C$ puede ser absorbido a través de la piel y ocasionar daño en el hígado; muchos plaguicidas pueden ser absorbidos por la piel de los obreros que los aplican y provocarles patologías graves.

Sin embargo, la posibilidad de que un xenobiótico penetre en el organismo a través de la piel está marcada, en primer lugar, por la estructura del tejido, que opone al paso del tóxico una barrera formada por un gran número de células. En el tejido epitelial caben distinguir varios tipos de células y organizaciones estructurales con unas características específicas y peculiares, que responden de modos diferentes al paso de cada xenobiótico: células epidérmicas, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, folículos pilosos.

Hay que tener en cuenta que la *velocidad y grado de penetración* pueden variar con bastante amplitud debido a lo heterogéneo de este tejido, que suele presentar zonas de grosores muy diferentes. Lo normal es el paso a través de las células epidérmicas, que ocupan la mayor proporción de superficie, mientras que el tamaño reducido de los folículos pilosos solo permiten el paso inmediato de sustancias de bajo peso molecular. Dada las características peculiares de estas estructuras cutáneas no extraña que el paso a través de ellas deba responder a procesos de difusión pasiva, marcados por la liposolubilidad de las sustancias. Por tanto, las sustancias con mayor riesgo en cuanto a su penetración en el organismo a través de la piel serán todas aquellas con características muy lipófilas: compuestos orgánicos nitrados; anilinas y aminas orgánicas de uso frecuente en la síntesis de colorantes; fenoles; ácido salicílico; etc.

Varios son los principales factores que determinan la absorción cutánea de un compuesto: las propiedades fisicoquímicas, sobre todo las vinculadas a la liposolubilidad; el pH; la magnitud de la ionización molecular; el tamaño de las moléculas; etc. También algunos factores locales, tales como la temperatura y el flujo sanguíneo pueden modificar la velocidad de absorción del tóxico.

Por otra parte, ha sido comprobada la existencia de otros dos factores reguladores de la velocidad y grado de penetración: la especie animal y la integridad del tejido epidérmico. Así por ejemplo, se sabe que el gato tiene una piel mucho

menos permeable que las ratas y los conejos, mientras que la permeabilidad de los cobayas es semejante a la del ser humano. Precisamente, esto explica que los insecticidas sean mortales para los insectos, donde son absorbidos a través de la gran superficie de su exoesqueleto quitinoso, mientras que a través de la piel de los mamíferos apenas llegan a niveles tóxicos.

También, todas aquellas circunstancias que afectan a la integridad del tejido cutáneo modifican la penetración de los xenobióticos a través de la piel: cuando la capa sebácea lipóide se encuentra intacta apenas resulta permeable a las sustancias hidrófilas, mientras que las lipófilas penetran con cierta facilidad; en cambio, cuando resulta dañada, ambos tipos de sustancias pueden ser absorbidas con toda facilidad. En este sentido, la penetración de los xenobióticos resulta facilitada por el daño ocasionado por la acción de álcalis y ácidos. También algunos disolventes orgánicos de alta polaridad, como pueden ser el dimetilsulfóxido, la dimetilformamida o la dimetilacetamida, pueden atravesar la piel con toda facilidad y arrastrar, a su vez, aquellas sustancias que les son solubles.

Penetración por las vías respiratorias

En los organismos vivos se pueden observar respuestas tóxicas como consecuencia de la absorción a través de los pulmones de xenobióticos que se encuentran en la atmósfera ambiental; en este caso se trata de una inhalación a la que sigue un proceso de difusión a través de los alveolos del tejido pulmonar. Como factor limitante hay que citar el tamaño de las partículas: solamente pueden pasar desde los pulmones a la sangre aquellas partículas cuyo tamaño sea inferior a una micra.

Las sustancias con estas posibilidades pueden ser de dos tipos:

- Gases y vapores: CO, NO₂, SO₂, Cl₄, C, C₆H₆, etc.
- Pequeñas partículas en suspensión: líquidas (aerosoles) o sólidas (nubes, polvos, humos, polen, etc.)

Tanto unos como otros pueden ser absorbidos con gran rapidez en los alveolos pulmonares, debido a que la gran superficie de estos favorece el contacto intenso con la sangre que fluye por los mismos.

No obstante, se pueden señalar varios factores que entran en juego para la difusión del xenobiótico hacia la sangre circulante a nivel de los alveolos pulmonares:

- La presión parcial de los gases.
- Las concentraciones del tóxico en los pulmones y en la sangre.
- La capacidad del tóxico para enlazar con las proteínas de la sangre.
- La solubilidad del tóxico en los lípidos sanguíneos.

Algunos pocos contaminantes ambientales apenas si plantean problemas de molestias; en cambio, muchos otros tienen capacidad para provocar intoxicacio-

nes, tanto locales como sistémicas. Los peligros actuales, o potenciales, asociados a una exposición del ser vivo a los contaminantes atmosféricos a través de las vías respiratorias, tienen particular importancia en los ambientes industriales, donde no resulta extraño encontrar con cierta frecuencia intoxicaciones que son una consecuencia directa de los ambientes de trabajo.

Por ello, la legislación sobre seguridad laboral ha establecido los niveles máximos atmosféricos permisibles para algunas sustancias, como garantía de unos márgenes de seguridad. Sin embargo, estos umbrales de seguridad solamente sirven como una orientación acerca de la peligrosidad relativa que conlleva cada uno de los numerosos contaminantes localizables en muchos ambientes profesionales.

Penetración por la vía oral

La vía oral representa la tercera de las rutas convencionales de penetración de xenobióticos en el organismo vivo y alcanza todo el tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano. Aunque se encuentra en la parte interior del cuerpo, sin embargo su contenido no debe ser considerado como algo integrante del mismo, como pueden serlo los fluidos biológicos, sino que desde el punto de vista toxicológico corresponde al espacio exterior.

Solamente unos pocos xenobióticos que llegan por la vía oral son agentes irritantes primarios, o cáusticos, que por ser tóxicos de acción local dan lugar a daños a nivel mucosal: ácidos, álcalis, fenoles, etc. Sin embargo, la mayoría de los tóxicos ingeridos por vía oral son absorbidos en el tracto gastrointestinal y provocan en el organismo efectos sistémicos.

La penetración de un xenobiótico a través del aparato digestivo tiene lugar fundamentalmente por difusión pasiva. Bajo las condiciones ordinarias, la absorción por boca y esófago suele ser poco significativa; sin embargo, va a ser en estómago e intestino donde adquiera su importancia, debido a los especiales valores de sus pH que van a ser los determinantes del grado de disociación molecular exhibidos por los compuestos iónicos débiles.

Por consiguiente, el proceso se desarrollará a velocidad diferente según se trate de ácidos débiles o de bases débiles:

- Para los ácidos débiles rige la fórmula

$$pK_a - pH = \log \frac{[\text{no ionizada}]}{[\text{ionizada}]}$$

En estos casos, la acidez estomacal ($pH = 2$) favorece las formas *no ionizadas* de los ácidos débiles y, por tanto, estas estructuras se difundirán (y absorberán) con mayor facilidad en el estómago, no así en el intestino donde la escasa acidez de su pH facilita la ionización de las moléculas.

- Para las bases débiles rige la fórmula

$$pK_a - pH = \log \frac{[\text{ionizada}]}{[\text{no ionizada}]}$$

En este caso, el pH básico del intestino delgado (pH = 6) da lugar a que las bases débiles apenas se disocien y, por tanto, tengan una mejor difusión (y absorción) en esta zona digestiva, al contrario de lo que ocurría con los ácidos débiles.

De gran importancia es la estabilidad de la estructura del xenobiótico frente a los diversos factores que pueden incidir sobre ella en el tracto gastrointestinal y modificar la magnitud de su absorción intestinal:

- La actividad de las enzimas digestivas sobre sus moléculas puede dar lugar a nuevos tipos de estructuras, con mayor o menor capacidad de ser absorbidas y una toxicidad potencial diferente.
- La interacción con los alimentos ingeridos puede afectar a los niveles de absorción.
- La actividad de las bacterias intestinales capaces de utilizar el xenobiótico como sustrato para su metabolismo específico.

Los procesos involucrados en la fase toxicocinética

Se entiende como *fase toxicocinética* al conjunto de procesos que dentro del organismo vivo determina la cantidad de tóxico que será capaz de tomar contacto con el sistema biológico específico con el que reacciona.

Se trata de una fase intermedia, pero importante, en el mecanismo global del fenómeno tóxico, que está integrada por una serie de procesos de índole muy diversa, cada uno de los cuales puede actuar como un factor determinante, o regulador, de la concentración que el tóxico puede alcanzar en el receptor y conseguir el nivel adecuado para provocar el daño tóxico; es decir, son responsables de que el tóxico se encuentre en las condiciones idóneas para poder actuar como tal. En consecuencia, los procesos implicados en esta fase toxicocinética determinan lo que se suele conocer bajo el nombre de *disponibilidad biológica* del tóxico.

Cuatro son los distintos procesos involucrados en esta fase del mecanismo tóxico: la distribución, la biotransformación, la fijación y la eliminación o excreción del tóxico. Cada uno de ellos son susceptibles de ser estudiados mediante tratamientos cinéticos, que implican una evaluación matemática con relación al tiempo de actuación del tóxico.

La toxicocinética clásica, muy vinculada al estudio de los medicamentos, ha establecido unos modelos relativamente sencillos y susceptibles de ser interpre-

tados con la ayuda de conceptos matemáticos. En estos modelos se postula una división del organismo en *compartimentos*, aunque en la práctica no tengan una correspondencia exacta con la realidad anatómica y fisiológica.

Cuando un determinado xenobiótico difunde de *modo homogéneo e instantáneo* hacia toda la masa corporal, lo que equivale a no presentar una afinidad específica por algún tejido u órgano que le retenga, se estima que el organismo funciona como un *único compartimento*. En este caso se tiene lo que se ha denominado *modelo monocompartimental*.

Por el contrario, cuando el xenobiótico se distribuye de *modo heterogéneo y lento*, lo que puede ser motivo a que se concentre más en unos tejidos que en otros, se habla entonces de *modelos bi y multicompartimentales*.

De modo general puede afirmarse que todos aquellos órganos, tejidos y fluidos del organismo que tienen una cinética semejante forman parte del mismo compartimento, denominado en este caso *compartimento central*, mientras que aquel órgano o tejido que con una cinética diferente lo retiene y concentra se le considera *compartimento periférico*.

Desde el punto de vista teórico, el número de compartimentos posibles puede ser bastante amplio, aunque son las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico y las características del riego sanguíneo los factores que van a marcar la pauta para que un órgano, tejido o fluido sea considerado como tal.

En la actualidad se han desarrollado otros modelos basados en la fisiología del organismo, que permiten obtener ecuaciones específicas para cada órgano o tejido. Teóricamente, tales modelos permiten predecir con exactitud las concentraciones tisulares de un xenobiótico, siempre que se disponga de los suficientes datos fisiológicos y bioquímicos. Por desgracia, esto no suele ser posible en la mayoría de los casos que se presentan bajo estudio.

La distribución del tóxico

Una vez que el xenobiótico ha conseguido llegar a la sangre, puede decirse que se encuentra en condiciones para que tenga lugar su *distribución*, o translocación, por todo el cuerpo. Sin embargo, solamente una fracción de la cantidad de agente tóxico que penetra en el organismo vivo por cualquiera de las vías consideradas, va a tener la posibilidad de alcanzar su lugar de acción: el tejido considerado como órgano diana, en aquellos puntos de asociación con las moléculas de los sistemas biológicos, denominadas receptores.

La distribución del tóxico es un proceso dependiente de la capacidad que tenga su estructura química de pasar a través de las membranas celulares y, también, de su afinidad por los diversos componentes celulares. Es decir, las posibilidades de su distribución van a depender de sus propiedades fisicoquímicas. Cuando no pueden superar las barreras biológicas la distribución estará restringida; cuando tenga cierta capacidad de enlace o sea muy soluble en los tejidos grasos, quedará retenido en algunas partes del cuerpo. A su vez, en su caminar

por el organismo, la molécula se ha de enfrentar con procesos de metabolización, que pueden transformarla en otras estructuras químicas.

Normalmente, la velocidad de distribución hacia los diferentes tejidos viene determinada por el flujo sanguíneo a través de los mismos y por la facilidad con que cada sustancia es capaz de cruzar el lecho capilar y penetrar en las células de cada tejido en particular. Cuando el xenobiótico es hidrófilo, como ocurre con los ácidos y bases fuertes o los polialcoholes, se concentrará casi exclusivamente en la zona acuosa; cuando presenta un carácter intermedio, como las sustancias tensoactivas, la distribución vendrá dada por su coeficiente de reparto entre la fase acuosa y la lipídica. De hecho, el agua desempeña un importante papel dentro de sus tres posibilidades de presencia: *a)* en el plasma sanguíneo; *b)* en los espacios intersticiales; *c)* en el interior de las células.

La distribución de xenobiótico entre estos tres compartimentos acuosos no tiene lugar de modo proporcional sino que depende de sus propiedades moleculares, por lo que unas estructuras químicas pueden presentar una distribución más restringida que otras. Esta distribución del xenobiótico por todo el organismo resulta un proceso muy complejo, de tal modo que no es fácil determinar la posible concentración en cada compartimento corporal.

En algunos casos, el agente tóxico origina el daño en la propia sangre que circula, como ocurre por ejemplo con la molécula de arsenamina (AsH_3), que puede provocar la hemólisis de los eritrocitos sanguíneos. Sin embargo, lo normal es que sea transportado por el sistema circulatorio hasta los diversos órganos y tejidos donde tal vez desarrolle su actividad tóxica. Así, cabe citar los efectos nocivos que el mercurio o el plomo producen sobre el sistema nervioso central; los del tetracloruro de carbono sobre el tejido hepático; etc.

En definitiva, el proceso distribuidor del xenobiótico va a depender, en gran parte, de dos factores:

- a)* De su capacidad de atravesar las membranas celulares.
- b)* De su afinidad por los diversos tejidos.

En general, los xenobióticos son transportados dentro de la corriente circulatoria enlazados a otras estructuras, sobre todo a las proteínas plasmáticas, de la misma manera que lo hacen los componentes fisiológicos normales. De este modo, sustancias poco solubles en agua pueden ser fácilmente distribuidas a través de la circulación sanguínea. En este aspecto, la albúmina representa un papel preponderante al servir de transporte y depósito de numerosísimos compuestos, tanto endógenos como exógenos. Al igual que otras moléculas endógenas, con la albúmina sérica se enlazan la mayoría de las sustancias xenobióticas: Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , ácido ascórbico, ácidos grasos, ácido úrico, bilirrubina, digtónina, cloranfenicol, salicilato, penicilina, histamina, tiroxina, etc. Otras proteínas plasmáticas también desempeñan papeles significativos: una beta-1-globulina (la transferrina) resulta esencial para el transporte del hierro; una alfa-2-globulina (la céruloplasmina) enlaza a la mayor parte del cobre sérico; las alfa y beta lipoproteínas transportan las sustancias liposolubles, como el coleste-

rol, las hormonas esteroideas y vitaminas. En cambio, las gammaglobulinas son anticuerpos que solo reaccionan con antígenos específicos.

Estas asociaciones con las proteínas plasmáticas suelen tener lugar a través de diversos tipos de enlaces débiles: iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Es decir, se trata de uniones no covalentes y por tanto reversibles. A causa de su elevado peso molecular, el conjunto tóxico-proteína queda confinado en el espacio vascular al no poder cruzar las paredes capilares. Por ello, en principio no se encuentra disponible para ser transferido al espacio extracelular, ni para la filtración a través de los túbulos renales. No obstante, como esta asociación proteica tiene un carácter reversible, permite una lenta disociación a medida que la estructura no enlazada difunde por la red capilar.

Además, la competitividad con otras estructuras puede dar lugar a un desplazamiento del xenobiótico de su enlace y provocar, en su caso, una toxicidad inducida por una segunda sustancia química. Un ejemplo ya clásico se tiene en la mortalidad que provoca el tratamiento con sulfonamidas en niños prematuros: su mayor afinidad de enlace por la albúmina sérica, origina un desplazamiento de la bilirrubina, que en su forma libre difunde al cerebro del recién nacido, que tiene poco desarrolladas sus barreras protectoras, provocando el daño correspondiente.

Precisamente, el organismo humano tiene dos zonas diseñadas de modo muy especial para dificultar el paso de xenobióticos:

- a) El cerebro, protegido por la barrera hematoencefálica.
- b) El feto, protegido por la placenta.

El cerebro dispone de membranas caracterizadas por su escasa permeabilidad, por lo que son muchos los tóxicos incapaces de penetrar dentro del mismo en cantidades apreciables; no obstante, la eficacia de esta barrera no es total y varía de una zona cerebral a otra. Varias razones anatómicas y fisiológicas justifican esta capacidad protectora:

- Las células endoteliales de los capilares del SNC están situadas muy juntas.
- Los capilares del SNC están rodeados por células de la glía.
- Los niveles proteicos del fluido intersticial del SNC son bastante más reducidos que en cualquier otra parte.

En general, la penetración de cualquier sustancia tóxica en el cerebro se rige por los mismos principios que regula la transferencia a través de otras células corporales: solamente pueden penetrar en el mismo las formas estructurales libres y nunca las enlazadas a las proteínas plasmáticas.

También en este caso la liposolubilidad juega un papel importante para la velocidad de penetración de una sustancia en el SNC. Esta circunstancia justifica que algunos compuestos sean más tóxicos en el recién nacido que en los adultos, porque en el momento del nacimiento la barrera hematoencefálica no se encuentra todavía completamente desarrollada.

La placenta es una barrera mucho menos selectiva y ofrece menos dificultad para el paso de muchos xenobióticos. Desde el punto de vista histológico, los mamíferos difieren en el número de capas celulares que separan la sangre materna de la fetal. Al funcionar como un órgano intermediario entre la madre y el feto, la placenta está preparada para un intercambio de compuestos entre ambas partes: la madre suministra oxígeno y sustancias nutrientes, mientras que el feto cede sus residuos metabólicos, como pueden ser urea, ácido úrico y creatinina.

El paso de sustancias a uno y otro lado de la barrera placentaria puede tener lugar por cualquiera de los tres mecanismos conocidos: difusión pasiva, difusión facilitada o transporte activo. Sin embargo, la mayoría de los xenobióticos la atraviesan por difusión simple, con la excepción de aquellos con estructuras químicas semejantes a las de las purinas y pirimidinas endógenas.

Normalmente, el paso de xenobiótico a través de la placenta suele ser una consecuencia de la exposición de la madre a los efectos de un agente tóxico durante el embarazo; sin embargo, no se puede descartar el hecho de una posible redistribución de sustancias, que estaban almacenadas en algún tejido materno y han quedado liberadas durante esta etapa de gestación.

La fijación o retención del tóxico

A menudo, los xenobióticos que circulan por el torrente circulatorio y se distribuyen por todo el organismo, pueden acumularse, y por tanto concentrarse, en algunos tejidos y órganos específicos como resultado de las causas más diversas: afinidad por una estructura determinada, solubilidad en una fase concreta, transporte activo, etc. Unos tóxicos pueden alcanzar su máxima concentración en aquellos puntos corporales donde provocan sus efectos nocivos, como es el caso del monóxido de carbono (CO), que tiene gran afinidad por la hemoglobina de la sangre. Otros, se concentran en lugares muy diferentes a los puntos donde ejercen su actividad tóxica, como ocurre con el plomo, que se acumula en el tejido óseo, aunque suele dañar a los tejidos blandos.

Como el tóxico fijado, o retenido, en un determinado tejido se encuentra siempre en equilibrio con su forma libre, quiere decir que el fenómeno de la fijación o retención, puede ser considerado como un mecanismo protector cuando permite mantener la concentración del tóxico a nivel del receptor por debajo de la dosis tóxica. En tales casos, mientras permanezca vinculado a su depósito de retención, el xenobiótico puede considerarse como una sustancia *toxicológicamente inactiva*.

Dentro de los distintos sistemas biológicos del organismo humano, el hígado y el riñón son dos órganos que presentan una elevada capacidad de enlazar estructuras xenobióticas y, sin duda, pueden ser considerados como los órganos que concentran más tóxicos de todos los del cuerpo. No se conoce con precisión cual pueda ser el mecanismo empleado para captar algunas estructuras de la cir-

culación sanguínea, pero sí se sabe que una veces están implicados procesos de transporte activo, mientras que en otras ocasiones son procesos de enlace a componentes tisulares. En este sentido, pueden desempeñar un papel importante ciertos tipos de proteínas enlazantes que se encuentran en hígado y riñón: ligandina o proteína Y, que tiene una alta afinidad por los ácidos orgánicos, las hormonas corticoesteroides y los colorantes azoicos; la metalotioneína, que enlaza los cationes cadmio; la transferrina que se une al hierro; la céruloplasmina que fija el cobre; etc. Por otra parte, la captación hepática de plomo puede ilustrar la rapidez con la que este órgano es capaz de enlazar algunos xenobióticos: treinta minutos después de una sola administración de compuestos de plomo se detecta en el hígado una concentración de este catión cincuenta veces superior a sus niveles en sangre.

Como muchos compuestos orgánicos que nos llegan desde el medio ambiente son altamente lipofílicos, no puede extrañar que con facilidad atraviesen las membranas celulares y se acumulen en las grasas corporales, como suele ocurrir con el DDT o los bifenilos polihalogenados. Estos xenobióticos lipófilos se suelen acumular en el tejido adiposo por simple disolución física en las grasas neutras, o triacilgliceroles, que representan un 50 % del peso corporal de un individuo obeso o un 20 % de una persona magra y atlética. De este modo, los xenobióticos que tienen un elevado coeficiente de reparto quedan retenidos por los depósitos de grasas corporales y actúan como un mecanismo protector del órgano diana frente a la actividad tóxica de esa sustancia.

También el tejido óseo puede servir de reservorio para algunos elementos, como flúor, plomo o estroncio, hasta el punto de llegar a ser el lugar de almacenamiento más importante para algunas estructuras químicas. Así por ejemplo, el 90 % del plomo corporal se encuentra localizado en el esqueleto. Se considera que el fenómeno de captación consiste fundamentalmente en un proceso de actividad superficial, con intercambio de estructura entre la superficie ósea formada por los cristales de hidroxiapatito y el fluido extracelular con el que contacta. Muchos de estos cristales son de dimensiones tan pequeñas que presentan una superficie de contacto muy elevada en proporción a la masa ósea. En virtud de la similitud de tamaño y de carga, los iones flúor pueden ocupar el espacio que corresponde a los aniones OH^- , mientras que el plomo y el estroncio pueden sustituir al catión Ca^{2+} , dentro de las estructuras cristalinas de hidroxiapatito, mediante una reacción de adsorción con intercambio iónico. Por lo general, el plomo no produce daño mientras se encuentra depositado en los huesos; en cambio, el flúor sí puede dar lugar a efectos crónicos (fluorosis esquelética) y la radioactividad del estroncio puede provocar osteosarcomas y otros tumores malignos.

Hay que señalar cómo la captación de un xenobiótico por el tejido óseo no representa un secuestro irreversible, hasta el punto que algún tipo de intercambio iónico podría separarlo del cristal, así como cualquier otra actividad de tipo osteoclástica que sea capaz de disolver los cristales óseos.

La excreción o eliminación del tóxico

Se entiende por *excreción* al conjunto de procesos que en el organismo conducen a la eliminación de la estructura primaria del xenobiótico o de sus metabolitos. El organismo humano puede recibir una serie de sustancias químicas ajenas al mismo, que somete a la actividad de sus sistemas enzimáticos y sus mecanismos fisicoquímicos con el fin de facilitar la eliminación de la molécula extraña, porque en caso contrario se acumularía y podría alcanzar niveles tóxicos.

Cuando una sustancia extraña penetra en el organismo pueden ocurrir tres posibilidades:

- Que corresponda a una molécula hidrosoluble y, por tanto, pueda ser eliminada directamente a través de alguna de las vías excretoras conocidas, sin necesidad de modificación alguna.
- Que su molécula se vea sometida a la actividad de alguna vía metabólica, de tal modo que pueda sufrir una transformación estructural con incremento de su hidrosolubilidad, por lo que podrá ser excretada principalmente por la vía renal.
- Que su estructura molecular sea retenida o fijada por algún tejido.

Es decir, una vez que un organismo detecta en su interior la presencia de un xenobiótico pone en juego los diversos mecanismos disponibles para conseguir su eliminación por la vía que sea más congruente con sus propiedades químicas.

Por tanto, no resulta extraño que la excreción de tales sustancias tenga lugar por las rutas más diversas, hasta el punto que cualquier tipo de excreción corporal tiene la posibilidad de servir de medio para ello: orina, bilis, pulmones, jugo gástrico, leche, saliva, sudor, etc., con gran preferencia por la primera.

Hay que tener en cuenta que cualquier dificultad en la eliminación de un tóxico incrementa el tiempo de permanencia en el organismo y, en consecuencia, el riesgo de producir daño. Además, facilitará la retención de esa sustancia en el organismo que, más o menos pronto, alcanzará los niveles de dosis tóxica.

En definitiva, la eficacia de esta etapa toxicocinética puede ser considerada como un factor de gran importancia dentro del fenómeno tóxico, porque de ella depende la vida media de ese compuesto dentro del organismo y la duración de su actividad tóxica. Cuando las sustancias, como los bifenilos policlorados (PCB), son muy liposolubles y escasamente transformables pueden alcanzar una vida media de meses, e incluso de años; con ello se aumenta el riesgo de provocar el daño correspondiente. Además, puede darse el fenómeno de *bioacumulación* por la incorporación de este tipo de sustancias a la cadena alimenticia, lo que hace que se incremente progresivamente la carga corporal en la cadena biológica. Así por ejemplo, ha sido calculado que 0.06 ppm de insecticidas o derivados bifenílicos (PCB) en el plancton puede llegar a 15 ppm en las aves acuáticas que se alimentan de peces.

Excreción urinaria

El riñón resulta ser un órgano muy eficiente para eliminar todas aquellas moléculas de xenobióticos que tengan un carácter hidrosoluble, a través de los mismos mecanismos que usa para los productos finales del metabolismo corporal: filtración glomerular, difusión tubular pasiva y secreción tubular activa.

Se calcula que los glomérulos filtran un 20 % de la sangre circulante a través de poros cuyo tamaño sólo permite el paso de las moléculas de peso molecular inferior a 60.000 Dalton. La velocidad de filtración está regulada por la intensidad de enlace entre el xenobiótico y las proteínas plasmáticas, puesto que sólo podrá ser filtrado una vez que se ha disociado el complejo molecular.

Conseguida su filtración, la molécula xenobiótica tiene dos opciones de acuerdo con el carácter de su solubilidad: las hidrosolubles permanecen dentro del lumen tubular y son excretadas con la orina, mientras que las liposolubles se reabsorben a través de las células tubulares de las nefronas y pasan de nuevo a la circulación sanguínea.

En la práctica, el organismo consigue la eliminación del xenobiótico cuando sus metabolitos resultan ser más polares (más hidrosolubles) que la estructura inicial. Por desgracia, no siempre ocurre así, como es el caso de las sulfonamidas que, al ser acetiladas *in vivo*, se transforman en sustancias menos solubles y precipitan en el riñón donde provocan un daño.

Así mismo, el pH de la orina puede influir al favorecer o impedir la eliminación del xenobiótico, cuando se trata de ácidos o bases orgánicas débiles, por ser un factor determinante del grado de ionización de la molécula. Al ser más hidrosolubles las formas ionizadas, los primeros se eliminan con mayor facilidad en orinas alcalinas y los segundos en orinas ácidas.

También los xenobióticos pueden ser excretados por la orina mediante una difusión pasiva a través de los túbulos renales, pero es posible que este mecanismo sea poco relevante. Debido a que las orinas son normalmente ácidas, solo se excretarán por este modo las bases orgánicas, pues los compuestos ácidos débiles serán reabsorbidos en los túbulos renales y su excreción urinaria será bastante lenta y escasa.

Los túbulos proximales disponen de dos sistemas de transporte activo: uno para los aniones orgánicos como las penicilinas, el ácido acetilsalicílico y los compuestos conjugados con glicina o con ácido glucurónico; otro para las bases orgánicas como la morfina o la histamina.

La evaluación de metabolitos en la orina se considera un dato enormemente útil para determinar el nivel de exposición a que están sometidos las personas en su medio laboral, así como para poder efectuar un diagnóstico de las intoxicaciones.

Excreción biliar

La situación anatómica del hígado le coloca en una posición muy ventajosa para eliminar xenobióticos que, absorbidos en el tracto gastrointestinal, le llegan

por la circulación portal antes de alcanzar la circulación sistémica general. Por ello, está en condiciones de actuar sobre muchos de estos compuestos e impedir que sean distribuidos a otras partes del organismo. Aparte de su papel metabólico, el hígado también desempeña una importante función en el proceso de eliminar a través de la bilis diversas moléculas primarias de xenobióticos, o bien algunos de sus metabolitos, bajo la forma de complejos conjugados, sin necesidad de que pasen a la corriente sanguínea para que puedan ser excretados por la vía renal.

Se ignora el fundamento determinante de la preferencia para que una estructura química sea eliminada por la bilis, aunque se conocen algunos factores que influyen en ello: peso molecular superior a 300 Dalton y la ionización molecular. También se sabe que la posibilidad que tiene una sustancia de ser excretada por la bilis varía mucho con la especie animal, por lo que resulta bastante problemático extrapolar al ser humano las informaciones obtenidas con animales de laboratorio. Buenos excretores biliares han resultado ser las ratas y los ratones.

A menudo, los compuestos excretados por la bilis se dividen en tres clases, en función de los valores que alcanza la relación entre sus concentraciones en bilis frente al plasma sanguíneo, $[\text{bilis}]/[\text{plasma}]$:

- Clase A ($= 1,0$): mercurio, talio, cesio, cobalto, etc.
- Clase B ($> 1,0$): plomo, arsénico, manganeso, etc.
- Clase C ($< 1,0$): zinc, hierro, cromo, etc.

No se conoce con certeza cuál es el mecanismo por el que un xenobiótico es transportado del plasma al hígado y de éste a la bilis, aunque se piensa que los que pertenecen a la clase B lo hacen a uno y otro lado de los hepatocitos mediante transporte activo.

Las sustancias excretadas por la bilis, generalmente polares, vuelven al intestino delgado para ser arrastradas con las heces. Sin embargo, puede ocurrir que en determinadas ocasiones las enzimas hidrolasas, producidas por las bacterias intestinales, hidrolicen los compuestos conjugados y le devuelvan su carácter lipofílico primario. En estos casos, se favorece que las moléculas sean reabsorbidas por la mucosa intestinal, dando lugar a que se forme un *ciclo enterohepático*, que prolonga su permanencia en el organismo.

El mecanismo excretor hepático se puede promover administrando sustancias inductoras de enzimas microsomales. Por otra parte, se ha comprobado que la toxicidad intestinal de compuestos como la indometacina, está directamente relacionada con su excreción biliar, mientras que en el caso de los glucósidos cardíacos, dicha toxicidad puede ser reducida, o evitada, aumentando la excreción biliar. Al igual que ocurría con el riñón, el recién nacido no tiene todavía bien desarrollado su sistema excretor hepático y, por ello, algunos compuestos resultan más tóxicos en el neonato que en el adulto.

Cualquier injuria hepática por enfermedad, o por agresión química, puede provocar un desequilibrio en la excreción biliar de un xenobiótico y dar lugar a un incremento de su vida media biológica, con el consiguiente riesgo de actividad tóxica.

Excreción pulmonar

Por la vía pulmonar se pueden eliminar aquellas sustancias que a la temperatura corporal se encuentran predominantemente en fase gaseosa, o son líquidos volátiles en equilibrio con su fase de vapor. Se ha comprobado que la cantidad de sustancia volátil excretada por los pulmones está relacionada con su presión de vapor, principio que tiene una aplicación práctica en el método para determinar el grado de alcoholemia en las personas. Incluso los líquidos altamente volátiles, como es el éter etílico, se excretan de modo prácticamente exclusivo por los pulmones.

No ha sido descrito ningún sistema de transporte especializado para la excreción de xenobióticos por esta vía pulmonar y, por lo general, se admite que lo hacen por simple difusión. La velocidad de eliminación resulta ser inversamente proporcional a la velocidad de absorción y depende de la solubilidad en sangre. Así, las sustancias volátiles con una solubilidad en sangre reducida se eliminan por los pulmones con cierta rapidez, como ocurre con el etileno, mientras que el cloroformo lo hace con gran lentitud debido a su elevada solubilidad. Posiblemente, esta circunstancia influya en la acumulación de este tipo de sustancias en el tejido adiposo.

Glándulas mamarias

Muchos xenobióticos pueden ser excretados con la leche producida en las glándulas mamarias y alcanzar en ella concentraciones más elevadas que en el plasma sanguíneo. Desde un punto de vista toxicológico, representa una vía de excreción muy importante, porque una sustancia tóxica puede llegar al niño lactante a través de la leche que le proporciona su madre y también, vehiculado por la leche de rumiantes, ser ingerido por el ser humano.

Este tipo de excreción se lleva a cabo mediante un mecanismo de difusión simple, que depende de varios factores: el pK_a del xenobiótico, su liposolubilidad y su concentración plasmática. Como el pH de la leche (6,5) suele ser más ácido que el del plasma (7,4), con frecuencia puede acumular los compuestos de carácter básico, como la nicotina de las madres fumadoras. Debido al contenido graso de la leche, en ella se pueden acumular bastante compuestos liposolubles, como DDT, dioxinas, bifenilos polihalogenados, etc. También puede contener cationes metálicos semejantes al Ca^{2+} , como Pb^{2+} y Cd^{2+} , y aquellos agentes quelantes que forman complejos con el catión cálcico.

Sudor y saliva

Son dos rutas de menor importancia cuantitativa y su excreción depende de la capacidad de difusión de las formas no ionizadas, siempre más liposolubles. Los tóxicos excretados por el sudor pueden dar lugar al desarrollo de una dermatitis, mientras que los eliminados por la saliva pueden ser incorporados al tracto gastrointestinal y quedar disponibles para su absorción.

Los procesos de biotransformación del tóxico

- Consideraciones generales.
- Reacciones implicadas en la Fase I.
- Reacciones implicadas en la Fase II.
- Factores biológicos y ambientales que influyen en la cinética de la biotransformación.
- Implicaciones derivadas de la biotransformación de un xenobiótico.

Consideraciones generales

El organismo humano recibe a diario, generalmente a través de su alimentación, una serie de sustancias químicas convencionales, algunas necesarias y otras no, a las que implica en sus procesos metabólicos con la ayuda de los diversos sistemas enzimáticos que posee. Esta forma de proceder también la sigue con todas aquellas estructuras extrañas o xenobióticas.

Se entiende como *biotransformación* el «conjunto de procesos que introducen cambios en las estructuras de los xenobióticos, con la finalidad de favorecer su eliminación». No se trata de simples modificaciones espontáneas, sino que responden a reacciones químicas de carácter muy diverso en las que intervienen distintos sistemas enzimáticos. Evidentemente, equivale al concepto de metabolismo del tóxico y se puede usar de modo indistinto uno u otro término.

Representa una parte muy importante dentro del fenómeno tóxico porque suele ser un factor determinante de lo que puede ser el efecto biológico final de un xenobiótico. En la práctica, abundan los ejemplos en los que el daño tóxico no es causado por la estructura primaria del xenobiótico, sino por algunos de sus metabolitos. En consecuencia la sangre circulante puede contener cinco formas químicas diferentes de xenobióticos: compuesto primario libre, compuesto primario enlazado a proteínas, compuesto bajo una forma activa, derivados inacti-

vados del compuesto, derivados bajo la forma adecuada para su excreción. Cuando predominan las dos últimas posibilidades se puede hablar de una desintoxicación, porque los procesos biotransformadores han conducido a formas moleculares aptas para su eliminación. En cambio, si los responsables de la actividad tóxica son los metabolitos hay que hablar de una biotoxicación. Esto se debe a que las reacciones han desarrollado en la estructura del xenobiótico una electrofilia, que le proporciona una gran reactividad frente a los puntos nucleofílicos de compuestos biológicos importantes.

Los sistemas enzimáticos responsables del proceso de biotransformación de los xenobióticos son los convencionales que intervienen en el metabolismo normal del organismo, aunque en las actuaciones sobre los xenobióticos se caracterizan por ser muy flexibles y poco específicos. En este sentido, hay que señalar cómo el cambio químico ocasionado por el organismo sobre la estructura de un xenobiótico puede ser el resultado de la intervención de distintas enzimas, o también una sola enzima puede estar implicada en la transformación de diferentes estructuras xenobióticas. Unas veces, las actividades ofrecidas por tales enzimas pueden corresponder a las propias de la dinámica bioquímica normal del organismo, mientras que en otras ocasiones son inducidas por los efectos de estímulos capaces de incrementar la concentración de la enzima en las correspondientes células.

En general, puede afirmarse que la biotransformación es un proceso que persigue la mejor eliminación del xenobiótico y evitar que pueda alcanzar, por acumulación, los niveles tóxicos correspondientes.

Cuando un xenobiótico penetra en un organismo pueden ocurrir tres posibilidades:

1. Puede ser eliminado directamente, sin que experimente transformación alguna, a través de algunas de las vías excretoras disponibles.
2. Puede sufrir una transformación estructural, que aumente su polaridad y le haga más hidrosoluble, facilitando de este modo su excreción.
3. Puede experimentar algún tipo de cambio estructural que provoque una modificación en su actividad tóxica: en unas ocasiones la reduce (destoxicación), mientras que en otras la incrementa (biotoxicación). En este último caso, la molécula primaria pasa de carecer de toxicidad a convertirse en un genuino agente tóxico.

Aunque el proceso de biotransformación está catalizado por los mismos sistemas enzimáticos que el organismo posee para realizar su metabolismo intermediario, sin embargo las intervenciones de cada uno de ellos va a depender de la estructura química en cuestión.

No cabe duda que los sistemas enzimáticos se encuentran ampliamente distribuidos por todo el organismo, pero es en el hígado donde se suelen localizar a concentraciones especialmente elevadas: el hígado no sólo es el órgano que recibe de entrada a todos los xenobióticos que han sido ingeridos, sino también el centro corporal metabolizador por excelencia.

Si bien se debe considerar al tejido hepático como el principal implicado en la metabolización de los xenobióticos, también estas reacciones enzimáticas pueden tener lugar en otros órganos, aunque con una importancia menor: riñón, pulmón o intestino. Incluso, en algunos casos puede ser relevante el papel desempeñado por la población microbiana del tracto intestinal, al ser responsable de algunos tipos de cambios: actividad de esterasas capaces de hidrolizar a los metabolitos conjugados, excretados por la bilis, o la actividad de las nitrato-reductasas que reducen los nitratos a nitritos. Por el contrario, tejidos como la piel o los músculos, apenas tienen significación.

La localización de estos sistemas enzimáticos suele ser subcelular, es decir, están ubicados en los diferentes compartimentos celulares. Unas enzimas se encuentran asociadas a las estructuras de las membranas y, por tanto, su situación viene a ser el retículo endoplásmico; otras, en cambio, son enzimas solubles y se emplazan en el citosol. Bastante menos importancia tienen aquellas enzimas que están localizadas en otros orgánulos celulares, tales como núcleo, mitocondrias o lisosomas.

Esta situación de los sistemas enzimáticos implicados en la biotransformación de una estructura xenobiótica puede tener importantes implicaciones toxicológicas. Así por ejemplo, el C14C es hepatotóxico porque sus metabolitos activos son producidos por enzimas del tejido hepático. Incluso el lugar que ocupa el sistema enzimático dentro de un órgano puede conducir a una toxicidad que resulta selectiva para unas células de dicho órgano, mientras que para otras no.

Las diversas reacciones que pueden intervenir en el proceso global de la biotransformación se suelen reunir en dos tipos, tal como se indica en la Figura 4.1:

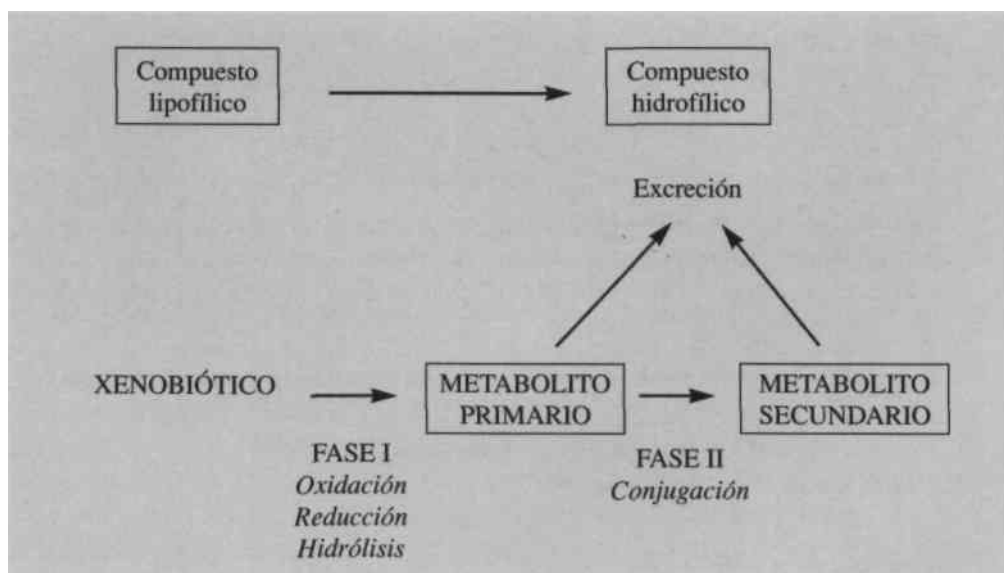


Figura 4.1. *Sinopsis del conjunto de procesos implicados en la biotransformación de un xenobiótico.*

- *Reacciones de Fase I*: representan el primer camino seguido para la metabolización de la mayoría de los xenobióticos. En esencia, se trata de reacciones oxidativas, reductoras o hidrolíticas, que tienen por objeto la adición, o puesta al descubierto, de algún grupo polar en la estructura química primaria.
- *Reacciones de Fase II*: suelen ser reacciones de conjugación, orientadas a incrementar la hidrosolubilidad de aquellas moléculas que ya disponen de grupos polares, con el fin de proporcionarles una mayor facilidad para su excreción.

Por lo general, una reacción de Fase II ha de ir precedida de alguna otra de la Fase I, pero en el caso de que el xenobiótico disponga de una estructura adecuada para la conjugación no hace falta que se produzca la transformación previa. Esto significa que el principal factor que determina el tipo de reacciones que han de intervenir en la metabolización de un xenobiótico es precisamente su estructura química.

Reacciones implicadas en la fase I

El principal objetivo a cubrir por las reacciones de Fase I es dejar al descubierto algún grupo funcional polar en la molécula primaria del xenobiótico, o bien introducirlos en la misma: OH, SH, NH₂ y COOH. Con ello se consigue un ligero incremento de su hidrosolubilidad.

En esencia, pueden intervenir tres tipos diferentes de mecanismos:

- a) Reacciones de *oxidación*, que desembocan en la formación de un grupo polar dentro de la estructura molecular del xenobiótico.
- b) Reacciones de *reducción*, que permiten la formación de funciones aminas o alcoholes.
- c) Reacciones de *hidrólisis*, que conducen a una fragmentación de la estructura química del xenobiótico con formación de nuevas moléculas polares.

Todo ello resulta posible gracias a la intervención de sistemas enzimáticos catalizadores de las diversas reacciones:

- *Oxidativos microsomales*: sistemas monooxigenasas de función mixta y sistemas aminooxidasas.
- *Oxidativos no microsomales*: alcohol-deshidrogenasa, aldehído-deshidrogenasa.
- *Reductores*: nitrorreductasas, azorreductasas.
- *Hidrolíticos*: esterasas, amidasas.

A) Reacciones de oxidación

La mayor parte de las reacciones de oxidación están catalizadas por enzimas microsomales, si bien en algunos pocos casos pueden intervenir enzimas mito-

condriales o citosólicas. De aquí que se distingan dos grandes grupos de oxidaciones:

- Microsomales: hidroxilaciones, epoxidaciones, desalquilaciones, desaminaciones, etc.
- No microsomaes: oxidaciones de aminos, alcoholes y aldehídos.

Oxidaciones microsomaes

Las oxidaciones microsomaes representan una ruta importante para la biotransformación de muchos xenobióticos y en su mayoría están catalizadas por *sistemas mono-oxigenasas* de función mixta, así denominados por su capacidad de adicionar a la molécula del xenobiótico un átomo aportado por una molécula de oxígeno, a la vez que con el otro átomo se forma agua. Están localizados en el retículo endoplásmico liso de las células de muchos mamíferos, y abundan de modo particular en el hígado, con preferencia en su región centrolobular.

Con referencia al ámbito toxicológico, los sistemas oxigenasas de función mixta están integrados por varias proteínas que, bajo la forma de dos sistemas enzimáticos, tienen la capacidad de oxidar a una gran variedad de sustratos xenobióticos: Citocromo P₄₅₀ y monooxigenasas que contienen FAD.

Citocromo P₄₅₀: son unas hemoproteínas cuyos puntos activos son precisamente los átomos de hierro en su forma oxidada (Fe^{3+}) por donde se enlaza al sustrato.

Se conocen diversas isoenzimas, que se suelen agrupar en familias de genes; sus proporciones relativas dependen de algunos factores, tales como la especie animal o las influencias ambientales. Muestran una cierta especificidad de sustrato y sus actividades pueden ser inducidas por la presencia de distintas sustancias.

Se ha identificado un gran número de enzimas citocromo P₄₅₀ de las cuales se han determinado las correspondientes secuencias de aminoácidos. Precisamente su estructura primaria constituye la base para denominar y clasificar las diferentes enzimas, de esta clase, en familias y subfamilias, en función del grado de identidad en su secuencia de aminoácidos. Así, enzimas con una identidad superior al 55 % de sus aminoácidos se consideran pertenecientes a la misma subfamilia; enzimas con una identidad entre el 40-55 % pertenecen a distintas subfamilias dentro de la misma familia; enzimas con una identidad inferior al 40 % pertenecen a distintas familias.

La forma actual de denominación de estas enzimas es por las iniciales CYP seguidas de un número que designa la familia, una letra mayúscula para la subfamilia y un número para la isoenzima. Así, por ejemplo, CYP 1 A1 constituye la nomenclatura abreviada de la isoenzima 1 del citocromo P₄₅₀ de la familia 1, subfamilia A.

En los microsomas hepáticos del hombre existen 4 familias: CYP 1, CYP 2, CYP 3 y CYP 4; las tres primeras familias están implicadas en la transformación de xenobióticos, mientras que la última es una familia cuyos sustratos naturales son ácidos grasos y eicosanoides, pero relativamente pocos xenobióticos.

Tabla 4.1. Principales enzimas P₄₅₀ presentes en los microsomas hepáticos humanos.

Familia	Subfamilia	Isoenzima	Algunos sustratos	Algunos inductores	Algunos inhibidores
CYP1	CYP1A	CYP 1A1 CYP 1A2	Cafeína	Omeprazol	α-Naftoflavona
CYP2	CYP2A CYP2B CYP2C	CYP 2A6 CYP 2B6 CYP 2C8 CYP 2C9* CYP2C19*	Nicotina Ciclofosfamida Taxol Diclofenaco Propranolol	Barbitúricos Rifampin Rifampin	8-Metoxipsoralen Quercetina
	CYP2D CYP2E	CYP 2D6* CYP2E1*	Debrisoquina Acetaminofeno	Etanol	4-Metilpirazol
CYP3	CYP3A	CYP 3A4* CYP 3A5 CYP 3A7	Lansoprazol	Fenobarbita	
CYP4	CYP4A	CYP4A9/11			

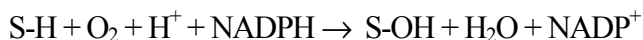
* Metabolizan una gran variedad de medicamentos.

Dentro de cada familia hay una subfamilia, excepto la familia 2 que está constituida por 5 subfamilias (2A, 2B, 2C, 2D y 2E). El número de enzimas dentro de cada subfamilia es variable (Tabla 4.1). En conjunto, en la especie humana hay al menos 15 enzimas citocromo P₄₅₀ distintas que transforman xenobióticos y/o sustratos endógenos.

Desafortunadamente, un sistema de nomenclatura basado en la estructura primaria de las proteínas tiene sus inconvenientes, ya que no proporciona ninguna información acerca de su función, es decir de la reacción que catalizan y, por tanto, no garantiza que proteínas estructuralmente relacionadas realicen la misma función en distintas especies.

Algunas enzimas tienen el mismo nombre en todas las especies de mamíferos; tal es el caso de CYP 1 A1, CYP 1A2 y CYP 2E1. Tanto la función como el sistema de regulación de estas tres enzimas están bastante conservados en todas las especies de mamíferos. En cambio, en otros casos, las relaciones funcionales y evolucionarias entre especies no son tan claras. Así, por ejemplo, en la especie humana CYP 2A6 es el único miembro funcional de la subfamilia 2A mientras que CYP 2A1-2A5 corresponden a proteínas de rata y ratón que fueron secuenciadas anteriormente.

La reacción general que catalizan las enzimas mono-oxigenasas del sistema citocromo P₄₅₀, consiste en la fijación de un átomo de la molécula de O₂ en la estructura del xenobiótico, a la vez que el otro átomo acepta dos hidrógenos para formar agua:



donde «S-H» es el sustrato xenobiótico.

En la reacción también interviene una cadena de oxido-reducción que implica la actividad de otras dos enzimas: *NADPH citocromo- P_{450} reductasa* y *NADH citocromo b_5 reductasa*. La primera es una flavoproteína de la que solo se conoce una forma enzimática, capaz de transferirle, uno a uno, dos electrones a la velocidad de captación que admita el citocromo. Su concentración microsomal viene a ser de diez a treinta veces inferior a la del citocromo P_{450} . La segunda, es una enzima que existe en forma soluble en el citosol de los eritrocitos, en donde recibe el nombre de metahemoglobina reductasa. El ciclo completo de oxido-reducción se presenta en la Figura 4.2.

- **Monooxigenasas que contienen FAD:** estas enzimas, presentes en la fracción microsomal de hígado, riñón y pulmón, son capaces de oxidar los átomos nucleofílicos de N, P y S de una gran variedad de xenobiótico. Al igual que citocromo P_{450} , requieren NADPH y O_2 y catalizan la misma reacción general. Compiten con el sistema anterior en la oxidación de las aminas, a las que convierte en derivados hidroxilaminas, oximas y nitrones (un N-óxido de alquiliden aminoderivados), según sean respectivamente aminas primarias, secundarias o terciarias.

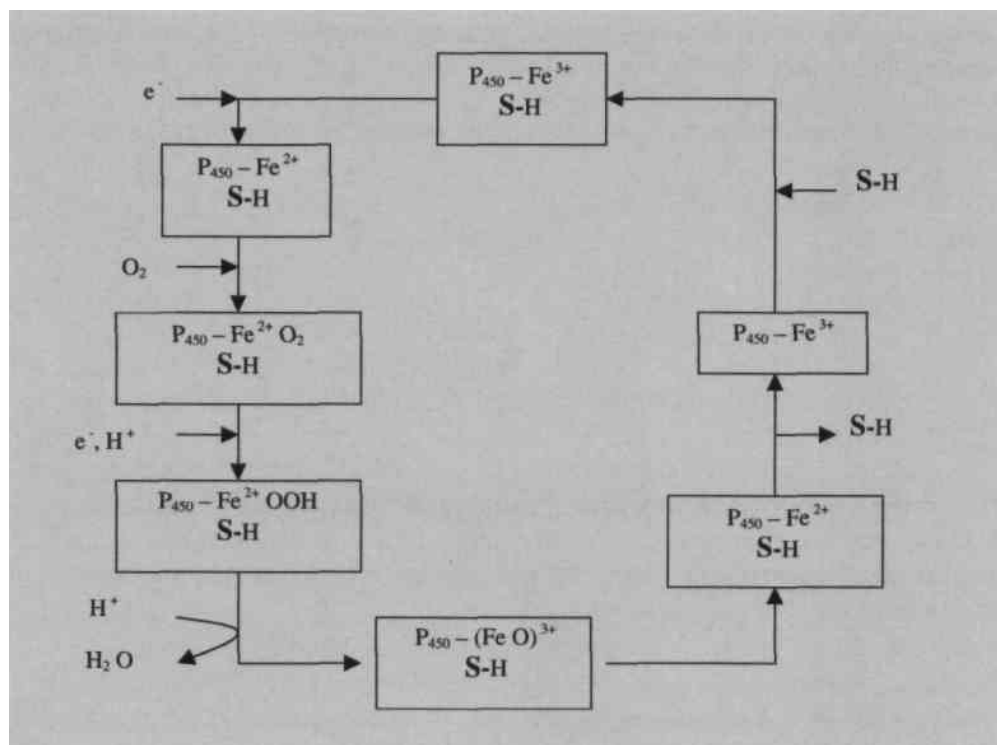


Figura 4.2. Ciclo de oxidación-reducción de un sustrato xenobiótico por la actividad de citocromo P_{450} .

I) Reacciones de oxidación catalizadas por citocromo P₄₅₀:

Hidroxilaciones

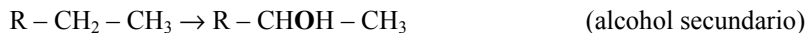
Consiste en la introducción de un OH en la estructura de aquellos xenobióticos que responden a compuestos alifáticos, alicíclicos o aromáticos, con las peculiaridades propias de cada una de estas estructuras orgánicas.

En los *compuestos alifáticos*, la reacción tiene lugar como resultado de la inserción de un átomo de oxígeno en un enlace carbono-hidrógeno. Puede afectar a hidrocarburos, tanto de cadena recta como ramificada, unas veces en el carbono del grupo metilo terminal, otras en el carbono ω₁ (el más próximo al último carbono) [1]:

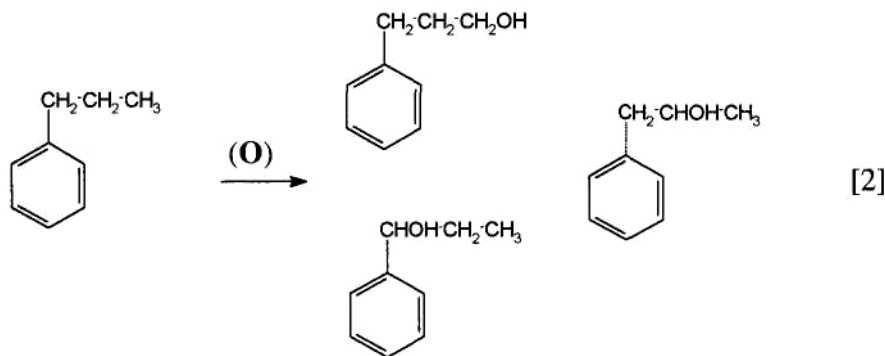
(O)



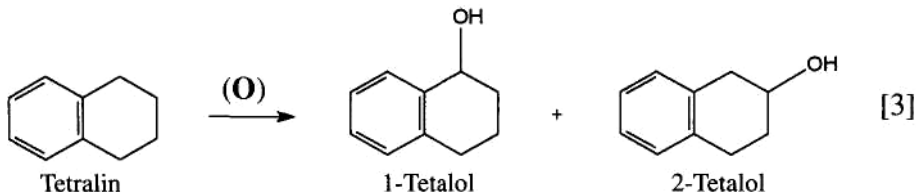
(O)



También puede haber inserción de un OH en la cadena lateral alifática de un compuesto con estructura de anillo aromático. Tal sería el caso del n-propilbenceno, que los conejos metabolizan mediante la formación de un derivado hidroxilado en cualquiera de los tres átomos de carbono de la cadena lateral [2]:



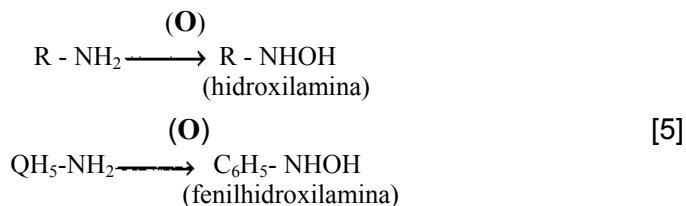
Los *compuestos alicíclicos* que resultan más susceptibles a este tipo de oxidaciones son aquellos que en sus estructuras químicas disponen de dos anillos, uno aromático y otro saturado, como por ejemplo, el 5,6,7,8-tetrahidronaftaleno o tetralin [3]:



Las hidroxilaciones en los *compuestos aromáticos* suelen ser bastante comunes y como ejemplo se puede citar la conversión del benceno a fenol [4]:

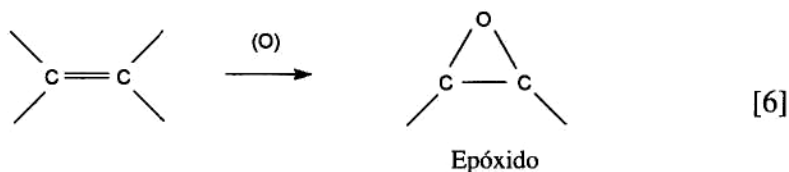


Así mismo, caben hidroxilaciones *en las funciones aminas*, tanto alifáticas como aromáticas [5]:



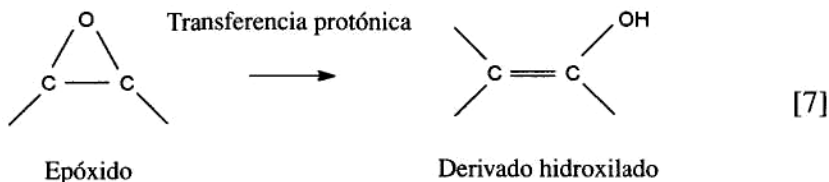
Epoxidaciones

En las estructuras químicas con insaturaciones, tanto alifáticas como aromáticas, el átomo de oxígeno puede insertarse en el doble enlace $\text{C}=\text{C}$ para dar lugar a la estructura conocida con el nombre de epóxido [6]:



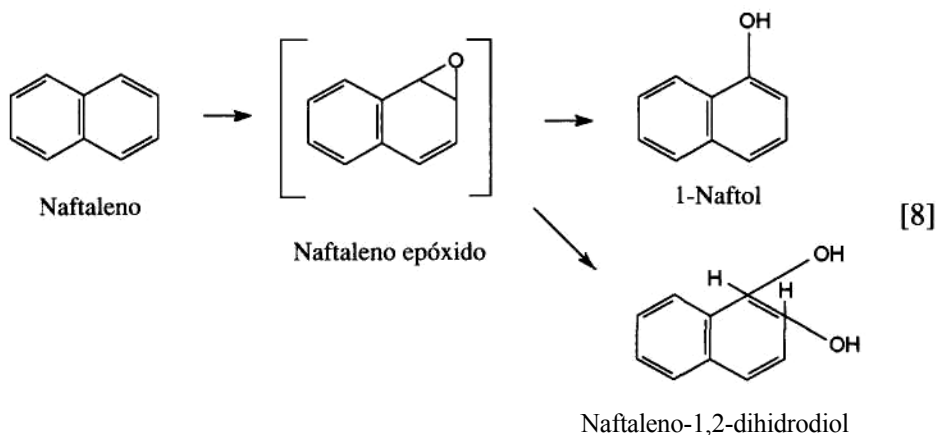
Estos epóxidos pueden evolucionar de tres modos diferentes:

- a) Convirtiéndose en un derivado hidroxilado por transposición no enzimática [7]. Es decir, el epóxido intermediario se redistribuye para formar un compuesto hidroxilado.



- b) Persistiendo el producto intermediario tóxico. Se ha sugerido que estos epóxidos intermediarios tienen una gran importancia en la toxicidad resultante de los compuestos aromáticos, como ocurre en el caso de uno de los primeros ejemplos conocidos: la oxidación del naftaleno. Por transposición no enzimática se convierte, de modo predominante, en 1-naftol; pero si interviene la actividad de la enzima *epóxido-hidrolasa* se forma el

derivado 1,2-dihidrodiol del naftaleno [8]. En la actualidad se admite que estos epóxidos están implicados en los procesos de carcinogénesis provocados por los hidrocarburos policíclicos.

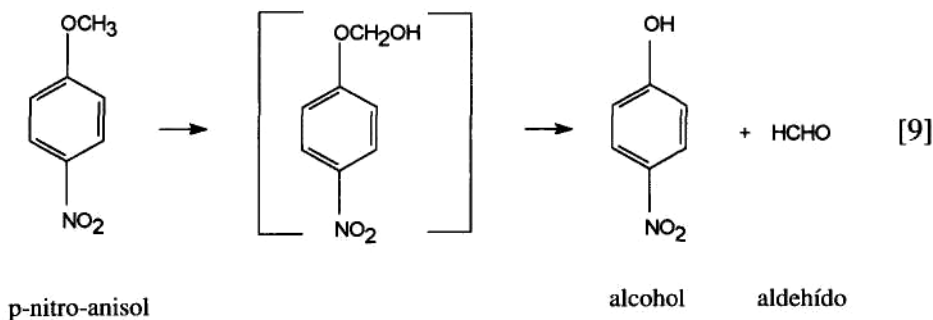


c) Reaccionando el epóxido con la molécula de glutatión, y el derivado se elimina en forma de conjugado con el ácido mercaptúrico.

Reacciones de desalquilación en átomos de O, N y S

El carbono alfa de los grupos alquil que se encuentran ligados a los átomos electronegativos O, N o S, puede ser hidroxilado con cierta facilidad por la inserción de un átomo de oxígeno en su enlace *C-H*. La inestabilidad que la existencia de un átomo electronegativo proporciona a su átomo de carbono adyacente, hace que la estructura resultante de la hidroxilación se descomponga en dos partes: una formada por un aldehído o una cetona, y otra integrada por un metabolito con grupos hidroxilo, amino o sulfhidrilo libres.

Diversos ejemplos pueden citarse relacionados con estructuras que tienen átomos de O electronegativos: las drogas codeína y fenacetina, el insecticida metoxi-cloro, etc. Un caso de reacción menos compleja tiene lugar con el p-nitro-anisol [9].



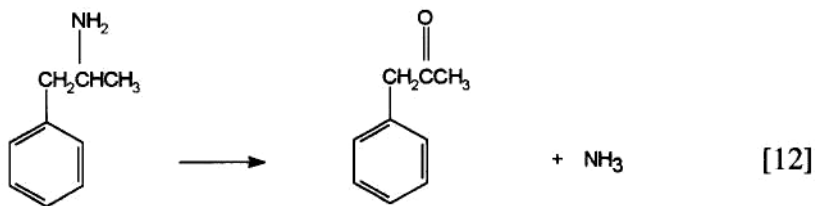
$$\text{p-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OC(=O)-N(CH}_3)_2 \rightarrow \left[\text{p-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OC(=O)-N(CH}_3\text{)(CH}_2\text{OH)} \right] \rightarrow \text{p-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OC(=O)-NHCH}_3 + \text{HCHO} \quad [10]$$

amida aldehído

$$\text{S-CH}_3 \rightarrow \text{SH} + \text{HCHO} \quad [11]$$

6-metil-tiopurina

Suele tener lugar en aquellos xenobióticos con estructuras químicas que disponen de una parte aromática con un grupo amino primario. El carbono alfa adyacente a la amina primaria es hidroxilado; después, del intermediario inestable que resulta se sustrae un ión hidruro que forma amoníaco, mientras que se da una transposición en el carbono alfa oxidado para dar lugar a un aldehído o una cetona. Este tipo de reacción tiene lugar en la metabolización de las anfetaminas por el hígado de conejo, aunque no ocurre lo mismo con el perro o la rata, animales que tienden a la hidroxilación directa sobre el anillo aromático [12].

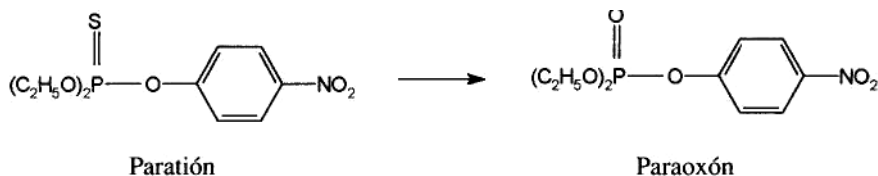


anfetamina

Oxidación del átomo de P

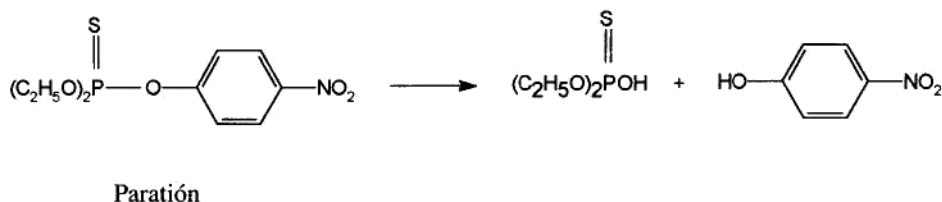
Algunos insecticidas deben su actividad insecticida, o su actividad tóxica sobre los mamíferos, a una reacción de oxidación que transforma el grupo $P=S$ en un grupo $P=O$. Con ella se convierte un compuesto, que en principio es relativamente inactivo frente a las colinesterasas, en otro fuertemente inhibidor de estas enzimas. Así por ejemplo, esta reacción es bien conocida para muchos compuestos órganofosforados y ha sido estudiada con cierta profundidad para el caso del paratión [13]. Este insecticida sufre primero una toxificación (vía a) al ser oxidado a paraoxón, cuya estructura es tóxicamente activa. Sin embargo, mediante una segunda reacción (vía b), este compuesto puede ser destoxificado mediante una hidrólisis.

Vía a) **Toxificación**



[13]

Vía b) **Destoxificación:**



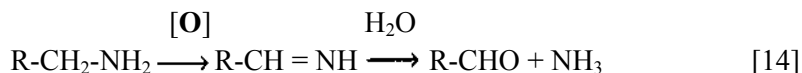
Deshalogenación oxidativa

En los derivados halogenados se puede producir una separación oxidativa del átomo de halógeno (X), pero a través de un mecanismo indirecto. En primer lugar, el oxígeno activado se inserta en un enlace $C-H$ dando lugar a una estructura inestable, que pasa por una fase de redistribución en la que se rompe el enlace $C-X$ y queda intacto el punto de ataque del oxígeno activado. Cuando el carbono contiene un solo átomo de halógeno aparece un aldehído, mientras que si tuviera dos se formaría un haluro ácido; ambos son inestables y pueden reaccionar de modo no enzimático con grupos funcionales situados en macromoléculas biológicas.

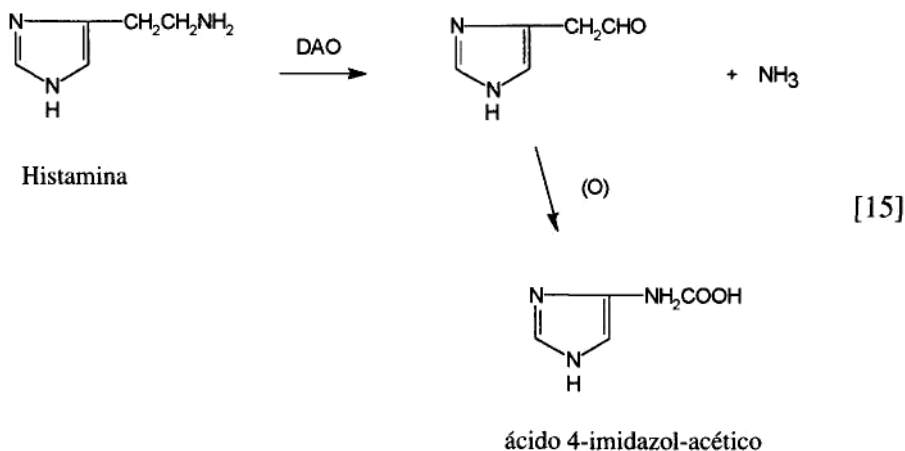
II) Reacciones de oxidación catalizadas por amino-oxidasas

Otras enzimas, las amino-oxidasas, cuya función biológica normal es la de metabolizar las aminas biógenas formadas en los procesos biológicos normales, también pueden actuar sobre las funciones aminas de algunos xenobióticos.

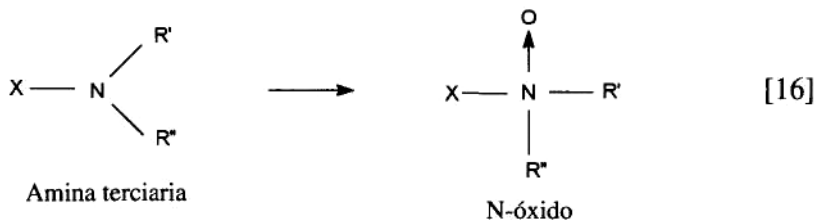
En el caso de las aminas primarias interviene la denominada *mono-amino-oxidasa* (MAO), que es una enzima mitocondrial, y la reacción transcurre a través de una deshidrogenación, con pérdida de amoníaco [14]:



Cuando se trata de estructuras diamino, entra en juego la enzima *di-amino-oxidasa* (DAO), que cataliza de modo selectivo la oxidación de uno sólo de los grupos aminos. Es la vía que el organismo utiliza para metabolizar la histamina [15]:



Las amino-oxidasas pueden catalizar la conversión de las aminas secundarias en oximas y nitrones, mientras que sólo pueden actuar con algunas aminas terciarias para transformarlas en derivados N-óxidos [16]:

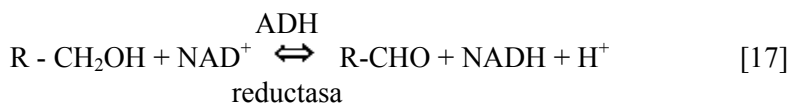


También puede tener un gran interés biológico la oxidación de los átomos nucleofílicos de azufre divalente por parte de estas enzimas amino-oxidasas. Se sabe que, al menos, son capaces de actuar sobre tiocarbamidas y tiourea.

III) Oxidación de alcoholes y aldehídos

Muchos medicamentos y otros xenobióticos presentan grupos funcionales alcoholes o aldehídos, que pueden ser oxidados (o deshidrogenados) por enzimas no microsomales como son, *alcohol-deshidrogenasas* y *aldehído-deshidrogenasas*.

Las *alcohol-deshidrogenasas* (ADH) son una clase de enzimas capaces de catalizar la conversión de funciones alcoholes en funciones aldehídos o cetonas. Se localizan en la fracción soluble de hígado, riñón y pulmón y requieren para su actividad la presencia de NAD^+ , o en su caso NADP^+ , como coenzima. Una característica interesante de esta reacción enzimática es su posible reversibilidad, es decir, el compuesto carbonilo formado puede ser reducido de nuevo hasta alcohol, siempre que intervenga la correspondiente reductasa [17].



Las *aldehído-deshidrogenasas* (ALDH), cuya fuente principal es el hígado, catalizan la oxidación de los aldehídos hasta ácidos carboxílicos, necesitando NAD^+ como cofactor [18]:

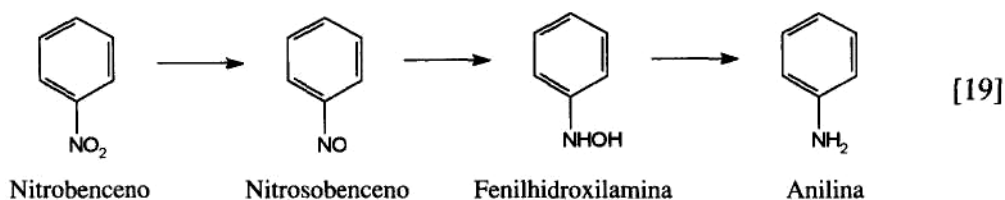


La mayoría de las veces, la actividad de estas enzimas sobre los alcoholes representa un proceso de destoxicación: el etanol por acción de ADH y ALDH se convierte en ácido acético, que es rápidamente metabolizado a dióxido de carbono y agua. Sin embargo, se conocen casos en los que el ácido carboxílico resultante es más tóxico. Se pueden citar dos ejemplos de esta bioactivación muy típicos: las metabolizaciones de metanol y de etilenglicol, que dan lugar respectivamente a la formación de los ácidos fórmico y oxálico.

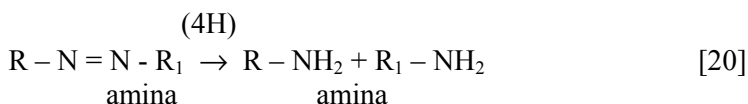
B) Reacciones de reducción

Se trata de reacciones que se desarrollan con mayor facilidad bajo condiciones de tensión baja de oxígeno y en las que los sustratos se reducen porque aceptan electrones. Pueden intervenir una serie de enzimas capaces de reducir a xenobióticos cuyas estructuras contienen grupos nitro o azo, entre otros. A veces se duda si las reacciones son propiamente enzimáticas o se deben a la acción de agentes reductores como NADPH , NADH , FADH , etc.

Los derivados nitro aromáticos pueden ser reducidos con la ayuda catalítica de sistemas enzimáticos *nitrorreductasas*, que son propios de mamíferos, localizadas en hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebro. Para su actividad necesitan condiciones anaeróbicas y la contribución de NADPH y NADH como cofactores. Posiblemente, se siga el camino de formar derivados nitroso e hidroxilamina como pasos intermedios [19].



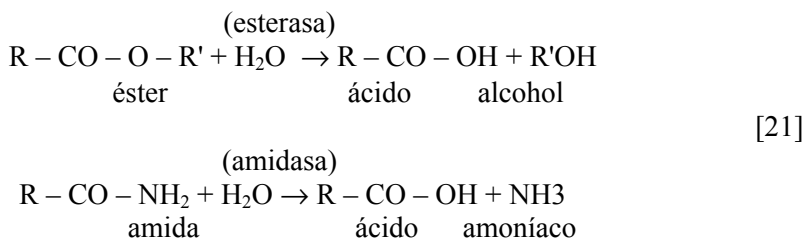
Planteamientos similares se dan para la actividad de los sistemas enzimáticos *azorreductasas*, capaces de metabolizar los colorantes tipo azo, con el resultado de dos estructuras aminas [20]:



C) Reacciones de hidrólisis

Las reacciones hidrolíticas son las únicas de la fase I que no utilizan energía. Una gran cantidad de xenobióticos, que tienen en sus estructuras enlaces tipo éster o amida, son susceptibles de experimentar un proceso hidrolítico. Estas reacciones son catalizadas por numerosas enzimas *esterasas* y *amidases* no específicas, contenidas en las fracciones microsomales y solubles de hígado, mucosa intestinal, músculo, plasma sanguíneo, riñón y tejido nervioso en los mamíferos.

La rotura hidrolítica de los enlaces éster o amida libera grupos carboxílicos, que en el primer caso se acompañan de una función alcohol y, en el segundo, de una amina o amoníaco. De modo general, responden al siguiente esquema [21]:



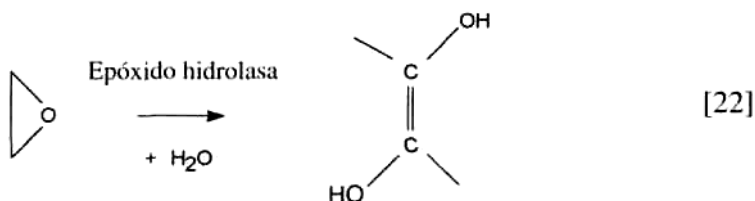
En general, las hidrólisis enzimáticas de amidas transcurren de modo más lento que las de los ésteres, posiblemente debido a la gran especificidad de sustrato que presentan las amidases y, tal vez, a factores electrónicos. En cuanto a las esterases caben distinguir dos tipos, según puedan ser inhibidas por los ésteres órganofosforados (tipo B) o no (tipo A).

Las esterases tipo A incluyen las arilesterasas (ésteres aromáticos de sustratos), mientras que en las tipo B se integran las colinesterasas del plasma (ésteres de colina), las acetilcolinesterasas de eritrocitos y tejido nervioso (ésteres de acetil), las carboxilesterasas (ésteres alifáticos), etc. Las arilesterasas inespecífi-

cas, que hidrolizan esteres aromáticos de cadena corta, son activadas por los iones Ca^{2+} y son responsables de la hidrólisis de ciertos triesteres órganofosforados, como el paraoxon.

Muchos son los xenobióticos que sufren una destoxificación por la acción de las enzimas hidrolasas, tanto en el reino animal como en el vegetal: los esteres de ácido ftálico de sustancias plastificantes; los esteres de los ácidos picolínico y fenoxiacético propios de algunos herbicidas; las estructuras piretroides, o derivados, de insecticidas; etc. Precisamente, la resistencia de ciertas razas de insectos a la acción tóxica del malatión se debe a la actividad de una carboxilesterasa que destoxifica al compuesto.

Mucho interés tienen otras hidrolasas, conocidas como epóxido-hidrolasas, que actúan sobre los anillos epóxidos de ciertos compuestos tipos areno o alqueno, para formar los correspondientes α - β -dihidrodiolos, que han sido mencionados en el apartado de «epoxidación» [22].



Ciertos epóxidos lábiles pueden ser responsables de una actividad carcinogénica, que pierden al ser destoxificados por la acción de las epóxido-hidrolasas o por las glutatión epóxido S-transferasas, cuyos mecanismos de hidratación resultan óptimos en la zona de pH alcalinos. Todos ellos son enzimas localizadas en la fracción microsomal del hígado de mamíferos y otros tejidos.

Reacciones implicadas en la fase II

Las reacciones de la fase II de la biotransformación de un xenobiótico que ha penetrado en el organismo se caracterizan por ser reacciones de *conjugación*, catalizadas por enzimas en su mayor parte citosólicas. Aunque a veces tienen lugar sobre la estructura primaria, sin embargo la mayoría de ellas ocurre sobre los metabolitos formados en las reacciones propias de la fase I, que adicionan grupos polares.

El proceso bioquímico tiene lugar con agentes conjugantes de origen endógeno, mediante enlaces de tipo covalente, que le proporcionan un carácter poco reversible. El producto inicial, o el metabolito, se conjugan con el ácido glucurónico u otro carbohidrato; con el sulfato; con el glutatión; con aminoácidos; o bien sufren reacciones de acetilación o de metilación. Al ser reacciones biosintéticas, necesitan del aporte de energía que puede ser suministrada por la activación de cofactores y, en algunos casos, por el propio sustrato, cuando es convertido en un compuesto intermediario de alta energía.

Puesto que los cofactores son activados con ATP, de un modo directo o indirecto, sus disponibilidades dependerán de manera importante del estado energético del órgano correspondiente. De aquí que, en la práctica, se haya podido establecer una escala de capacidades relativas para las distintas reacciones de conjugación: elevada, para el ácido glucurónico; media, para los aminoácidos; baja, para sulfato y glutatión; variable, para la acetilación.

El objetivo primordial de los procesos implicados en las conjugaciones de la fase II es hacer la molécula xenobiótica más hidrosoluble y, por consiguiente, facilitar su eliminación por algún órgano de excreción. También estos órganos presentan ciertas preferencias por algún tipo de compuesto conjugado: el riñón es la vía preferente de conjugados glucurónidos, glicínicos y sulfatos; la bilis es la vía elegida por los conjugados del glutatión; en cambio, los conjugados acetilados carecen de una ruta preferida. En general, la vía enterohepática es usada con preferencia por los conjugados que presentan una gran masa molecular.

La dependencia del aporte de energía de los distintos tipos de conjugaciones implicadas en la fase II ha dado lugar a una clasificación de las mismas, según que la energía pueda proceder de un agente conjugante activado (tipo 1) o del sustrato activado (tipo 2). Las conjugaciones del tipo 1 incluyen la formación de conjugados glucurónidos, sulfatos, metilados y acetilados. En cambio, a las conjugaciones del tipo 2 corresponden los conjugados aminoacídicos.

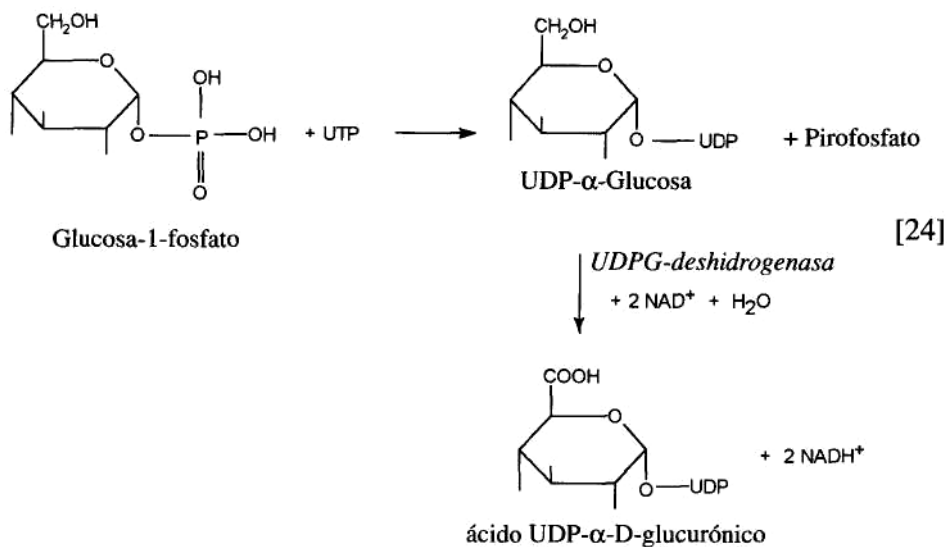
Conjugación con el ácido glucurónico

La glucuronidación representa una de las principales conjugaciones entre las reacciones enzimáticas de la fase II para convertir en compuestos hidrosolubles muchas moléculas endógenas y exógenas, con el fin de facilitar su excreción a través de la orina o de la bilis. Suele tener lugar sobre estructuras que contienen oxígeno, tales como fenoles; ácidos carboxílicos; aquellos alcoholes secundarios y terciarios que resultan poco apropiados para una rápida degradación oxidativa; compuestos aromáticos que tienen nitrógeno bajo las formas de amina o carbamil, tales como anilina y meprobamato; compuestos con azufre, como algunos tioles; etc. En todos los casos aparecen estructuras que son tan solubles en el agua como el mismo ácido glucurónico con el que se conjugan [23].

(alcoholes... R-OH)	→	(O-éteres)	
(ácidos...R-COOH))	→	(O-ésteres)	[23]
(aminas...R-NH ₂))	→	(N-glucurónidos)	
(tioles...R-SH))	→	(S-glucurónidos)	

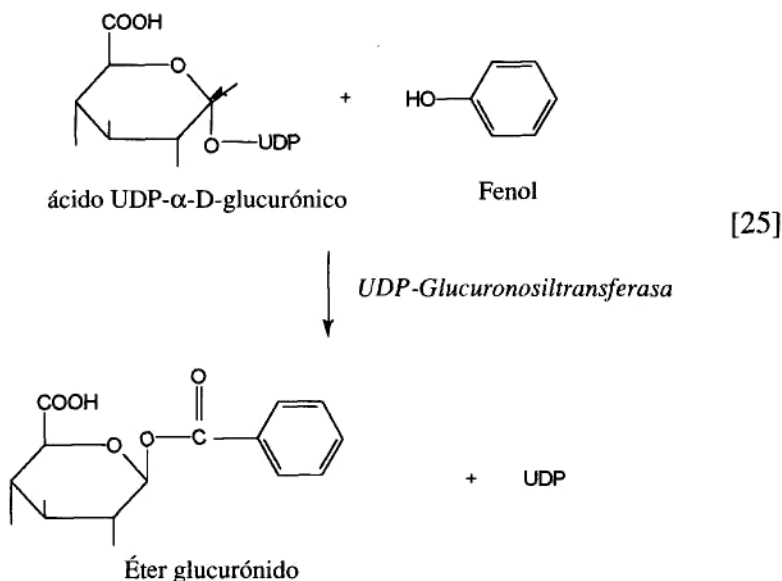
La reacción exige la intervención del ácido uridín difosfato glucurónico (AUDPG), formado a partir de la glucosa-1-fosfato, UTP y NAD [24], que con el grupo funcional del xenobiótico forma el glucuronilconjugado con liberación de UDP. Catalizada por la enzima *UDP-glucuronosiltransferasa*, esta reacción requiere que la molécula de glucurónico cedida sufra una inversión de Walden, es decir, pase de su configuración α a la configuración β .

a) Formación del ácido glucurónico a partir de Glucosa-1-fosfato



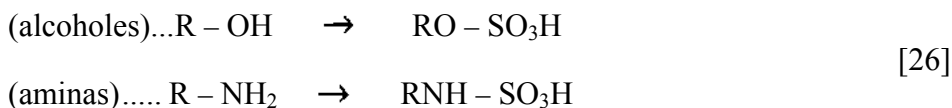
A diferencia de otras enzimas que intervienen en las reacciones de la fase II, su actividad está localizada en el retículo endoplásmico del hígado principalmente, aunque también en riñón, intestino, piel, cerebro y bazo. Se sospecha la existencia de varias formas de esta enzima, aunque se ignora todavía el número de ellas. Entre los ejemplos típicos caben citar: anilina, fenol, p-nitrofenol, ácido benzoico, meprobamato, sulfotiazol, tiofenol, etc. [25]

b) Reacción de conjugación del ácido glucurónico con el fenol



Conjugación con el *anión sulfato*

El proceso de incluir en una molécula el anión sulfato se denomina sulfatación y constituye en los mamíferos una importante reacción de conjugación aplicable a las estructuras con grupos hidroxilos. La reacción de transferir aniones sulfato a los grupos OH de fenoles y alcoholes alifáticos es catalizada por una serie de enzimas solubles, conocidos como *sulfotransferasas*, localizadas de modo primordial en el hígado, aunque también se encuentran en riñones, tracto intestinal y pulmones, para dar lugar a esteres sulfates. En algunas ocasiones, también pueden actuar sobre grupos aminos aromáticos y sobre hidroxilaminas, con la correspondiente formación de sulfamatos y N-O-sulfatos [26].



El agente donador de los grupos sulfatos es el compuesto conocido como 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato, un cofactor que es sintetizado a partir de sulfato inorgánico y ATP [27]. La fuente de radicales sulfatos suele ser la cisterna, a través de una secuencia de reacciones oxidativas y la activación del anión sulfato tiene lugar con la intervención de enzimas *sulfurilasas*. Como la concentración de cisterna libre suele ser limitada, la disponibilidad del cofactor representa un elemento determinante de la dimensión que puede alcanzar esta vía de conjugación.

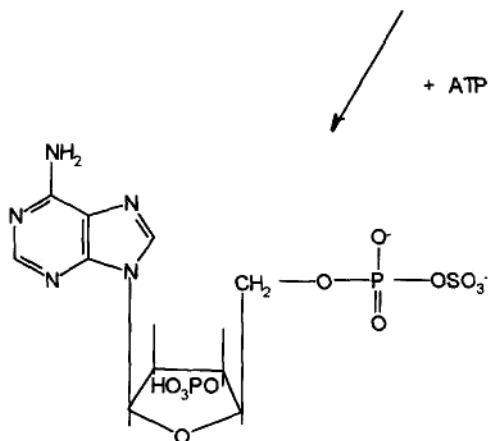
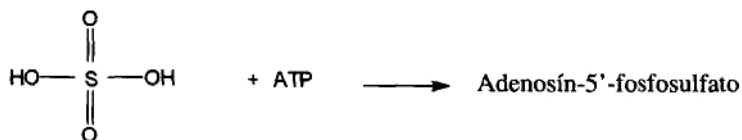
En la práctica representa una excelente vía que tiene el organismo para la destoxificación de algunas estructuras, puesto que la incorporación del radical sulfato hace que la excreción sea más fácil que la del metabolito hidroxilado; de este modo, se reduce la actividad tóxica de muchos compuestos. Es un proceso que suele tener lugar sobre una gran cantidad de compuestos endógenos de bajo peso molecular, como catecolaminas, hidroxi-esteroides, ácidos biliares y etanol [28].

Al contrario del ácido glucurónico, este proceso con aniones sulfatos se caracteriza por poseer un elevado grado de afinidad para los sustratos, pero en cambio su capacidad para formar conjugados es más bien escasa, por lo que esta vía puede quedar agotada enseguida. Esto da lugar a que sea la primera vía a utilizar por el organismo cuando recibe dosis reducidas de compuestos fenólicos, mientras que en el caso contrario de dosis elevadas, el organismo también ha de acudir a su excreción en forma de conjugado glucurónico.

Conjugación con *grupos metilos*

Aunque la metilación represente una reacción bioquímica muy común para la biotransformación de moléculas endógenas, como la histamina, sin embargo

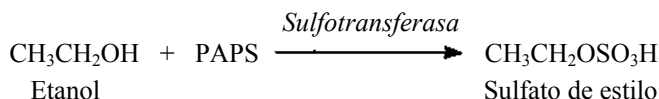
a) Síntesis de fosfoadenosínfosfosulfato (PAPS)



Fosfoadenosínfosfosulfato (PAPS)

[27]

b) Reacción de conjugación



[28]

no significa un camino cuantitativamente importante en la biotransformación de xenobióticos.

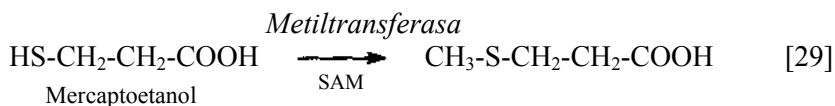
Los grupos funcionales principalmente implicados en este tipo de conjugación son las aminas aromáticas (feniletanolamina), los fenoles (adrenalina, serotonina) y los compuestos tioles (dimercapto-propanol), para formar los correspondientes N-, O- y S- metil conjugados.

Los grupos metilos son transferidos por un cofactor rico en energía, la S-adenosil-metionina (SAM), y son diversas las enzimas *metiltransferasas* que pueden intervenir en la metabolización de los distintos xenobióticos [29].



[29]

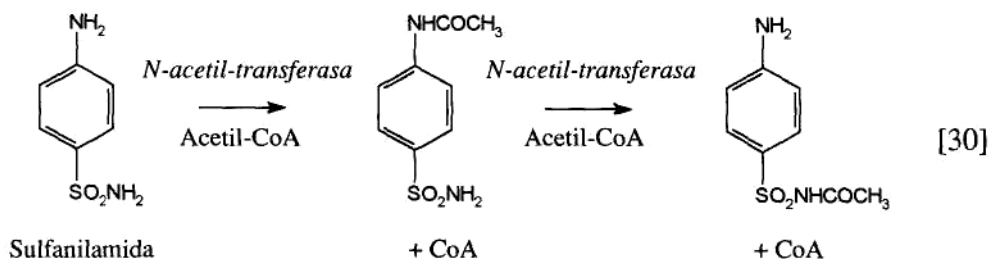
Ac. 3,4,5-trihidroxibenzoico



A diferencia de las otras vías de conjugación se produce un enmascaramiento de los grupos funcionales, con la posible disminución de la hidrosolubilidad.

Conjugación con grupos acetilos

Una importante ruta de biotransformación de las aril aminas en diversas especies es el de la acetilación de la función amina. Muchas aminas xenobióticas (RNH_2) son acetiladas por una serie de *N*-acetiltransferasas, que utilizan como cofactor acetil-coenzima A, para dar lugar a un conjugado aminado (RNHCOCH_3) y liberar coenzima A [30]. Se trata de enzimas citosólicas, que han sido detectadas en las células de varios tejidos: hígado, bazo, mucosa intestinal y pulmón. Los principales sustratos sobre los que actúan son aminas primarias aromáticas, hidrazinas, hidrazidas, sulfonamidas y algunas aminas primarias alifáticas. La capacidad para acetilar xenobióticos se encuentra relacionada con un polimorfismo genético que, unido a factores de desarrollo y diferencias de especies, explican la lentitud del proceso en unos casos y su rapidez en otros. Así por ejemplo, los recién nacidos poseen bajos niveles de estas enzimas, niveles que se incrementan durante el desarrollo del individuo.

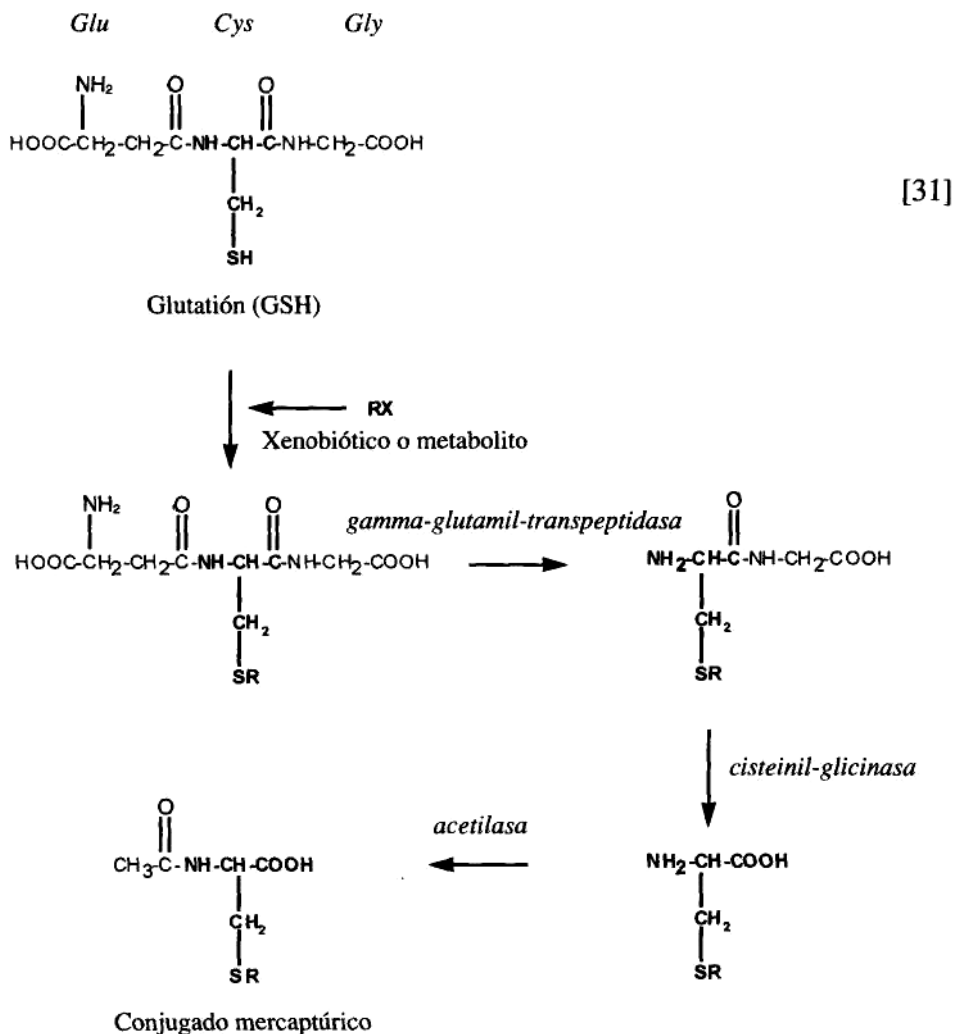


Conjugación con glutatión

El proceso de conjugación más complejo es el que tiene lugar con la molécula del glutatión, la L-glutamil-L-cisteinil-glicina, un tripéptido que porta un grupo tiol y por ello su fórmula abreviada suele ser GSH. Sus conjugados resultan ser aductos formados entre los xenobióticos electrofílicos y su componente L-cisteína, que ha sido acetilado. De este modo, un número importante de xenobióticos, sobre todo compuestos orgánicos halogenados, son metabolizados bajo la forma de mercaptoderivados de la N-acetil-cisteína o ácido mercaptúrico, que se eliminan a través de la excreción biliar [31].

La biosíntesis de estos derivados mercaptúricos es bastante compleja, con diversos pasos catalizados por sus correspondientes sistemas enzimáticos. El proceso global puede ser esquematizado del modo siguiente:

- Conjugación de los xenobióticos portadores de centros electrofílicos con la forma reducida del glutatión (GSH), catalizada por la enzima *glutathione-S-transferasa*.
- Transferencia del grupo glutamato, con la intervención de la enzima *gamma-glutamyl-transpeptidasa*.
- Pérdida de la molécula de glicina, con la participación de la enzima *cisteinyl-glycinase*.
- Acetilación final del componente L-cisteína, con la ayuda de una enzima *acetilasa*.



Aunque la conjugación inicial con el glutatión reducido no necesita de un intermediario rico en energía, sin embargo la acetilación del conjugado con la cisterna sí requiere la intervención del ATP.

Puede decirse que el papel desempeñado por las enzimas glutatión-transferasas al conjugar compuestos electrofílicos tóxicos es el de proteger a relevantes compuestos nucleofílicos endógenos, aunque no siempre resulta así. Como desintoxicante actúa sobre los hidrocarburos monohalogenados, al formar con facilidad un complejo de buena excreción. Sin embargo, a los hidrocarburos dihalogenados, los convierte en compuestos sulfonio, que son genotóxicos. Así mismo, con los epóxidos alifáticos y aromáticos forma un conjugado intermediario, capaz de atacar las zonas nucleofílicas de moléculas biológicas importantes, como ADN y proteínas.

Este proceso de conjugación mercaptúrica puede tener una cierta trascendencia toxicológica al rebajar de modo significativo la concentración de glutatión en el hígado. De este modo provocaría en el organismo una mayor susceptibilidad frente a cualquier efecto tóxico derivado de una exposición adicional a otros xenobióticos.

Conjugación con *aminoácidos*

Los xenobióticos que contienen grupos carboxílicos pueden ser conjugados con una gran variedad de aminoácidos. En este proceso importante para la biotransformación de estas estructuras, se forma un enlace amida (tipo péptido) entre el citado grupo carboxílico y el grupo amino del aminoácido. Aunque lo más frecuente es que intervenga la glicina, también en los seres humanos y en algunos monos puede participar la glutamina, mientras que en aves y reptiles lo hace la ornitina.

La formación del enlace amida tiene lugar a través de dos reacciones copuladas catalizadas por enzimas diferentes. En la primera reacción, se produce una activación del ácido bajo la forma de un derivado tioéster de la coenzima A, con el aporte energético del ATP. Intervienen enzimas dependientes del ATP, que reciben el nombre de *ácido-CoA-ligasas*. En la segunda, tiene lugar una transferencia de la parte acil al grupo amino aceptor, mediada por una *N-acil-transferasa* [32].

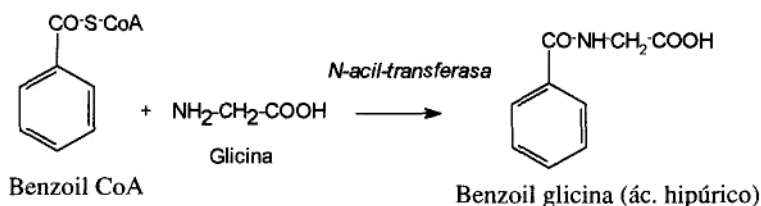
Los conjugados aminoacídicos de los ácidos aromáticos se eliminan de modo primario por la orina y, desde el punto de vista cuantitativo, puede ser considerada como una reacción bastante importante en un gran número de especies animales. Un ejemplo muy característico suele ser el ácido benzoico, que conjugado con la glicina aparece en orina bajo la forma de ácido hipúrico.

En la práctica, puede haber una cierta competencia entre esta vía y la conjugación glucurónica para la excreción de los ácidos carboxílicos. No obstante, el grado de formación para uno u otro tipo de conjugados dependerá tanto

a) Reacción de activación



b) Reacción de conjugación



de la estructura del ácido como de la especie animal. Así por ejemplo, en las ratas y los monos, el conjugado principal para el ácido fenilacético resulta ser el formado con los aminoácidos, mientras que para el ácido difenilacético sólo se forma el conjugado con el glucurónico. Sin embargo, podría ocurrir una saturación en la conjugación con los aminoácidos cuando la cantidad de ácido a conjugar resulta alta; en este caso el organismo acude a otras vías de conjugación.

Factores biológicos y ambientales que influyen en la cinética de la biotransformación

La transformación metabólica de un xenobiótico puede dar lugar a tres situaciones bien distintas con respecto a su posibilidad de provocar un efecto tóxico:

1. la modificación a una estructura fácilmente eliminable;
2. la conversión en una molécula inocua, desde el punto de vista biológico, o al menos con una actividad tóxica más reducida (se trata de un proceso de detoxificación);
3. la formación de metabolitos cuyas estructuras químicas poseen un poder tóxico superior (proceso de biotoxicación o bioactivación).

En definitiva, la biotransformación del tóxico desempeña un papel importante en los resultados relacionados con la acción tóxica de una sustancia química. Nor-

malmente, un xenobiótico se metaboliza a través de posibles vías diferentes y con ello puede ser transformado en distintos tipos de metabolitos. La velocidad a la que se desarrolla cada reacción, así como su importancia relativa, pueden verse afectadas por una gran variedad de factores capaces de alterar el patrón metabólico y modificar la toxicidad propia del xenobiótico. Estos factores suelen ser en su mayor parte biológicos, tanto *genéticos* como vinculados al *estado fisiológico* de cada individuo, a los que pueden sumarse algunos *factores ambientales*.

Genéticos

Puesto que los sistemas enzimáticos implicados en las reacciones de las fases I y II de la biotransformación están regulados genéticamente, cualquier modificación que afecte a los genes de los individuos de una población tiene que repercutir en la actividad tóxica de algunas estructuras químicas concretas. Esto explica los casos de toxicidad específica, observada solamente en algunos individuos, frente a determinados agentes tóxicos.

Como estas formas de toxicidad aparecen de acuerdo con las leyes de la genética, es posible que el propio tratamiento estadístico, aplicado para evaluar los resultados obtenidos, pueda enmascarar la posibilidad de reconocer aquellas desviaciones individuales, que pueden ser debidas a defectos genéticos.

Los efectos de un tóxico que son modulados de modo genético, pueden responder a tres planteamientos diferentes:

- *Acumulación* del tóxico como resultado de una deficiencia genética, o incluso de una ausencia total del sistema enzimático metabólico correspondiente.
- *Prolongación* de la acción del tóxico, como secuela de una deficiencia en el mecanismo de transformación del mismo.
- *Hipersensibilidad* del individuo, que implica la existencia de una enzima defectuosa responsable de un nivel de actividad que equivale a la deficiencia de un sistema enzimático.

Así por ejemplo, se puede citar el caso típico de la hidrazida del ácido nicotínico: en los individuos normales, sufre un proceso de acetilación por la actividad de una enzima, cuya formación está controlada por un gen, que elimina todo tipo de actividad biológica de esa sustancia. En los individuos que carecen de este gen, la hidrazida se va acumulando en la sangre y cuando alcanza elevados niveles de concentración provoca una polineuropatía.

Cuando el organismo con alteración genética responde con menos intensidad a la actividad de un agente tóxico presenta el fenómeno conocido como *tolerancia*. Cambios en la velocidad de metabolización dan lugar a una reducción significativa de la concentración del metabolito tóxico en sangre y, en definitiva, el organismo actúa de una manera más refractaria a la acción del tóxico, o como si hubiera desarrollado una cierta inmunidad.

No obstante, el concepto de tolerancia se suele reservar en Toxicología a los casos en los que la reducción del poder tóxico de un agente determinado aparece como consecuencia de anteriores exposiciones a dosis más elevadas.

La especie

La toxicidad de un agente tóxico está determinada por la especie sobre la que actúa como resultado de peculiaridades relacionadas con los procesos de absorción, distribución, metabolización y excreción. Las variaciones vinculadas a la especie, observadas en la metabolización de un xenobiótico, corresponden a dos tipos de diferencias: *cualitativas* y *cuantitativas*.

Las de carácter cualitativo están relacionadas con las vías metabólicas que actúan sobre el xenobiótico: unas veces aparecen como consecuencia de algún defecto en una actividad enzimática; otras veces son producidas por una reacción enzimática, que es peculiar de esa especie.

Este tipo de diferencias se producen principalmente en las reacciones propias de la fase II y pueden ser debidas a las causas más diversas: capacidad de la especie para sintetizar y/o activar al cofactor necesario; naturaleza y cantidad de la enzima transferasa; cantidad presente del agente conjugante; naturaleza del xenobiótico involucrado; etc.

Existen especies que carecen de un proceso de conjugación adecuado para una estructura concreta, o bien desarrollan una reacción peculiar, fenómenos que se han de reflejar en las respuestas:

- La conjugación con ácido glucurónico suele ser una de las reacciones de fase II con cierta importancia en los mamíferos. Sin embargo, hay que señalar la excepción de gatos y especies afines, que la desarrollan con cierta dificultad, o incluso no tienen capacidad de llevarla a cabo con los derivados fenólicos.
- El perro es incapaz de acetilar los derivados aminos aromáticos porque carecen de la isoenzima N-acetil-transferasa apropiada.
- El cerdo es deficiente en los procesos de conjugación con los radicales sulfatos.
- La conjugación con aminoácidos viene determinada de modo filogenético: los primates utilizan para ello la glicina y la glutamina, mientras que algunas aves utilizan la ornitina.

En cambio, las diferencias cuantitativas pueden ser debidas a una de las dos causas siguientes:

- Variaciones en los niveles enzimáticos, que afectan al equilibrio entre las distintas vías.
- Presencia de inhibidores naturales, que inciden en la magnitud de reacciones competitivas.

Por lo general, este tipo de diferencias conciernen casi siempre a las reacciones de la fase I, posiblemente por disparidad en el perfil de las isoenzimas del citocromo P₄₅₀, que suelen presentar una cierta especificidad para determinadas zonas de las estructuras moleculares.

La raza

La raza dentro de cada especie, también puede originar ciertas diferencias en aquellos procesos de biotransformación, que están controlados de un modo genético. De este modo cabría explicar los resultados encontrados para las respuestas biológicas en algunas experiencias toxicológicas. Es decir, los defectos genéticos propios de los individuos de una raza concreta y que originan alteraciones en alguna actividad enzimática, pueden ser los responsables de la aparición de respuestas tóxicas anormales. Por ello, los estudios toxicológicos deberán ser realizados con grupos de animales que pertenezcan a razas homocigóticas, para evitar posibles deducciones erróneas que pueden provenir del empleo de animales heterocigóticos.

En este sentido, se han encontrado cinéticas desiguales en la oxidación de hexobarbital en función de la raza de rata empleada en la experiencia: Wistar, Sprague-Dawley y Holtzman. Marcadas diferencias en las actividades enzimáticas de sus sistemas citocromos P₄₅₀ repercute sobre la duración del sueño provocado por dicha sustancia en cada raza de ratas. También en el ser humano se han detectado variaciones genéticas en lo que respecta a las biotransformaciones de estructuras como el propranolol, la fenacetina y otros fármacos. Así mismo, la raza también puede dar lugar a modificaciones en las reacciones de fase II, como ocurre con la formación de glucurónidos, cuyas variaciones suelen tener un origen genético asociado a una reducción en la actividad de la glucuronosiltransferasa.

El sexo

En las respuestas toxicológicas a xenobióticos se puede observar una marcada diferencia cuando se comparan individuos de sexos diferentes. Así, dosis equivalentes de hexobarbital provocan un sueño considerablemente menos prolongado en las ratas machos que en las ratas hembras. También en esta línea, se ha visto que el insecticida órganofosforado, paratión, es dos veces más tóxico para las ratas hembras que para las machos.

La mayoría de las veces, la influencia de este factor está relacionada con la capacidad hepática para la biotransformación, bien porque incida sobre la vida media del xenobiótico, que al ser más prolongada tiene mayor probabilidad de ejercer su efecto nocivo, bien porque la estructura activa es alguno de sus me-

tabolitos hepáticos. En este sentido, se ha visto que las ratas machos son más susceptibles a las injurias hepáticas provocadas por el Cl_4C o por el halotano, debido a la mayor velocidad con que pueden transformar tales sustancias en estructuras intermediarias reactivas.

Igualmente, cabe señalar la incidencia del sexo en los procesos de biotransformación que tienen lugar en tejidos extrahepáticos. Así, los microsomas renales de ratas machos transforman el cloroformo en fosgeno de un modo diez veces más rápido que los microsomas renales de las ratas hembras. Con ello se ha demostrado la influencia del sexo en la nefrotoxicidad del cloroformo.

También el equilibrio entre las hormonas sexuales masculinas y femeninas resulta de importancia como determinante de la actividad de las enzimas citocromo P_{450} . Parece que las ratas machos superan a las hembras en un 20-30 % en la actividad y concentración de los sistemas citocromo P_{450} y NADPH-citocromo reductasa de los microsomas hepáticos. La castración de ratas machos reduce su facultad para metabolizar xenobióticos, mientras que el tratamiento de ratas hembras con testosterona incrementa esta capacidad.

En el ser humano se han observado diferencias atribuibles al sexo en las respuestas relacionadas con las actividades tóxicas de algunas sustancias: ácido acetilsalicílico, nicotina, heparina, etc.

La edad

Un hecho bien conocido es la influencia de la edad en la capacidad de las funciones fisiológicas y metabólicas propias del ser humano y de los animales, como ocurre con la facultad de transformar los xenobióticos, normalmente, más acusada en los jóvenes que en los individuos geriátricos. Posiblemente también con la edad se pierde capacidad de enlace en las proteínas plasmáticas. Sin embargo, los recién nacidos la suelen tener más limitada, porque los sistemas enzimáticos no han alcanzado su pleno desarrollo, aunque en estos casos se puede observar una mayor eficacia de los agentes inductores de enzimas. Como consecuencia de todo ello, puede afirmarse que en los organismos más viejos se obtienen respuestas más tóxicas con aquellas estructuras cuya actividad biológica se deba a la molécula inicial, pero en cambio resulta menor cuando dicha actividad se debe a sus metabolitos.

La gestación

Durante el embarazo se reduce la actividad de numerosas enzimas, entre las que destaca la responsable de la conjugación glucurónica, por un marcado efecto de la actuación de la progesterona.

La dieta

Se ha comprobado que un factor determinante de la actividad metabolizadora en los animales de experimentación es su estado nutricional. En este sentido se ha comprobado cómo ciertas deficiencias en algunos nutrientes minerales (Ca, Cu, Fe, Mn o Zn) reduce tanto las reacciones de oxidación catalizadas por el sistema citocromo P₄₅₀, como las de reducción. Además, esta pérdida de actividad se recupera cuando se procede a una ingesta adecuada.

También ocurre lo mismo con las *deficiencias en algunas vitaminas* (C, E y complejo B), posiblemente porque de modo directo, o indirecto, están involucradas en la regulación de ese sistema enzimático. En este caso de las vitaminas, también la deficiencia puede alterar la energía y el estado redox de las células y obstaculizar, en consecuencia, la producción de los cofactores ricos en energía que se requieren para las reacciones propias de la fase II. Esta anomalía también se corrige cuando se suministra la ingesta adecuada.

Las *dietas hipoproteicas* suelen provocar un marcado incremento en la toxicidad de aquellos xenobióticos directamente activos, aunque la reducen cuando la toxicidad depende de la formación de algún metabolito activo. Tal es el caso de la hepatotoxicidad de la dimetilnitrosamina, posiblemente porque está reducida la capacidad de originar la N-desmetilación del compuesto, considerada como la etapa previa esencial para que se convierta en un agente alquilante cancerígeno.

Algo parecido ocurre con las toxicidades del cloroformo o del heptacloro, que necesitan de una biotransformación para ser activos. En realidad, las dietas hipoproteicas actúan reduciendo la actividad de los sistemas enzimáticos microsomaes implicados en el metabolismo de las ratas, de modo especial aquellos que hacen referencia a los contenidos enzimáticos en citocromo P₄₅₀ y NADPH-citocromo c reductasa.

Efectos semejantes se observan en relación con la incidencia del *nivel de lípidos* en la dieta sobre las actividades de ciertas enzimas enlazados a las membranas, donde los lípidos son componentes importantes de sus estructuras. Se ha demostrado que la fosfatidilcolina es un componente esencial para el sistema enzimático microsomal hepático. Un aporte rico en ácidos grasos poliinsaturados aumenta el riesgo de peroxidaciones y puede conducir a una reducción de la actividad del sistema citocromo P₄₅₀, con la correspondiente pérdida en la capacidad de hidroxilar a los xenobióticos.

Así mismo, un aumento en la ingestión de *carbohidratos* puede provocar una reducción de la actividad tóxica de los xenobióticos, también asociada a una pérdida de actividad de los enzimas ya citados.

Una práctica común en los estudios toxicológicos es privar de alimentos a los animales durante la noche para reducir el volumen de materias en el tracto intestinal y favorecer la absorción del xenobiótico administrado por vía oral. Sin embargo, en el caso de trabajar con roedores esta práctica puede resultar inapropiada al ser animales de hábitos alimentarios nocturnos; en este caso, los anima-

les pueden verse privados de alimentos durante un período de tiempo demasiado prolongado, que puede traer como consecuencia una alteración de la actividad de algún tipo de sistema enzimático.

Esto puede ocurrir, por ejemplo, con la desalquilación de la dimetilnitrosamina y, en consecuencia, se potencia su hepatotoxicidad. También el ayuno nocturno suele reducir al glutatión hepático en un 50 %, por lo que se ve incrementada la toxicidad de todas aquellas estructuras cuya biotransformación dependa del glutatión, como puede ser el bromobenceno.

Los ritmos circadianos

Mucho se ha hablado de la influencia de la hora del día sobre la velocidad de biotransformación de un xenobiótico que ha penetrado en el organismo vivo. Tales especulaciones se basan en la frecuencia con que la cinética de la biotransformación se correlaciona con las variaciones de las funciones endocrinas, influidas muchas de ellas por los ciclos de luz-oscuridad. Así, las biotransformaciones *in vitro* de las moléculas de aminopirina o de hexobarbital, conseguidas con el sistema monooxigenasa citocromo P₄₅₀ aislado de ratas, resultan variables en función del momento del día en el que haya sido aislado de los animales dicho sistema.

También las concentraciones del glutatión hepático se caracterizan por responder a un cierto ritmo circadiano, con niveles superiores hacia los finales de los períodos de oscuridad. Esto hace pensar que se produce una acumulación de glutatión durante el tiempo propio de la alimentación de estos roedores de hábitos nocturnos, que decae después de un largo período de luz en los que los animales reposan y apenas comen.

Los factores ambientales

Se ha podido observar en la experimentación con animales, que existen varios factores ambientales capaces de influir sobre el metabolismo de los xenobióticos y, por tanto, sobre la actividad tóxica de sus estructuras químicas: temperatura, radiaciones, luz, humedad, altitud, etc.

Cabría esperar que los animales que disponen de un control homeotérmico deben presentar un metabolismo independiente de la temperatura ambiente, pero en la práctica no ocurre así. Las variaciones extremas de la temperatura se pueden traducir en un cierto estrés para los animales y provocar cambios debidos a las interacciones hormonales.

Unas veces este factor ambiental incide de modo directo sobre el metabolismo del tóxico, mientras que en otros casos lo hace sobre algunos mecanismos fisiológicos. Así, las ratas sometidas a un estrés por el frío incrementan los procesos de hidroxilación microsómica de la acetoanilida.

En general, las radiaciones ionizantes reducen la velocidad metabólica de los xenobióticos, tanto *in vivo* como *in vitro*, efecto que ha sido claramente confirmado para el caso de la hidroxilación de los esteroides.

Los estados fisiológicos anormales

Puesto que el hígado puede ser considerado como el principal órgano donde ocurre la biotransformación de los xenobióticos, cualquier situación patológica que, de modo severo, interfiera con las funciones normales del mismo puede ocasionar algún tipo de alteración en los procesos metabólicos: infecciones virales, carcinomas, ictericia obstructiva, hepatitis, cirrosis, etc.

En los estudios toxicológicos hay que tener en cuenta que una sustancia tóxica puede dañar al hígado, además de ocasionar otros efectos nocivos. En consecuencia, puede afectar de modo más o menos intenso a los sistemas enzimáticos implicados en la biotransformación y dar lugar a un desajuste enzimático que ha sido relacionado con el grado del daño observado. Después de la injuria hepática, puede aparecer una fase de regeneración que, a menudo, exalta la actividad enzimática por encima de los valores mínimos normales.

Por otra parte, una deficiencia hormonal patológica, o una administración de las hormonas, también puede alterar los procesos de biotransformación en respuesta a las influencias que hormonas como las tiroideas, adrenales e insulínicas tienen sobre las actividades de muchos sistemas enzimáticos.

Implicaciones derivadas de la biotransformación de un xenobiótico

Once son las implicaciones que se derivan de los procesos de biotransformación a los que pueden ser sometidas las distintas estructuras químicas presentadas por los xenobióticos que llegan al organismo vivo:

1. En general, las transformaciones bioquímicas que sufre un xenobiótico tienen como fin primordial acentuar su solubilidad en agua, es decir, dan lugar a la formación de metabolitos cada vez más hidrófilos con el fin de facilitar una rápida eliminación por la vía renal.
2. Existen estructuras altamente ionizadas, que no necesitan de una transformación previa puesto que su carácter hidrofílico ya resulta suficiente para una buena eliminación. Tal ocurre con las bases de amino cuaternarias y los colorantes diazo que incorporan grupos sulfónicos ionizados; también cabe citar el caso de algunos ésteres, como acetilcolina y succinilcolina, que son hidrolizados por las esterases plasmáticas.

3. Existen sustancias con una liposolubilidad tan elevada que resultan metabólicamente estables y se acumulan en el tejido adiposo. Tal es el caso del DDT y algún otro insecticida relacionado.
4. Aunque las reacciones implicadas en las fases I y II tienen como objetivo primordial conseguir una inactivación biológica del xenobiótico, se pueden encontrar casos especiales en los que la biotransformación conduce a la formación de sustancias con una mayor actividad biológica. En esta contingencia, la metabolización origina una *bioactivación*.
5. Un xenobiótico puede ser metabolizado por vías bioquímicas diferentes, de tal modo que se formarán mayores cantidades de unos metabolitos que de otros, de acuerdo con la cinética de cada reacción. Así, después de la administración de ácido salicílico aparece en la orina un 50 % de la estructura primaria sin ser transformada, un 25 % en forma de complejo glucurónido y una fracción pequeña de un derivado que lleva introducido un segundo grupo OH, conocido como ácido gentísico.
6. Cambios en el pH de la orina pueden modificar la distribución porcentual de los metabolitos eliminados por la vía renal, al haberse modificado el grado de ionización de algunos de ellos y permitir su reabsorción en los túbulos renales. Esta circunstancia debe ser tenida en consideración siempre que el análisis de orina se emplee para el estudio de la metabolización y excreción de tóxicos y medicamentos, como suele ocurrir en el caso de las anfetaminas.
7. En muchas ocasiones, las reacciones de biotransformación son estereoselectivas, por lo que en el caso de administrar racematos ocurrirá una transformación más rápida en uno de ellos, que en el otro.
8. De gran interés en la investigación toxicológica es el fenómeno de la *inducción enzimática*, que se puede presentar en las transformaciones bioquímicas de los xenobióticos cuando son metabolizados por el sistema retículo endoplásmico de las células hepáticas. Así por ejemplo, la repetida administración de hexobarbital produce un incremento de la velocidad a la que suele ocurrir su transformación. Esta inducción enzimática lleva consigo una disminución de la sensibilidad del organismo frente a esa sustancia, que puede ser considerado como un cierto tipo de tolerancia.
9. También caben esperar fenómenos de *interferencias* en los procesos de biotransformación cuando un sistema enzimático tenga que actuar sobre una gran variedad de estructuras químicas, puesto que podrían interferir unas con otras. Además, aquellas sustancias que son inhibidoras de estos sistemas enzimáticos, también provocarán interferencias en la transformación metabólica de todos aquellos xenobióticos que hayan de ser metabolizados por tales sistemas.
10. Los procesos de biotransformación de un xenobiótico están muy relacionados con el tiempo de su permanencia en el organismo, circunstancia que en el ámbito toxicológico tiene importancia por dos razones:

- La magnitud del daño producido por la actividad tóxica del xenobiótico será tanto mayor cuanto más prolongada sea la exposición al mismo.
- La retención de un xenobiótico dentro del organismo puede dar lugar a una acumulación, que permitirá alcanzar los niveles tóxicos requeridos después de un tiempo más o menos largo.

El tiempo de permanencia de una sustancia en el organismo se mide en función de su *vida media biológica* ($t_{1/2}$), que representa el tiempo necesario para reducir hasta la mitad su concentración inicial en el plasma o en algún órgano.

En general, las sustancias hidrófilas, y aquellas que se transforman en metabolitos hidrófilos, suelen tener valores de $t_{1/2}$ muy reducidos; no obstante, en personas con afecciones hepáticas o una función renal deficiente, este valor de su vida media se puede alargar de modo muy significativo. También los cambios en el pH de la orina pueden influir en este dato, cuando se trata de ácidos o bases orgánicas débiles, al provocar la reabsorción de la sustancia en los túbulos renales. Por ello, la ingestión de los antiácidos que contengan bicarbonato sódico prolonga en el organismo la vida media de las anfetaminas.

En principio, toda sustancia que tenga una vida media biológica muy larga puede dar lugar a una acumulación en el organismo, siempre que haya existido una exposición prolongada, aunque sea a concentraciones muy reducidas. Esto resulta de interés para los insecticidas muy lipófilos, resistentes a la degradación metabólica (DDT, aldrin, dieldrin, derivados clorados del bifenilo, etc.).

11. Otro factor que da lugar a otro tipo de *acumulación* de algunas sustancias químicas es la velocidad de su degradación metabólica: las sustancias que resultan muy difíciles de metabolizar, dan lugar a una persistencia elevada. Este fenómeno suele adquirir cierta relevancia cuando concierne a la cadena alimentaria, como es el caso de vertidos al mar de compuestos muy lipófilos (plaguicidas, bifenilos policlorados, etc.). Son compuestos apenas solubles en el agua, aunque sí se incorporan al plasma de los microorganismos acuáticos, que sirven de alimentos al plancton (10 g de plancton son asimilados por 100 g de microorganismos), a su vez comido por otros animales, para continuar con la cadena de los respectivos depredadores. El incremento de concentración de tales compuestos que ocurre con el paso de un depredador a otro, hace que pueda resultar fatal para la salud cuando el último consumidor es el ser humano.

Fase toxicodinámica

- Características de la fase toxicodinámica
- Principales tipos de reacciones involucradas en los efectos tóxicos de los xenobióticos
- Principales tipos de daños provocados por los xenobióticos sobre las funciones celulares

Características de la fase toxicodinámica

Como consecuencia de todos los procesos implicados en la fase toxicocinética, puede afirmarse que en la sangre circulante del organismo afectado pueden encontrarse el xenobiótico bajo formas activas, adecuadas para su disponibilidad biológica.

Se llega así a la *fase toxicodinámica*, que hace referencia a la sucesión de hechos que tienen lugar tras la interacción de la estructura activa con una molécula endógena, como pueden ser ácidos nucleicos (ADN y ARN); proteínas estructurales, libres o formando parte de las membranas; enzimas; lípidos, etc.

Como consecuencia de esta interacción aparece una lesión, que puede tener lugar a diferentes niveles: primero se produce una lesión primaria bioquímica a nivel biomolecular, que puede pasar a subcelular o celular, que se traduce unas veces en la muerte de la célula y otras en fenómenos muy nocivos: mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, alergias, etc.

En el caso de verse afectadas las células de un órgano, incidirá en el funcionamiento del mismo y se observarán los síntomas clínicos; en otros, los efectos tóxicos no llegan a ponerse de manifiesto, como con cierta frecuencia ocurre en el riñón, debido a la actividad de mecanismos compensatorios.

Existen diversas razones por las que los efectos tóxicos resultan ser específicos de un órgano determinado:

a) Por reacción específica del tóxico con los receptores de ese órgano:

1. *Hepatotóxicos*: tetracloruro de carbono.
2. *Nefrotóxicos*: cloruro de mercurio.
3. *Neurotóxicos*: ciclohexano, insecticidas organofosforados.

b) Por una distribución desigual en el organismo, como el caso del paracuat, que se acumula preferentemente en el pulmón.

c) Porque el metabolito tóxico se forma en ese órgano y no en otro, como es el caso del paracetamol.

En cambio, existen sustancias capaces de afectar a varios órganos:

- *Plomo*: intestinos, riñones, sistema nervioso, médula ósea.
- *Cadmio*: riñones, hígado, testículos, placenta, huesos.

En resumen, las variadas incidencias involucradas en la toma de contacto de un xenobiótico con un ser vivo se traducen en diferentes implicaciones, que pueden ser resumidas en tres posibilidades:

- Que se elimine con rapidez, sin que se afecten las funciones del organismo.
- Que se fije y acumule en un tejido, por lo que permanece sin efecto sobre las funciones del organismo.
- Que produzca un efecto nocivo, bien por su naturaleza química, bien porque la biotransformación le ha convertido en una estructura tóxica. En cualquier caso, el efecto que aparece puede ser provocado por la asociación entre el tóxico y el receptor, que unas veces puede ser reversible, y entonces permanece solamente mientras exista tal asociación, o bien se trata de una asociación irreversible que hace irreparable el daño ocasionado.

La fase Toxicodinámica es la última de las implicadas en el desarrollo del fenómeno tóxico como respuesta a las interacciones entre las formas toxicodisponibles de los xenobióticos, o de sus metabolitos y los sistemas biológicos. En esta fase se integran diversos mecanismos, que son las vías a través de las cuales se induce el efecto tóxico.

Un objetivo fundamental de la Toxicología es la comprensión de estos mecanismos de toxicidad por su gran transcendencia práctica: proporcionan información que ha de servir de base para conseguir diversos fines vinculados al ámbito toxicológico:

- Interpretar los datos aportados por la Toxicología descriptiva.
- Estimar la probabilidad que tiene una sustancia química de provocar efectos adversos en el organismo vivo.
- Establecer procedimientos para prevenir, o contrarrestar los efectos tóxicos.

- Diseñar los métodos complementarios *in vitro* de las experiencias con animales para optimizar la comprensión de las toxicidades de los xenobióticos.
- Disponer las modificaciones adecuadas en las estructuras de medicamentos para reducir, o eliminar sus efectos adversos, o de los plaguicidas para hacerlos más selectivos frente a las especies animales de interés.

De aquí la importancia de estudiar las interacciones entre el xenobiótico y los puntos biológicos donde provoca el daño, puntos denominados *receptores*, que suelen ser estructuras moleculares, portadoras de zonas nucleófilas, implicadas en la acción primaria de un tóxico. Para que un sistema biológico pueda ser considerado como un receptor del xenobiótico es preciso que responda a dos propiedades esenciales:

- Reconocer de modo específico al agente químico.
- Responder con un efecto bioquímico, o biofísico, a la acción de ese agente.

De manera bastante simplificada se puede afirmar que las acciones tóxicas de los xenobióticos que llegan al organismo humano pueden ser resumidas en dos grupos principales:

- Las que afectan a la estructura celular: alteración de órganos subcelulares (retículo endoplásmico, mitocondrias, ribosomas, lisosomas), alteración de las membranas, etc.
- Las que afectan a la función de las células: modificación de la actividad enzimática, alteración de la permeabilidad de las membranas, cambios en la reproducción, etc.

No obstante, siempre debe ser tenido en cuenta que la perturbación de una de ellas puede repercutir en la otra; es decir, una lesión celular puede llevar emparejada un trastorno funcional, a la vez que una alteración de la función celular puede, a la larga, afectar a la estructura de dicha célula.

Desde luego, existen muchos modos por los que un organismo vivo puede responder a la acción de un xenobiótico, pero también el tipo de respuesta va a depender de numerosos factores. Aunque la mayoría de los efectos tóxicos tengan una base bioquímica, sin embargo la expresión de esos efectos puede ponerse de manifiesto de las formas más diversas. Así por ejemplo, la interacción de un xenobiótico con un proceso metabólico normal puede desembocar en una respuesta fisiológica, como la parálisis muscular o una caída de la presión sanguínea, o bien dar lugar a una lesión de un órgano o tejido. Igualmente, la interacción covalente entre la molécula xenobiótica y una proteína corporal puede aparecer unas veces como una respuesta inmunológica y otras como una lesión tisular, según las circunstancias bajo las que se produzcan.

Por consiguiente, los caminos que conducen al desarrollo de cualquier efecto tóxico pueden ser no solo muy variados, sino también extraordinariamente complejos. Se pueden señalar tres de ellos, relacionados en orden de menor a mayor complejidad:

1. Puede ocurrir que el xenobiótico produzca un efecto local en el mismo punto de contacto, tal como ocurre con las sustancias cáusticas, que ocasionan una destrucción masiva de los tejidos al desnaturalizar fuertemente sus proteínas. Suelen ser sustancias cuyos pH, muy ácidos o muy básicos, están muy alejados del propiamente fisiológico, aunque también pueden ser agentes oxidantes o deshidratantes.
2. Una vez dentro del organismo, la vía más directa es aquella en la que el xenobiótico es capaz de provocar el efecto tóxico con su mera presencia en un lugar crítico, sin que llegue a interaccionar con una molécula endógena. Tal es el caso de las sulfonamidas, que precipitan en los túbulos renales y bloquean la formación de orina por la obstrucción de esos túbulos.
3. Otros casos derivan de la interacción de las estructuras activas con su molécula diana y, en consecuencia, aparece una alteración de la estructura o de la función celular, que conduce al efecto tóxico. Tales estructuras activas pueden responder a tres formas diferentes del agente xenobiótico que penetró en el organismo por algunas de las vías disponibles:
 - Estructura primaria del xenobiótico.
 - Metabolito del producto inicial.
 - Compuesto intermediario reactivo.

Algunas de estas tres formas actúan de modo específico de manera nociva sobre las moléculas de los órganos dianas, provocando perturbaciones, que pueden resultar irreversibles cuando no pueden ser reparadas por ningún mecanismo disponible. La célula pone en juego sus mecanismos de reparación con el fin de conseguir la reversibilidad del efecto nocivo; sin embargo, cuando la alteración producida supera la capacidad reparadora de la célula surge la toxicidad del xenobiótico bajo el desarrollo de las patologías más diversas y graves: necrosis, tumores malignos, fibrosis, etc.

La intensidad de todos estos efectos tóxicos va a depender de la cantidad de xenobiótico que pueda llegar hasta el receptor o molécula diana. Dicha circunstancia está controlada por diversos factores vinculados al mecanismo global del fenómeno tóxico, unas veces favorecedores de la aparición del efecto tóxico, mientras que en otras representan un impedimento para que pueda tener lugar.

En este sentido cabe señalar los factores capaces de actuar de uno o de otro modo:

a) Factores favorecedores de la toxicidad:

- Absorción del tóxico.
- Distribución por el organismo.
- Reabsorción en los túbulos renales o en el intestino.
- Los procesos de bioactivación o de biotoxicación.

b) Factores que obstaculizan la toxicidad:

- La excreción del tóxico.
- La retención en órganos no diana.
- Los procesos de destoxificación.

En resumen, la fase toxicodinámica del fenómeno tóxico es la que conduce a la aparición de los efectos nocivos, en cuanto consecuencia de las diferentes interrelaciones que puede tener una estructura xenobiótica con la actividad normal del receptor.

De aquí que puedan ser estudiadas bajo dos consideraciones diferentes:

- a) Por el tipo de reacción implicada en el proceso tóxico.
- b) Por el tipo de daño funcional que provoca.

Principales tipos de reacciones involucradas en los efectos tóxicos de los xenobióticos

Los diferentes tipos de reacciones implicadas en los efectos tóxicos que aparecen en la fase toxicodinámica del fenómeno tóxico pueden ser agrupados de la siguiente manera.

- A) Efectos tóxicos debidos a la forma activa de la estructura primaria del xenobiótico:
 - 1) Acción basada en la formación de un enlace débil (reversible).
- B) Efectos tóxicos debidos a metabolitos activados del xenobiótico:
 - 2) Acción basada en la formación de un enlace covalente (irreversible).
- C) Efectos tóxicos debidos a compuestos intermediarios reactivos:
 - 3) Acción basada en la formación de radicales libres (muy reactivos).
 - 4) Acción basada en la formación de peróxidos (muy reactivos).

Acción a través de enlaces débiles

Muchos xenobióticos provocan efectos nocivos en sus receptores por una interacción a través de enlaces débiles, que al necesitar de escasa energía de formación pueden hacerse reversibles. Una de sus propiedades más esenciales es la relación, o dependencia, con la concentración del tóxico en los fluidos orgánicos. La acción desaparece cuando se reduce esa concentración.

Esta circunstancia debe ser tenida en cuenta si se desea comprender tanto la relación entre la fase toxicodinámica y la fase de exposición (esta última es la

que marca la pauta para las posibles concentraciones internas del tóxico), como el sentido del equilibrio con el receptor. Sólo así se puede entender que una dosis única pueda ser tóxica, e incluso letal, mientras que la misma dosis fraccionada en el tiempo pueda carecer de efectos visibles. No se debe olvidar que el efecto tóxico sólo aparece cuando la estructura tóxica alcanza una cierta concentración a nivel de receptor. Para algunos tóxicos de acción reversible, el mecanismo de su toxicidad vendrá determinado en gran medida por la mayor o menor saturación de las zonas tisulares de almacenamiento, es decir, por el factor regulador de la retención del xenobiótico en un determinado tejido.

Unas veces, el efecto nocivo se debe a una interacción física, como es el caso de los disolventes orgánicos liposolubles, que provocan una fuerte alteración de la transmisión del impulso nervioso al distribuirse con gran rapidez en los fosfolípidos de la mielina de los nervios transmisores. Otras veces, intervienen enlaces simples, propios de las asociaciones entre moléculas, cuya formación exige un escaso aporte de energía: hidrofóbicos, de hidrógeno, ión-ión, dipolo-dipolo, Van der Waals, etc.

Muchos de los tóxicos que actúan de modo directo sin necesitar de una bioactivación previa, suelen basar su acción en un enlace reversible; en la mayoría de los casos, dan lugar a efectos que pueden ser agudos o a corto plazo. Entre ellos cabe destacar aquellas estructuras que interfieren en la neurotransmisión, bien como agonistas (mimetizando el neurotransmisor), bien como antagonistas. Podemos incluir aquí la toxina botulínica, los alcaloides del cornezuelo del centeno y también aquellos compuestos que interfieren con la actividad de hormonas, o con la excreción renal de ácidos y bases.

Acción mediante enlace covalente

En el conjunto de intoxicaciones, no faltan casos cuyos efectos nocivos son el resultado de la formación de enlaces de tipo covalente entre el receptor y las estructuras tóxicas, que normalmente son moléculas que han sido reactivadas en la biotransformación del xenobiótico. Por la elevada energía que necesitan para formarse (60 KJ/mol), estos tipos de enlaces suelen ser irreversibles. Por lo general, las sustancias activadas por los procesos metabólicos se convierten en estructuras electrofílicas.

Una molécula electrofílica es una estructura química que contiene un átomo deficiente en electrones, por lo que reacciona con los átomos ricos en ellos, situados en moléculas nucleofílicas. Viene a ser un mecanismo frecuente en la biotoxificación de los xenobióticos y su formación puede responder a tres causas bien diferentes:

- Por oxidación del xenobiótico, catalizada por la actividad del sistema citocromo P450, o por las de otras enzimas, dando lugar a cetonas, epóxidos, quinonas, etc.

- Por ruptura heterolítica de enlaces covalentes del tipo de C-O y N-O, que da lugar a compuestos electrófilos catiónicos.
- Por reacción con compuestos inorgánicos.

Las estructuras electrofílicas pueden enlazar con cierta facilidad con las zonas nucleofílicas (grupos aminos, grupos sulfhidrilos, etc.) de muchas macroestructuras biológicas, como ADN, ARN, proteínas, lípidos insaturados, etc. En el caso de las proteínas, estas zonas se encuentran representadas por algunos aminoácidos ricos en electrones, tales como cisterna, histidina, Usina, metionina, tirosina y triptófano. En cambio, para el caso de los ácidos nucleicos, la zona de formación del enlace covalente depende del tipo de base y de los sustituyentes que le acompañan, porque se ha comprobado que los hidrocarburos atacan con preferencia los grupos aminos vinculados a la guanina.

La gravedad del daño producido va a depender del tipo de biomoléculas receptoras afectadas por el tóxico; entre los efectos tóxicos a los que pueden dar lugar cabe citar la mutagénesis y la carcinogénesis (provocada por los agentes alquilantes electrofílicos), la teratogénesis, la sensibilización alérgica y las necrosis celulares.

Lo que determina que el daño inducido persista, incluso después que el tóxico haya sido eliminado del organismo, es la irreversibilidad de los enlaces covalentes. Por otra parte, en estos tipos de efectos, al contrario de lo que ocurre con los reversibles, el factor tiempo es determinante de la magnitud del daño producido, que será proporcional a la dosis total acumulada. Esto significa, que aunque el xenobiótico se absorba a dosis muy reducidas, sus efectos pueden manifestarse después de un período de tiempo suficientemente largo como para que con la acumulación haya alcanzado la dosis tóxica.

Un ejemplo típico de compuesto que por biotransformación se convierte en una estructura electrofílica es el N-acetil-p-aminofenol (paracetamol), que las enzimas microsomales convierten en el derivado electrofílico imino benzoquinona, que se une de modo covalente a las proteínas hepáticas (Figura 9.2.). A dosis terapéutica es analgésico y antipirético y se metaboliza en forma de conjugado mercaptúrico por enlace con el glutatión. Sin embargo, a dosis muy altas produce necrosis hepática centrilobular aguda en el ser humano, y en algunos casos también provoca lesiones renales. Parece ser que las macrodosis de paracetamol saturan al hígado de metabolito tóxico y la concentración de glutatión resulta insuficiente para que se pueda conseguir la eliminación total del tóxico.

Otro ejemplo de toxicidad debida a un metabolito se tiene en el hexano, que en la biotransformación sufre una hidroxilación seguida de oxidación y se convierte en 2,5-hexanodiona (Figura 13.1). Esta gammadicetona es la responsable de la degeneración observada en los nervios periféricos después de una larga exposición a este compuesto. El metabolito se combina fácilmente con el grupo amino épsilon de la Usina integrada en las proteínas de los neurofilamentos de las neuronas, dando lugar a estructuras de pirroles. De este modo aparecen polipéptidos que se comportan como moléculas extrañas al organismo.

También son ejemplos de acciones tóxicas mediante enlaces covalentes las alteraciones irreversibles de algunos sistemas enzimáticos con motivos de diferentes causas: unas veces están ocasionadas de un modo muy específico, como ocurre con los insecticidas organofosforados sobre la acetilcolinesterasa; otras veces responden a situaciones inespecíficas, como puede ser el bloqueo de los grupos -SH que poseen algunas enzimas, reacción típica de metales pesados como Hg y Pb. También el As (III) puede reaccionar de modo irreversible con una coenzima, el ácido dihidrolipoico, implicado en la descarboxilación oxidativa de los ácidos alfa-cetónicos; de este modo provoca la acumulación del ácido pirúvico.

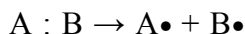
Acción por formación de radicales libres

En algunas ocasiones, los efectos tóxicos se deben a compuestos intermedios reactivos que se han formado en la biotransformación del xenobiótico. Casi siempre corresponden a estructuras electrofílicas potentes o a radicales libres.

Un mecanismo de acción tóxica importante es el que tiene lugar a través de la formación de radicales libres. Se entiende como tales aquellas moléculas, o fragmentos de ellas, que poseen en su orbital externo un electrón desapareado.

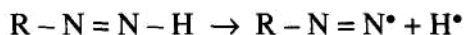
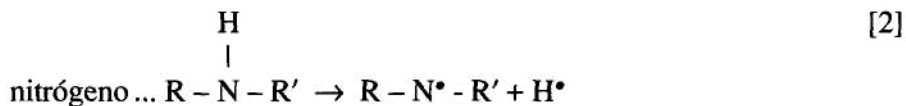
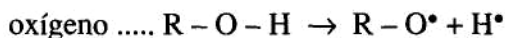
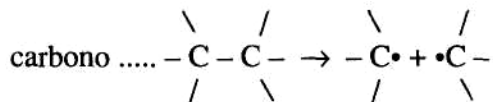
En la práctica existen tres posibilidades por las que una molécula química puede transformarse en un radical libre:

- a) Por ganancia de un electrón: es el caso del insecticida paracuat, del citostático doxorrubicina y del antibiótico nitrofurantoína, cuyas moléculas aceptan electrones de las enzimas reductasas para dar lugar a radicales libres. Estos transfieren el electrón extra al oxígeno molecular, que se convierte en un anión radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) con renovación de la molécula original del xenobiótico. Es decir, existe un ciclo redox en el que el xenobiótico actúa de molécula aceptora de electrones y generadora de aniones superóxido. Incluso estos aniones se pueden cambiar en radicales hidroxilo, una especie química mucho más activa y, por ello, más tóxica.
- b) Por pérdida de electrones: como ocurre en muchas moléculas de xenobióticos nucleofílicos, propensos a una reacción catalizada por enzimas peroxidasas en las que se pierde un electrón para formar un radical libre. Este tipo de posibilidad ocurre con fenoles, hidroquinonas, aminofenoles, aminas, fenotiazinas y tioles.
- c) Por fisión homolítica de un enlace covalente: se trata de la escisión homolítica sufrida por una molécula ($A : B$) cuando recibe la excitación de una energía externa, dentro de un proceso metabólico con reacciones de óxido-reducción que involucran a un solo electrón [1]:



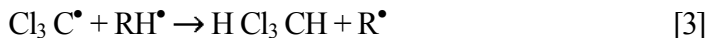
[1]

En la práctica, esta molécula A : B puede representar la ruptura homolítica de enlaces muy diversos [2]:



En Toxicología abundan los casos de toxicidad provocada por la formación de radicales libres, que se caracterizan siempre por su gran reactividad, bien de un modo directo o después de una peroxidación. Por lo general actúan dentro de un proceso que se desarrolla a través de tres fases: iniciación (formación de radicales), propagación (reacción en cadena) y finalización (neutralización o bloqueo de los radicales libres por moléculas endógenas capaces de ceder un H, como los tocoferoles).

Entre los ejemplos más conocidos cabe citar dos: el de los hidrocarburos halogenados en general, y la activación del tetracloruro de carbono, un hepatotóxico clásico, en particular. La intervención del citocromo P₄₅₀ reducido es lo que origina la formación del radical triclorometil, Cl₃C•, que ofrece una gran reactividad frente a los dobles enlaces de los fosfolípidos (RH) de las membranas celulares y que no sólo lesiona al hígado sino también a otros tejidos, como el pulmonar:



Así mismo, se ha señalado la degradación de aquellas proteínas que portan una función tiol (-SH), propia de muchas enzimas. Por otra parte, el radical triclorometil se puede unir con otro radical hidrógeno, formando *in situ* cloroformo con su actividad biológica específica.



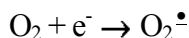
Mecanismos similares se han descrito para otros ejemplos diversos: un exceso de hierro; un defecto de zinc; paracuat; ozono; nitrosaminas, hidrocarburos policíclicos; derivados azoicos; etc.

Como órganos dianas de los radicales libres, aparecidos como consecuencia de transformaciones en muchos xenobióticos, se pueden señalar los más variados tejidos: hepatocitos, células endoteliales vasculares, células bronquiales, neumocitos, etc.

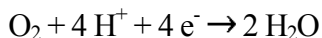
Acción por formación de superóxidos

El mecanismo de las acciones tóxicas con la intervención de superóxidos (O_2^*) puede ser considerado como un caso particular de acciones con intervención de radicales libres.

Los radicales superóxidos se forman en las células cuando el oxígeno molecular recibe una reducción univalente, es decir, consume un solo electrón. Representa un caso particular dentro del uso que las células hacen del oxígeno en su forma molecular, porque lo normal es que consuman cuatro electrones para formar una molécula de agua a partir del mismo [5].



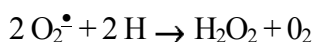
[5]



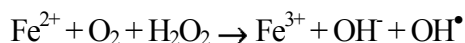
El radical superóxido participa en algunas reacciones bioquímicas convencionales, como en el funcionamiento de las enzimas xantina oxidasa y aldehído oxidasa, pero siempre de un modo bien controlado por otros mecanismos biológicos. También son utilizados por los leucocitos y los macrófagos como intermediario para su actividad bactericida.

Pero no sólo este radical superóxido aparece en los procesos bioquímicos normales del organismo, sino también puede surgir en los casos de algunos xenobióticos que son capaces de atraer fuertemente a los electrones: nitrofuranos, nitroimidazol, nitrofenil, paracuat, etc. Estos compuestos pueden provocar una desviación de los electrones transportados por las cadenas respiratorias mitocondriales y dar lugar a la formación del radical activo.

Dentro de la actividad biológica, el radical superóxido no resulta muy activo por sí mismo, sino que bajo el control de las metaloenzimas *superóxido-dismutatasas*, localizadas en las mitocondrias o en el citosol, origina peróxido de hidrógeno. Después, este último puede experimentar una fisión homolítica reductiva con transferencia de un electrón procedente de un metal de transición, como Fe^{2+} , y dar lugar al anión hidróxilo (OH^-) y al radical hidróxilo (OH^*) [6].



[6]



Este radical OH^* es el agente de oxidación más potente que se conoce en el ámbito de la química biológica y en los organismos vivos no existen mecanismos con capacidad para destruirlos o neutralizarlos.

Los aniones superóxidos suelen estar implicados en las acciones tóxicas de los pesticidas y herbicidas, así como están comprometidos en los procesos de envejecimiento prematuro y de necrosis celular: las formas del oxígeno activado alteran con preferencia los lípidos insaturados con rotura de las membranas biológicas y los radicales libres pueden afectar a diferentes componentes tisulares, como enzimas, retículo endoplásmico, membranas celulares, etc., que desemboca en trastornos metabólicos o en necrosis de las células.

Principales tipos de daños provocados por los xenobióticos sobre las funciones celulares

Como consecuencia de las interacciones que tienen lugar entre las estructuras de los xenobióticos que penetran en el organismo o de sus metabolitos activados, y los sistemas biológicos dianas o receptores específicos, pueden aparecer diversos tipos de daños en las funciones celulares.

Estos daños resultan ser numerosos y variados, aunque pueden ser reunidos en los seis grupos principales: 1. por interferencias con el funcionamiento de sistemas enzimáticos; 2. por interferencia con las funciones generales de la célula; 3. por interferencia con el funcionamiento del sistema ADN-ARN sintetizador de proteína; 4. por bloqueo de la capacidad transportadora del oxígeno de la hemoglobina; 5. por reacciones de sensibilización; 6. por irritación química directa de los tejidos.

Daños por interferencias con el funcionamiento de sistemas enzimáticos

Conocido que las enzimas son fundamentales para todos los procesos bioquímicos relacionados con la vida, no resulta extraño que el mecanismo de acción nociva de ciertos xenobióticos se corresponda con interferencias sobre la actividad de algunas enzimas.

Unas veces, la interferencia se hace irreversible como ocurre con la inhibición de la acetilcolinesterasa por parte de los insecticidas órganofosforados. En este caso, el grupo fosfato del compuesto orgánico se une mediante un enlace covalente con la enzima, justamente en el mismo sitio superficial por donde se hidroliza la acetilcolina, es decir, por la zona activa de la enzima.

Se pueden citar otros inhibidores menos selectivos con respecto al sistema enzimático, como ocurre con los elementos inorgánicos arsénico, mercurio y plomo, que bloquean todo grupo libre *-SH* portado por cualquier enzima.

En otras ocasiones, se produce una acción competitiva con los sustratos normales por el sitio activo de una enzima, dando lugar a las interferencias correspondientes. Es el caso de los llamados antimetabolitos, que son sustancias químicamente relacionadas con las estructuras de los sustratos normales y resultan

aceptadas por las enzimas a las que quedan incorporados, con pérdida de sus funciones. Un ejemplo típico es el del ácido fluoroacético, que se incorpora al ciclo del ácido cítrico, bloqueándolo con todas sus consecuencias. Además, puede ser un ejemplo de bioactivación, porque una vez incorporado al ciclo se transforma en ácido fluorocítrico, que es un inhibidor de la aconitasa, enzima que se encarga de la transformación del ácido cítrico en isocítrico. Se emplea como rodenticida y su toxicidad se manifiesta a través de perturbaciones en el sistema nervioso central en forma de náuseas y convulsiones, así como mal funcionamiento del corazón bajo los síntomas de fallos en el ritmo cardíaco y fibrilación ventricular.

Otro ejemplo de este tipo corresponde al metotrexato usado como citostático en el tratamiento de tumores malignos, que se comporta como antagonista del ácido fólico; por ello, inhibe el sistema enzimático esencial para que puedan ser llevadas a cabo las síntesis de los aminoácidos y de los derivados purínicos y pirimidínicos.

La etionina es un análogo de la metionina y puede resultar hepatotóxica dando lugar a hígados grasos, con evolución hacia cirrosis y carcinomas; en su actividad, se ha observado una carencia de ATP y un desacoplamiento en la síntesis proteica, que origina una deficiencia de enzimas hepáticos con ciertas perturbaciones en el metabolismo intermediario.

Asimismo, el ácido cianhídrico y el sulfuro de hidrógeno, pueden paralizar la respiración aeróbica por bloqueo de las enzimas finales de la cadena de los citocromos.

En algunas especies, la presencia de D-glucosamina libre provoca daños en el tejido hepático al inhibir la síntesis de ARN y de proteínas, con alteración en la composición de las membranas celulares.

También los agentes desacopladores de reacciones bioquímicas pueden interferir con la síntesis de los derivados fosfatos ricos en energía. Cuando esta energía no se puede almacenar bajo la forma de ATP se libera en forma de calor y produce una elevación de la temperatura corporal (fiebre). Tal ocurre cuando se toma dinitrofenol, usado en otros tiempos contra la obesidad.

Finalmente, se puede citar el secuestro de metales, que son esenciales para la función enzimática, llevado a cabo por las sustancias quelantes, como los ditiocarbamatos. Estas sustancias, usadas en la industria de fabricación del hule, provocan en los operarios dolores de cabeza intensos y malestar general, siempre que consumen bebidas alcohólicas. Sus efectos nocivos se deben a que tales sustancias químicas se enlazan con los iones de cobre e inactivan a la deshidrogenasa del acetaldehído, intermediario en el metabolismo del etanol, que resulta tóxico cuando se acumula, al no poder pasar a acético y degradarse a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

Daños por interferencias con las funciones generales de la célula

El éter, el ciclopropano y el halotano son sustancias con actividades anestésicas, probablemente debidas a su acusado carácter lipófilo por el que pueden ser acumuladas en las membranas de las células. Es posible que esta acumulación

afecte al transporte de glucosa y de oxígeno a través de esas membranas, pues las células del sistema nervioso central son las más susceptibles y se caracterizan por su fuerte reacción frente a una reducción en los niveles de glucosa y en la tensión de O_2 .

También pueden provocar este tipo de daño tóxico los disolventes orgánicos no polares. Se conocen disolventes industriales muy volátiles que están planteando problemas de intoxicaciones juveniles a nivel mundial. Son sustancias que responden a estructuras de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc., que tienen una acción enervante, es decir, una combinación de efectos estimulantes y de efectos depresores sobre el sistema nervioso central. Dan lugar a fenómenos de adicción, y se acompañan de neurotoxicidad, hepatotoxicidad, etc. según el tipo de sustancia.

Otros tipos de sustancias pueden provocar interferencias con la neurotransmisión, es decir, con la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis entre las neuronas. Tal es el caso del curare, la atropina, la nicotina empleada como insecticida, así como la familia de los fármacos que actúan sobre el sistema nervioso autónomo, que incluye sustancias adrenérgicas, colinérgicas y algunos psicofármacos antidepresivos. También la toxina producida por el *Clostridium botulinum* interfiere con el proceso de liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular.

Daños por interferencias con el funcionamiento del sistema ADN-ARN, sintetizador de proteínas

Algunas sustancias pueden interferir con el proceso de duplicación del ADN y afectan con ello a la división celular. Así, los derivados de la acridina y los antibióticos del grupo de la actomicina se fijan a las cadenas del ADN, o bien se pueden intercalar entre vueltas consecutivas de la doble espiral. Muchas sustancias alquilantes polivalentes suelen portar en sus moléculas grupos muy reactivos, que son capaces de formar puentes entre dos cadenas de ADN y no permitir su separación.

Determinadas sustancias, como la rifampicina, actúan como inhibidores de la enzima polimerasa del ARN e interfiere con la transcripción de la información del ADN hacia el ARN-mensajero.

Dentro de esta línea, la puromicina presenta la capacidad de sustituir a la tirosina en la cadena proteica, interrumpiendo así la síntesis proteica. También los antibióticos tetraciclina y cloranfenicol interfieren con la síntesis proteica a nivel de los ribosomas.

La acción citostática consiste en una inhibición de la división celular y, por consiguiente, del desarrollo de los tejidos. Por ello, las sustancias que presentan dicha propiedad se emplean en el tratamiento de tumores cancerígenos, pero como no sólo inhiben el crecimiento del tejido tumoral, dan lugar a efectos tóxicos secundarios, como puede ser una reducción en la actividad de la médula

ósea que lleva a una significativa baja en el número de componentes celulares de la sangre, que en algunas ocasiones llega a ser mortal.

Un grupo importante de citostáticos lo forman los denominados «agentes alquilantes», como el muy usado trietilenmelamina. Son sustancias agresivas capaces de reaccionar de modo principal mediante enlaces covalentes con los grupos NH_2 y OH . Debido a ello, pueden formar conexiones con las cadenas de ADN e impedir su duplicación por lo que imposibilitan la síntesis proteica. En la práctica, las aplicaciones clínicas de estas sustancias llevan consigo la aparición de muchos efectos colaterales, como el alopecico y otro más interesante aplicable como control de las plagas de insectos, que es el efecto esterilizante.

Relacionada con los efectos ejercidos por los compuestos citostáticos cabe citar su acción inmunodepresora, que consiste en una reducción de las reacciones de defensa inmunológicas, como consecuencia de haber inhibido la proliferación de los linfocitos. Esta propiedad se suele aplicar para evitar los rechazos en los trasplantes de órganos, pero implica una mayor susceptibilidad frente a las infecciones.

Por último, hay que hacer referencia a la posibilidad de otro tipo de efecto colateral no deseable bajo la aparición de un incremento del riesgo de carcinogénesis. Algunas sustancias pueden provocar una acción mutagénica, que alteran las características genéticas de las células y desembocan en una actividad carcinogénica, debida a una proliferación celular descontrolada.

Daños por bloqueo de la capacidad transportadora del oxígeno de la hemoglobina

Algunos de los xenobióticos con estructuras nitrogenadas que, de algún modo, penetran en nuestro organismo pueden dar lugar a una oxidación del catión ferroso (Fe^{2+}) a catión férrico (Fe^{3+}). Es un mecanismo de reacción que tiene lugar con ciertos tipos de pesticidas e incluso algunos antibióticos, que resulta de cierta relevancia tanto para el ser humano como para los mamíferos, porque puede transformar la hemoglobina de la sangre, en metahemoglobina.

La hemoglobina, considerada como el principal y más abundante transportador de oxígeno a las células, actúa fijando el oxígeno de modo reversible a su átomo de hierro ferroso, secuestrado en el anillo de porfirina propio de su estructura química. Cuando este metal pasa al estado oxidado férrico, propio de la metahemoglobina, pierde la capacidad de fijar oxígeno y, en consecuencia, se produce una anoxia de los tejidos. En general, la penetración en el organismo de cualquier sustancia capaz de oxidar al hierro será un agente que actúe como metahemoglobinizante.

En los seres vivos este tipo de reacciones son bastante complejas y representan un ejemplo de interrelaciones entre los procesos metabólicos oxidantes y reductores, que pueden tener lugar sobre aquellos compuestos portadores de estructuras con funciones nitros y aminas.

Existen algunos xenobióticos cuyas estructuras químicas bloquean la función de la molécula de hemoglobina con los trastornos consiguientes de efectos nocivos. El ejemplo más paradigmático es la intoxicación por monóxido de carbono, donde la molécula de CO reemplaza a la de O₂ debido a su mayor afinidad por el enlace que le vincula a la hemoglobina transportadora. Como resultado aparecen los síntomas propios de una reducción de oxígeno en los tejidos. En otros casos, se forma sulfohemoglobina que tampoco tiene capacidad de transportar oxígeno.

En la región geográfica del Mediterráneo se pueden encontrar individuos que genéticamente presentan una mayor sensibilidad frente a los medicamentos que propician la formación de metahemoglobina por una deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, lo mismo que puede observarse en muchos recién nacidos. Entre estos medicamentos caben citar sulfonamidas, acetanilida, antipirina, ácido p-amino-salicílico, nitrofurantoína y quinina.

Daños por reacciones de sensibilización

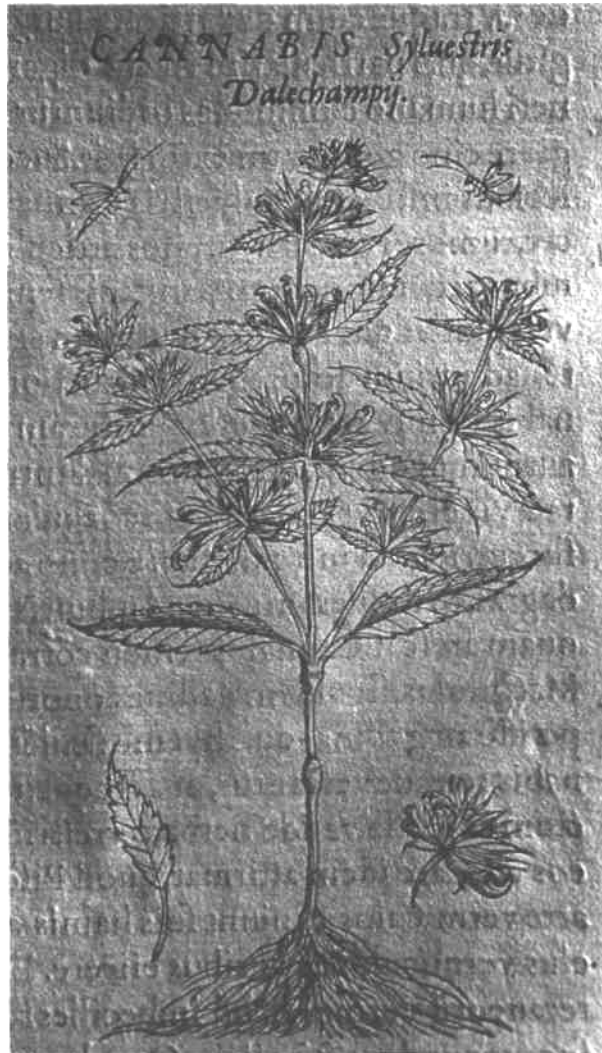
Consiste en el desarrollo de una mayor susceptibilidad por parte de algunos seres biológicos frente a la actividad de un xenobiótico. Se debe a la formación de anticuerpos específicos que funcionan como antígenos; en realidad, puede ser considerada como una reacción de un hapteno (xenobiótico) con una proteína. En la práctica se denominan alérgenos a toda estructura química que presenta una gran reactividad frente a las proteínas y dan lugar a una hipersensibilidad alérgica. Casos especiales vienen a ser aquellos en los que en la sensibilización interviene la acción de la luz. En consecuencia se puede hablar de daños alérgicos, fototóxicos, fotosensibilizadores, etc.

Daños por irritación química directa de los tejidos

Se trata de reacciones de sustancias, que producen dermatitis química o una irritación de la mucosa, como ocurre con los gases irritantes (cloro, fosgeno) y lacrimógenos (bromoacetona, bromuro y cloruro de acetofenona, acroleína, cloropirina, etc.).

PARTE III

PRINCIPALES TIPOS DE EFECTOS INDUCIDOS POR XENOBIOTICOS



Dalechamps, Lacques (1513-1588). «*Historia generalis plantarum,...*»
Editado por Gulielmum Rovillium, 1587.

Mutagénesis

- Consideraciones generales
- Desarrollo histórico de la Toxicología genética
- Mutagénesis
- Tipos de efectos mutagénicos
- Mecanismos moleculares
- Impacto sobre la salud humana
- Evaluación de la mutagenicidad
- Modelos transgénicos
- Valor predictivo de los ensayos de mutagenicidad

Consideraciones generales

Entre los tóxicos de acción sistémica que pueden afectar al organismo vivo se encuentran algunos xenobióticos que ejercen su actividad tóxica sobre las células de los diferentes órganos y tejidos corporales, en cuyo material hereditario inducen la aparición de mutaciones. En estos casos, las células pueden verse perturbadas a través de procesos generales, que pueden responder a dos tipos de efectos, según actúen sobre las estructuras celulares o bien sobre alguna de sus funciones.

Se entiende por *mutagénesis* aquella modificación del material genético que resulta *estable y transmisible* a las células hijas que surgen del proceso de división celular o mitosis. En el caso de que el ADN afectado corresponda a células de la línea germinal se producirán mutaciones que son potencialmente transmisibles a la descendencia y, por lo tanto, hereditarias, mientras que si se trata de células somáticas sólo afectarán a las características específicas de esas células, y únicamente se transmitirán a otras células hijas del mismo individuo.

Las consecuencias de las mutaciones pueden ser muy diversas: dar lugar a malformaciones congénitas detectables al nacimiento del nuevo ser; conducir al desarrollo de un proceso canceroso; ser la causa de una enfermedad de carácter hereditario; conferir una mayor susceptibilidad a la contracción de determinadas enfermedades; etc.

De acuerdo con lo indicado anteriormente, las estructuras químicas capaces de enlazarse a los ácidos nucleicos, en cuanto material genético capaz de almacenar las características hereditarias, se consideran *agentes genotóxicos*. El conjunto de todos estos fenómenos tóxicos se conoce bajo el nombre de *genotoxicidad* y la parte de la Toxicología que se encarga de estudiar estos fenómenos *Toxicología genética*.

Desarrollo histórico de la Toxicología genética

Las investigaciones sobre mutaciones se inician en 1927 con los trabajos de Müller acerca de los efectos de los rayos X sobre la mosca de la fruta, la *Drosophila melanogaster*. Con posterioridad, fueron observados los efectos mutagénicos de los rayos X sobre las plantas, así como la mutagenicidad de la luz ultravioleta. No obstante, la primera evidencia inequívoca de un caso de mutagénesis química corresponde al año 1942, cuando Auerbach y Robson demostraron los efectos tóxicos del gas mostaza sobre esta *Drosophila*.

El desarrollo ocurrido en la Genética molecular a partir de los trabajos de Watson y Crick, que en 1953 elucidaron la estructura tridimensional del ADN, y los posteriores descubrimientos sobre la replicación del ADN, el código genético y la síntesis de proteínas, permitieron indagar acerca de los mecanismos de la mutagénesis. Entonces se comprendió que un simple cambio de una base podría dar lugar a la aparición de un nuevo fenotipo y, por ello, se comenzó a investigar intensamente sobre los efectos de los productos químicos en el ADN. Hacia finales de la década de los sesenta se tiene ya el convencimiento de que la especie humana está expuesta a un número creciente de compuestos químicos, que pueden tener un efecto mutagénico, con el consiguiente peligro para su salud y la de sus descendientes.

Como resultado, se sugiere la conveniencia de incluir los ensayos sobre la mutagenicidad de las sustancias químicas entre las pruebas necesarias para su evaluación toxicológica. El problema de los posibles efectos mutagénicos de los productos químicos conduce a la creación en el año 1969 de la Environmental Mutagen Society (EMS) en los Estados Unidos, y un año más tarde de la European Environmental Mutagen Society (EEMS). Por otra parte, también a partir de la década de los setenta se elaboraron guías nacionales sobre protocolos de ensayos de mutagenicidad, y hoy día no es posible registrar un nuevo medicamento, aditivo alimentario, etc., o ni siquiera transportar un compuesto químico de uso industrial a través de los países industrializados, sin disponer de los datos básicos sobre su mutagenicidad.

En un principio, fue considerado como objetivo primario de la Toxicología genética la estimación del riesgo de mutación para las células reproductoras, pero al ponerse de manifiesto en la década siguiente la relación entre la mutagenicidad de algunas sustancias y sus efectos sobre el desarrollo de tumores,

adquiere también relevancia un segundo objetivo: la predicción del riesgo de carcinogenicidad de productos químicos mediante la evaluación de su mutagenicidad.

Dos fueron los factores que impulsaron el rápido desarrollo de la Toxicología genética en la década de los setenta: disponer de bacterias genéticamente definidas con mutaciones en genes particulares y el empleo de sistemas de activación metabólica *in vitro*, que permitió la obtención de metabolitos electrofílicos reactivos con el ADN. Los primeros estudios publicados por Ames demostraban que un elevado porcentaje, entre el 60 y el 90% de las sustancias identificadas en experiencias con animales como carcinogénicas, se comportaban así mismo como agentes mutágenos en los sistemas bacterianos.

La confirmación experimental del papel de la mutación en el desarrollo del proceso canceroso se produjo en la década de los ochenta con el descubrimiento de los oncogenes derivados de proto-oncogenes mutados. No obstante, hoy día se sabe que, si bien la mayoría de los compuestos químicos carcinogénicos son también mutagénicos, los denominados *carcinógenos genotóxicos*, algunos otros considerados como *carcinógenos no genotóxicos o epigenéticos* actúan por mecanismos distintos.

Mutagénesis

La mutagénesis es el proceso tóxico por el cual algunos xenobióticos son capaces de inducir una mutación, o cambio, en la secuencia normal de los pares de bases que caracterizan la estructura de cada molécula de ADN. Esta mutación puede resultar *espontánea*, en cuanto consecuencia de un error en la replicación o reparación del ADN; sin embargo, también puede ser *inducida* por las actividades de agentes físicos o químicos, representados estos últimos por moléculas de xenobióticos que han penetrado en el organismo vivo.

Muchos compuestos electrofílicos pueden formar enlaces covalentes con la molécula del ADN para dar lugar a lo que se conoce con el nombre de *aducto* (Fig. 6.1). Los aductos se pueden definir, por lo tanto, como bases del ADN enlazadas a grupos químicos añadidos, no asociadas con las funciones fisiológicas del ADN. Los aductos no son propiamente mutaciones; son lesiones en el ADN que en todo caso pueden ser premutagénicas. No todos los aductos tienen las mismas consecuencias fisiológicas; mientras que algunos parecen no interferir con las funciones normales del ADN o son reparados rápidamente, otros en cambio son mutagénicos e, incluso, pueden ser letales.

Los compuestos químicos electrofílicos, o que dan lugar a metabolitos electrofílicos mediante procesos de biotransformación, forman fácilmente aductos, unas veces de pequeño tamaño debido a la adición de grupos metilo o etilo, como en el caso de los compuestos alquilantes (mostazas nitrogenadas), y otras

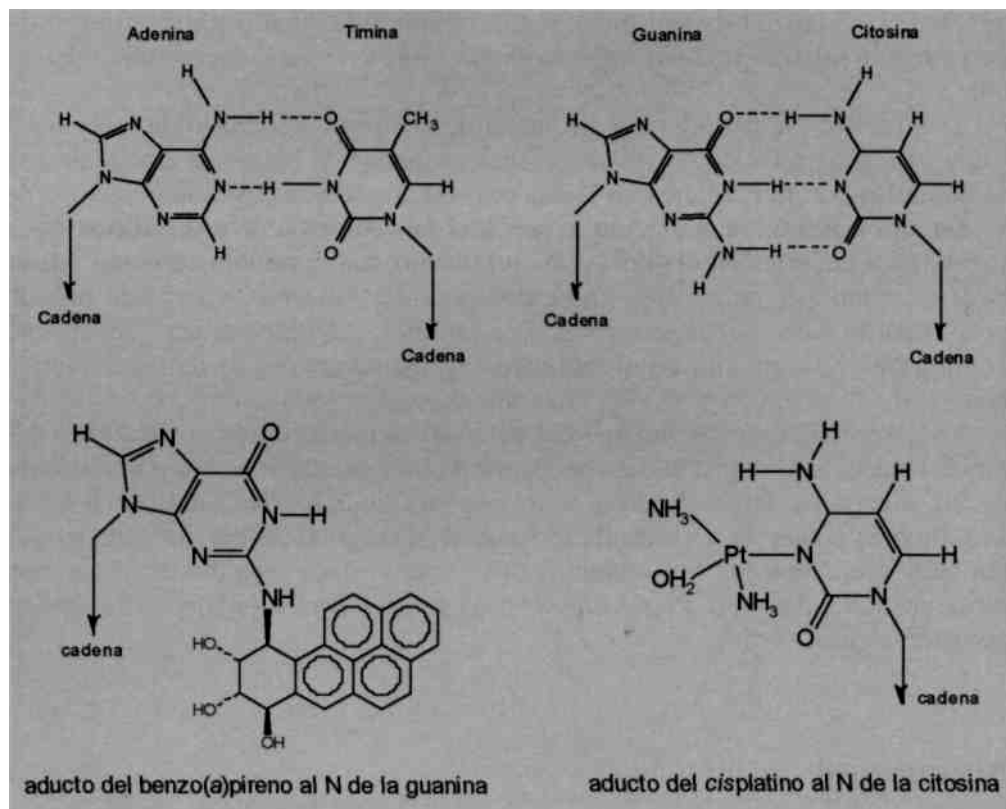


Figura 6.1. *Unión covalente de dos compuestos químicos a las bases nitrogenadas del ADN.*

por el contrario, pueden ser voluminosos al intervenir heterociclos con varios anillos, como aflatoxina B1, benzo(a)pireno, etc.

Con frecuencia, la posición de la base sobre la que se enlaza puede ser específica de cada xenobiótico. También van a ser diferentes las clases de mutaciones inducidas por cada uno de ellos, al diferir en las posiciones de enlace en el ADN elegidas por cada agente mutágeno, así como en las propiedades de las alteraciones ocasionadas. Si el compuesto químico se fija sobre los átomos de O o N implicados en el emparejamiento de las bases, y este aducto sobre el ADN no es reparado, se puede producir una *sustitución de base*. La base más vulnerable es la guanina, que puede formar aductos en varios de sus átomos (N7, C8, O6). Así mismo, los aductos pueden formar enlaces entre bases adyacentes de la misma hebra (*enlaces cruzados intracatenarios*), o entre hebras distintas (*enlaces cruzados intercatenarios*), que pueden afectar al proceso de replicación del ADN.

Un claro ejemplo es el de los agentes alquilantes monofuncionales, que actúan sobre zonas específicas del ADN con consecuencias diversas: la base afe-

tada por el grupo alquil puede continuar con su propia especificidad para formar emparejamiento con la base correspondiente, o bien puede haber sufrido alguna alteración en dicha tendencia. En este sentido, se sabe que la guanina actúa con normalidad, emparejándose con la citosina, cuando el grupo alquil se enlaza sobre el átomo de N de la posición 7, mientras que se empareja con la timina cuando el enlace tienen lugar en el átomo de O situado en posición 6.

En otros casos, la mutación aparece como consecuencia de alteraciones secundarias en la molécula del ADN, en cuanto que el aducto formado puede debilitar el enlace de su base con la desoxirribosa y estimular de este modo la *pérdida de la base*.

También los xenobióticos pueden dar lugar a mutaciones a través de mecanismos indirectos, como puede ser la alteración del sistema celular de reparación del ADN. Es normal que las células dispongan de mecanismos reparadores de las alteraciones espontáneas que ocurren sobre el ADN, unas veces por una acción directa capaz de hacer reversible la aparición del daño, otras veces por una escisión que separa y corrige las bases incorrectas o dañadas. Sin embargo, las perturbaciones que provocan algunos xenobióticos pueden afectar a este mecanismo reparador y, por consiguiente, pueden dejar sin rectificar al material genético afectado.

A menudo, la estructura química de un xenobiótico puede servir de primera indicación acerca de una posible actividad mutagénica; es decir, los agentes mutágenos pueden contener grupos químicos considerados como *alertas estructurales* de su mutagenicidad. Al ser zonas potencialmente electrofílicas sugieren la posibilidad de reaccionar con zonas nucleofílicas del ADN, con la consiguiente capacidad de provocar mutaciones. Varios son los grupos químicos que han sido identificados como posibles alertas estructurales:

- los alquiléster del ácido sulfónico,
- los grupos nitro, tanto aromáticos, como alifáticos,
- los grupos azo aromáticos,
- los grupos mono- y di-alkil- aldehidos,
- los N-metil derivados,
- las N-cloraminas,
- las propiolactonas,
- los carbamatos, etc.

No obstante, siempre resulta conveniente realizar una comprobación experimental, porque existen factores que pueden modificar esa mutagenicidad potencial: un impedimento estérico de algún sustituyente aportado por el metabolismo del xenobiótico, cierta facilidad de excreción, etc.

Asimismo, la ausencia de alertas estructurales no exime de la posibilidad de una actividad mutagénica, estimulada por algunos tipos de mecanismos que, como la formación de radicales libres, provocan cambios oxidativos en el ADN.

Tipos de efectos mutagénicos

Existen diversos tipos de modificaciones genéticas que, en función de su tamaño y de la variación fenotípica a que dan lugar, pueden ser detectadas mediante diversas técnicas: citogenéticas, microbiológicas, moleculares de secuenciación del ADN, etc.

Las mutaciones pueden reunirse en dos grandes grupos: mutaciones génicas que son de pequeño tamaño, y mutaciones cromosómicas, que son de gran tamaño y por lo tanto, citológicamente visibles (Fig. 6.2).

1. *Mutaciones génicas*: son de pequeño tamaño porque sólo afectan a uno o varios de los pares de base del ADN. No suelen interferir en el proceso de la mitosis o de la meiosis, a no ser que el gen afectado sea alguno de los que codifican proteínas que desarrollan funciones en esos procesos.

Dentro de este grupo se han descrito dos tipos de alteraciones:

- a) *Por sustitución* de una base por otra, de acuerdo con dos modalidades: cuando una base púrica o purimidínica se sustituye por otra, se trata de una *transición*; en el caso de ser sustituida una base púrica por otra pirimidínica, o viceversa, se habla de una *transversión* (Tabla 6.1). Tales cambios pueden tener distintas consecuencias fenotípicas y se traducen en tres variedades de mutaciones:
- *Silenciosa*, cuando cambia el triplete pero no el aminoácido a incorporar y, por lo tanto, no se traducen en una modificación de la proteína codificada por el gen.

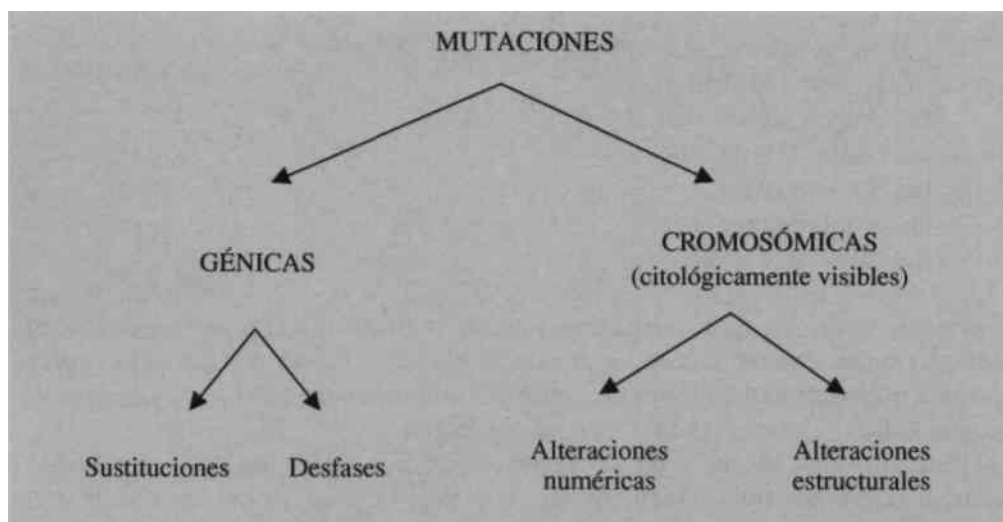


Figura 6.2. *Tipos de mutaciones.*

Tabla 6.1. Posibles sustituciones

Transiciones	AT ↔ GC
	TA ↔ CG
Transversiones	AT ↔ CG
	AT ↔ TA
	GC ↔ CG
	GC ↔ TA

- *Errónea*, cuando cambia el triplete de tal manera que se inserta un nuevo aminoácido en la cadena polipeptídica. La nueva proteína formada puede tener unas propiedades muy alteradas si este cambio ocurre en un punto próximo al centro activo de la enzima, o bien afecta seriamente su estructura tridimensional. En este caso, se va a producir un cambio o una reducción de la función proteica que, a su vez, se va a traducir en un cambio fenotípico de las células afectadas.
 - *Sin sentido*, cuando el triplete se convierte en un codón terminador, por lo cual el polipéptido resultante será más corto que el normal y, por consiguiente, es muy probable que sea inactivo.
- b) *Desfases*, en los que se produce la pérdida o adición de una o varias bases, por lo que a partir de ese punto cambia la pauta de lectura en la transcripción del ADN. Estas mutaciones suelen tener un efecto importante en el polipéptido codificado por el gen, ya que a partir del punto de inserción o pérdida de la(s) base(s), la mayoría de los aminoácidos que se incorporen serán distintos a los de la cadena polipeptídica original. Además, a menudo puede aparecer también un codón terminador, que dará lugar a polipéptidos cortos e inactivos. Estos cambios en la cadena polipeptídica se traducen así mismo en pérdida o disminución de la función proteica y, por consiguiente, cambios en el fenotipo de las células afectadas.

Ambos tipos de mutaciones ocasionales ocurren de modo espontáneo, aunque también pueden ser inducidas por radiaciones o por sustancias químicas. Los mecanismos moleculares que dan lugar a las mutaciones por sustitución y a las mutaciones por desfase parecen que son distintos; sin embargo, vienen a ser semejantes los riesgos potenciales asociados a la actividad de mutágenos capaces de inducir estas mutaciones.

Las mutaciones *génicas* son de naturaleza reversible, es decir, también puede acaecer el mismo fenómeno en un sentido inverso y restituirse la secuencia normal de bases; es lo que se conoce como *retromutación*. Este hecho constituye el fundamento de muchos ensayos para detectar mutaciones génicas, porque lo detectado por los ensayos de mutagenicidad son las retromutaciones y los cambios en el fenotipo a que dan lugar las mutaciones ocasionales.

Algunas veces, la mutación en un gen puede ser corregida por una segunda mutación en otro gen distinto, que puede estar alejado del primero o, incluso, situado en un cromosoma distinto; en este caso, se suprime el efecto de la primera mutación y el fenómeno se denomina *mutación supresora*. Se ha encontrado que la mayoría de estas mutaciones supresoras afectan a genes que codifican ARN de transferencia (ARNt). Normalmente la mutación da lugar a un cambio en la secuencia del anticodón del ARN (Fig. 6.3).

2. *Mutaciones cromosómicas*: son cambios que afectan a grandes fragmentos de ADN que pueden contener cientos, o miles, de pares de bases e incluso cromosomas enteros o guarniciones cromosómicas completas. También se denominan *aberraciones cromosómicas* y pueden ser detectadas con el microscopio óptico, aplicando las técnicas citogenéticas clásicas (Tabla 6.2). Dentro de este grupo se distinguen dos variedades:

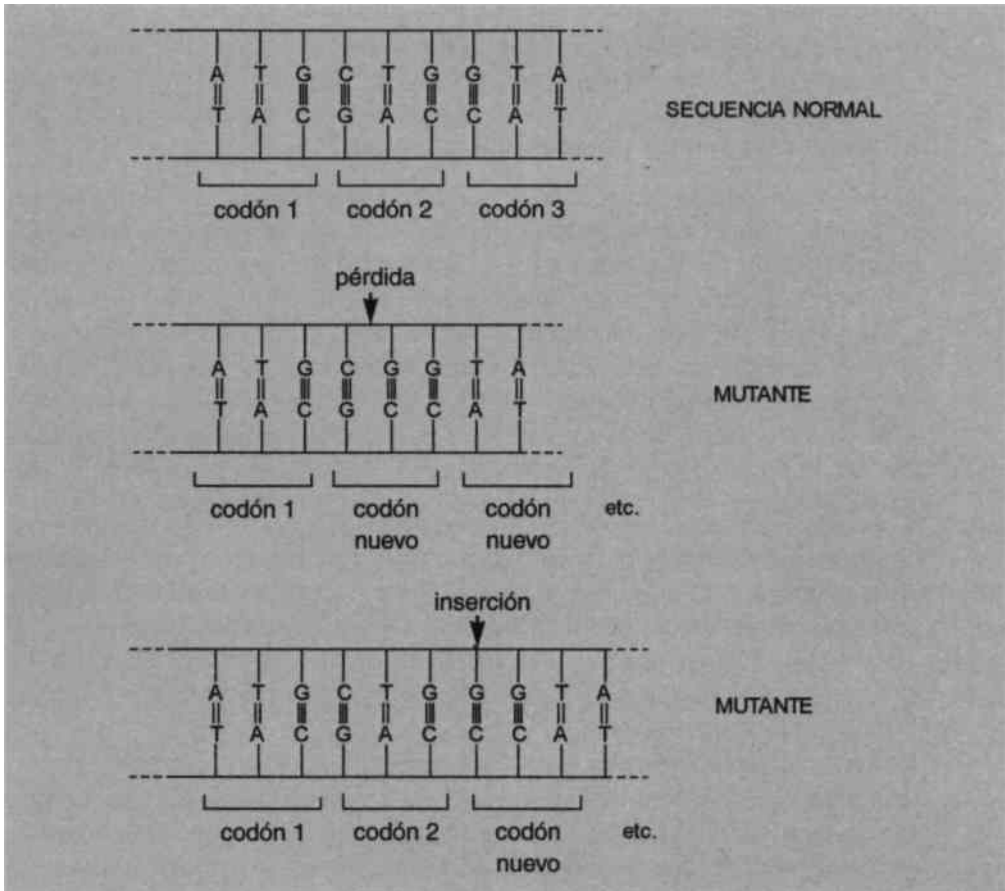


Figura 6.3. *Mutaciones por desfase.*

Tabla 6.2. **Tipos de alteraciones cromosómicas**

Numéricas	Aneuploidías
	<i>Monosomías</i> (síndrome de Tumer) <i>Trisomías</i> (síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Patau, síndrome de Edward)
	Poliploidías
Estructurales	Deleciones (síndrome del maullido de gato: deleción cr.5)
	Duplicaciones
	Inversiones
	Translocaciones

- a) *Numéricas*, que suponen la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas enteros, producidas como consecuencia de fallos en el proceso de división celular. Pueden dar lugar a células *aneuploides* y *poliploides*, es decir, células con un número de cromosomas diferente al normal de su especie. Se denominan *aneuploides* cuando han perdido o ganado algunos de sus cromosomas y se llaman *poliploides* cuando el cambio afecta a una serie o guarnición cromosómica completa.

Las aneuploidías más frecuentes son las *trisomías* (cuando un cromosoma está triplicado en el cariotipo) y *monosomías* (cuando un cromosoma está en dosis sencilla en el cariotipo). Cuando las dos copias de un cromosoma en particular emigran a uno sólo de los polos anafásicos, mientras que el otro no recibe copia alguna, se dice que se ha producido un fenómeno de *no-disyunción*, que puede dar lugar a la aparición de gametos desequilibrados y cigotos trisómicos o monosómicos. Las trisomías o monosomías de cromosomas grandes pueden conducir a una muerte embrionaria temprana, mientras que las trisomías de cromosomas pequeños, si bien son compatibles con la vida, afectan a la salud de la persona portadora de dicha alteración. Por ejemplo, el síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Patau (trisomía 13), síndrome de Edward (trisomía 18). También las aneuploidías de cromosomas X son compatibles con la vida, síndrome de Klinefelter (47, XXY), síndrome de Turner (45, XO). En cambio, las poliploidías son incompatibles con la vida.

- b) *Estructurales*, que suponen la rotura de una de las dos cromátidas, y por lo tanto de las dos hebras de ADN presentes en una cromátida. Pueden corresponder a dos tipos: *cromosómico* o *cromatídico*, según que se vean afectadas las dos cromátidas o una de ellas. Ambos tipos suelen ocurrir por los efectos de las radiaciones, mientras que los xenobióticos solamente suelen provocar alteraciones cromatídicas S-dependientes, aunque cabe que se den algunas excepciones.

No se conoce muy bien cómo los agentes mutágenos pueden producir roturas en el ADN, aunque se sabe que algunas lesiones en el ADN que no suponen una discontinuidad del mismo pueden ocasionar roturas, como consecuencia de interferir con el proceso normal de su replicación.

En los organismos haploides y en los procariotas, las roturas del ADN suelen ser letales, pero no así en los organismos eucariotas diploides, en los que cabe tres posibilidades:

- las roturas cromosómicas pueden ser reparadas y, en ese caso, no habría lesión citogenética detectable;
- pueden permanecer en la célula, dando lugar a un cromosoma roto y un fragmento cromosómico detectable al microscopio, que puede producir la muerte celular en las siguientes divisiones celulares;
- ocurre la unión de los fragmentos en otro orden distinto del original, dando lugar a una reordenación cromosómica diferente, también detectable al microscopio óptico.

Existen distintos tipos de alteraciones estructurales visibles al microscopio:

- *Deleciones y deficiencias*: tienen lugar por la rotura de una cromátida y pérdida del fragmento terminal, o bien cuando en la misma cromátida surgen dos roturas próximas y se unen los dos extremos del cromosoma, desplazándose la porción cromosómica que queda entre las dos roturas. Probablemente, el fragmento de cromátida separado se pierde en la siguiente división.
- *Duplicaciones*: se producen por repetición de secuencias de ADN, como es el caso de repetición de tripletes propia de la distrofia muscular miotónica.
- *Inversiones*: ocurren cuando se producen dos roturas en la misma cromátida y el fragmento de ADN que queda entre ambas se reinserta en el mismo lugar, pero en sentido opuesto al original. Es posible que esta alteración estructural no tenga repercusión para la célula, pero sí puede dar lugar a la aparición de gametos desequilibrados en la meiosis.
- *Translocaciones recíprocas*: suceden como consecuencia de la rotura e intercambio de segmentos cromosómicos entre cromosomas distintos. Dependiendo de la posición de los centrómeros en los cromosomas reordenados, se pueden dar intercambios asimétricos o simétricos y fusiones céntricas. Este es el origen de algunas trisomías 21.

Cuando la alteración estructural se mantiene en la célula en la que se ha producido y se transmite a las células hijas, como por ejemplo un cromosoma delecionado o portador de una inversión, se trata de una alteración cromosómica estructural *estable*. Por el contrario, cuando se trata de alteraciones, que no pueden ser transmitidas inalteradas a las células hijas, tales como fragmentos acéntricos, cromosomas anulares o cromosomas dicéntricos se habla de alteración cromosómica estructural *inestable*.

Aunque existen agentes mutagénicos que son capaces de inducir todos los efectos citados anteriormente, sin embargo la mayoría de ellos presentan cierto grado de especificidad. En la práctica, resulta bastante útil distinguir la inducción de mutaciones génicas de las mutaciones cromosómicas, porque sus objetivos dianas celulares son diferentes: en las primeras son las moléculas del ADN, mientras que en las segundas es frecuente que sean los aparatos mitóticos y meióticos.

Mecanismos moleculares

La biología molecular ha proporcionado nuevas metodologías que han resultado muy útiles para el estudio del fenómeno mutagénico, hasta el punto que la investigación moderna de las mutaciones combina los estudios genéticos con el análisis molecular, centrado en el análisis directo de los ácidos nucleicos. En consecuencia, ha sido posible establecer tres tipos de mecanismos moleculares en cuanto responsables de las mutaciones:

Sustitución de pares de bases

Este mecanismo puede adoptar cuatro variantes:

a) *Modificaciones espontáneas de las bases*

Se trata de uno de los mecanismos que pueden dar lugar a las mutaciones espontáneas. Aunque las bases del ADN son químicamente estables, es posible que bajo algunas condiciones fisiológicas se produzca alguna pequeña alteración de las mismas, entre las que cabe destacar las siguientes:

- *Cambios tautoméricos*, del tipo ceto-enol del 5-bromouracilo.
- *Desanimación espontánea* de la citosina, para dar lugar a la formación de uracilo
- *Pérdidas espontáneas de purinas y pirimidinas*, que pueden ocasionar sustituciones de las bases, con la incorporación automática de adenina (Fig. 6.4), y roturas de hebra.

b) *Unión de compuestos químicos a las bases*

Es el mecanismo habitual por el que los xenobióticos producen mutaciones y tiene lugar mediante la incorporación de grupos químicos a las bases del ADN a través de enlaces covalentes; puede ocurrir tanto una *alquilación* como la formación de *aductos voluminosos*. En el primer caso se incorporan grupos alquilo de pequeño tamaño, mientras que en el segundo son compuestos electrofílicos grandes los que se enlazan a las bases del ADN.

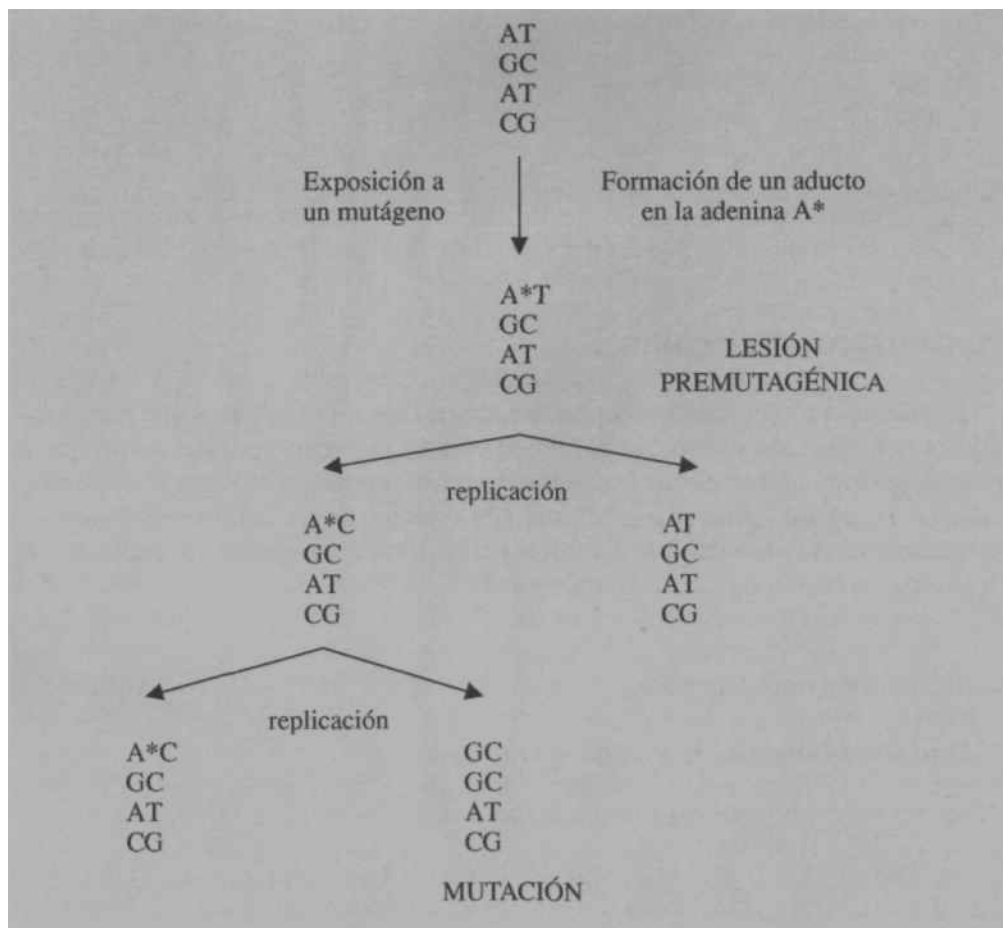


Figura 6.4. *Mecanismo de sustitución de una base por emparejamiento erróneo.*

Los compuestos *alquilantes* constituyen el grupo mayoritario entre los agentes mutagénicos conocidos: gas mostaza, mostaza nitrogenada, nitrosoureas, alquilsulfonatos, epóxidos, etc. Por regla general actúan sobre el átomo de N en posición 7 de la guanina, aunque en menor proporción pueden hacerlo sobre el átomo de N en posición 3 de la adenina o sobre el átomo de O en posición 6 de la guanina. De modo predominante, la guanina se encuentra en la molécula del ADN bajo la forma ceto y se empareja con la citosina, formando puentes de hidrógeno; pero cuando adquiere un grupo alquil en el N₇ se favorece la forma enólica, que se empareja mejor con la timina.

Todos estos aductos, tanto los de pequeño tamaño como los voluminosos, son específicos para cada compuesto y dan lugar a mutaciones también específicas. En ellos, la mutación se puede producir bien por un *emparejamiento erróneo* de la base, bien por una *pérdida* de la misma.

c) Incorporación de análogos de bases

Constituye un mecanismo de importancia experimental al servir de herramienta para inducir mutaciones. Así, durante la replicación del ADN se pueden incorporar algunos análogos en lugar de las bases correctas: el 5-bromouracilo es un análogo de la timina y el 2-aminopurina lo es de la adenina.

Bajo una situación carencial de timina, puede incorporarse en su lugar su análogo 5-bromouracilo, que también se empareja con la adenina; sin embargo, este análogo no es tan estable como su base y fácilmente puede cambiar de la forma ceto a la enólica, en cuyo caso manifiesta preferencia para emparejarse con la guanina. Esta será la base que portará la cadena del ADN, siempre que esta transición coincida justamente con el momento de la replicación. Como en el siguiente paso la guanina formará par con su correspondiente citosina, el resultado final será una transición del par AT al par GC. Esto quiere decir que después de dos rondas de replicación, el cambio puede quedar fijado en el ADN como una mutación que no puede ser reparada. El que esa mutación se exprese o no, dependerá de la naturaleza de la misma.

d) Alteración química de las bases normales

También se trata de otro mecanismo con importancia experimental. Algunos compuestos químicos, como el *ácido nitroso* o la *hidroxilamina*, pueden alterar las bases normales del ADN.

Un tratamiento con ácido nitroso provoca una desaminación de la adenina, al reemplazar el grupo amino, por un oxígeno y le convierte en hipoxantina. En la replicación del ADN, la hipoxantina se empareja con preferencia a la citosina y en la siguiente ronda de replicación será incorporada la base guanina, por lo que se habrá producido una transición del par adenina-timina al par citosina-guanina. También el ácido nitroso desamina a la citosina, convirtiéndola en uracilo, que se empareja con la adenina, por lo que al final aparecerá la transición del par CG al par AT.

La hidroxilamina sólo reacciona con las pirimidinas. Puede transformar el grupo amino de la citosina en el grupo hidroxilamina ($=N.OH$), con lo que aparece la base modificada N_4 -hidroxilcitosina, que se une preferentemente a la adenina, por lo que ocasiona la transición del par CG al par TA.

Desfases

La pérdida o adición de bases puede ocurrir de una manera espontánea durante la replicación o la reparación del ADN, pero también puede ser inducida por compuestos químicos. Las sustancias que causan mutaciones por *desfase* son por lo general compuestos voluminosos: pueden formar *aductos* con bases del ADN, o bien pueden *intercalarse* en el mismo. Los compuestos típicos intercalantes que dan lugar a mutaciones, son las acridinas, representadas muy bien por la proflavina.

Alteraciones cromosómicas

Las *alteraciones cromosómicas* inducidas por sustancias químicas pueden ser tanto estructurales como numéricas. Aquellos compuestos que inducen alteraciones estructurales se denominan *clastógenos* o *agentes clastogénicos*. En estos casos, las alteraciones pueden ser de dos tipos: *cromatídicas*, («gaps» o huecos, roturas, deleciones o intercambios), y *cromosómicas* (inversiones, etc.). Muchas de estas alteraciones resultan letales para la célula. En cambio, los que interfieren con la división celular pueden inducir alteraciones numéricas y reciben el nombre de *aneugénicos*. Muchos de ellos son inhibidores del huso acromático, como por ejemplo colchicina, vincristina, taxol, etc.

Impacto sobre la salud humana

Hoy día, resulta evidente el impacto que las mutaciones y las alteraciones cromosómicas tienen sobre la salud humana, sobre todo al ser conocido el papel que los desórdenes genéticos desempeñan en el desarrollo de algunas enfermedades. Toda mutación producida en una célula germinal puede ser transmitida a la descendencia, mientras que si se produce en una célula somática puede ser origen de diversos trastornos, entre los que se encuentran las neoplasias y, desde un punto de vista teórico, la teratogénesis (Fig. 6.5).

Muchas enfermedades humanas se heredan de acuerdo con un patrón de herencia mendeliana simple. Entre ellas pueden ser destacadas como ejemplo las siguientes:

- *Autosómica dominante*: enanismo, corea de Huntington.
- *Autosómica recesiva*: fibrosis quística, fenilcetonuria.
- *Ligada al sexo*: hemofilia.

Las mutaciones génicas también influyen en el desarrollo de otras enfermedades que presentan un componente genético, pero con una etiología bastante compleja.

También han sido descritos numerosos casos de *síndromes* que son debidos a alteraciones cromosómicas, surgidas en su mayor parte *de novo*: síndrome de Down o trisomía 21; síndrome del maullido de gato o deleción del cromosoma 5; síndrome de Patau o trisomía 13; síndrome de Edwards o trisomía 18, etc.

El estudio molecular de oncogenes y genes supresores ha puesto de manifiesto la importancia de la mutación en el desarrollo del cáncer, sobre todo en sus primeras etapas de iniciación, y ha confirmado la existencia de una asociación entre la presencia de una mutación y el desarrollo de muchos tipos de cáncer, suposición fundamentada en las siguientes observaciones:

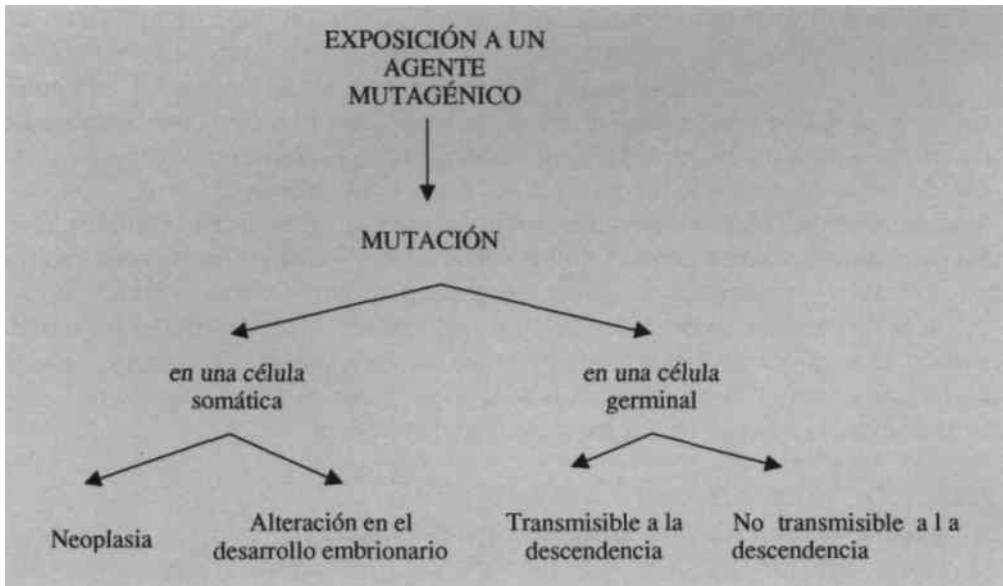


Figura 6.5. *Posibles consecuencias de la mutación.*

1. Alta correlación entre la mutagenicidad y la carcinogenicidad de diversos compuestos químicos.
2. Elevado riesgo de padecer cáncer por aquellas personas que manifiestan un padecimiento de síndromes de inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Bloom y la anemia de Fanconi, o una deficiencia en la reparación del ADN, como ocurre en el xeroderma pigmentoso.
3. Presencia de alteraciones cromosómicas tanto en las leucemias como en los tumores sólidos.

Evaluación de la mutagenicidad

Se han descrito varias decenas de ensayos de mutagenicidad que utilizan organismos diversos (las bacterias *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, la mosca *Drosophila melanogaster*, la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, roedores, células de mamífero en cultivo, etc.), mediante los cuales se pueden detectar distintos tipos de mutaciones. De acuerdo con éste último criterio cabe distinguir tres categorías de ensayos:

1. Ensayos que detectan mutaciones génicas.
2. Ensayos que detectan alteraciones cromosómicas.
3. Ensayos que detectan interacción con el ADN.

Debido a la variedad de mutaciones que se pueden producir en el ADN, ningún ensayo tiene capacidad, por sí sólo, para detectar todos los tipos de mutaciones posibles. Por esta razón, para evaluar el potencial mutagénico de un compuesto químico, se utiliza una *batería de ensayos*, que normalmente se aplica de una manera jerarquizada; es decir, del más sencillo al más complicado, en función de los resultados que progresivamente se vayan obteniendo.

Generalmente, esta batería incluye no menos de tres ensayos: uno *in vitro* que detecta mutaciones génicas en bacterias, otro *in vitro* para alteraciones cromosómicas en células de mamífero en cultivo, y uno *in vivo* en rata o ratón (Tabla 6.3). Para los ensayos *in vitro*, que se realizan con bacterias o células en cultivo, se requiere un sistema exógeno de activación metabólica con el fin de reproducir al máximo las condiciones de biotransformación a las que un compuesto químico se expone dentro de un organismo vivo.

Activación metabólica de compuestos genotóxicos

Algunos compuestos químicos son intrínsecamente reactivos, es decir, pueden formar aductos con el ADN directamente, ya sea con el ADN aislado en un tubo de ensayo o con el ADN encerrado en una célula viva. Se trata de compuestos electrofílicos en mayor o menor medida, que reaccionan con los centros nucleofílicos presentes en el ADN, como pueden ser los epóxidos, N-óxidos aromáticos, alquilnitrosoureas, etc. Se les considera compuestos genotóxicos directos.

Otros compuestos, en cambio, necesitan de una activación metabólica antes de ser genéticamente activos. Son los compuestos genotóxicos indirectos, que *per se* carecen de carácter electrofílico, pero que se convierten en metabolitos electrofílicos por la acción de algunos sistemas enzimáticos presentes en las células de mamífero, fundamentalmente las oxigenasas de función mixta o siste-

Tabla 6.3. Ensayos de genotoxicidad

I. Ensayos básicos

Ensayo de mutaciones génicas en bacterias *Salmonella typhimurium* (test de Ames) y *Escherichia coli*.

Ensayo de alteraciones cromosómicas en células de mamífero en cultivo

Ensayo de alteraciones cromosómicas o micronucleos en médula ósea de roedor

II. Otros ensayos

Ensayo de mutaciones génicas en células de mamífero en cultivo

Ensayo del letal recesivo ligado el sexo en *Drosophila*

Ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos

Ensayo de mutaciones en células germinales

Ensayo de recombinación mitótica en levadura

Ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas

ma citocromo P₄₅₀, localizado en la superficie del retículo endoplásmico de las células hepáticas principalmente, aunque también en otros tejidos. Estas enzimas añaden un átomo de oxígeno a la molécula y convierten compuestos liposolubles y no polares en otros más polares e hidrosolubles, que pueden sufrir otras reacciones posteriores y/o conjugarse con moléculas endógenas antes de ser excretados. Esta actividad celular, cuyo principal objetivo es facilitar la eliminación de xenobióticos, da lugar en ocasiones a la aparición de moléculas electrofílicas y reactivas con el ADN.

Las preparaciones enzimáticas activas se obtienen con facilidad a partir de tejidos ricos en este sistema enzimático, como por ejemplo el hígado. El sobrenadante, separado por centrifugación del tejido hepático homogeneizado se conoce como fracción S9, y contiene las membranas del retículo endoplásmico, los ribosomas, las enzimas solubles y los cofactores endógenos. Como las enzimas citocromo P₄₅₀ son inducibles, se pueden obtener fracciones S9 con actividad metabólica alta tratando los animales con algunos compuestos químicos, que estimulan la síntesis hepática de monooxigenasas: fenobarbital, 3-metilcolantreno o Aroclor 1254 (mezcla de bifenilos policlorados), quizás el inductor más empleado para la preparación de las fracciones S9 a utilizar en los ensayos de genotoxicidad.

Determinación del rango de dosis

Los efectos mutagénicos se producen típicamente a dosis subtóxicas, es decir dosis a las cuales no se ve comprometida la viabilidad celular por otros mecanismos distintos a la mutación. Así, una condición previa indispensable para realizar un ensayo de mutagenicidad correctamente, es la elección del rango de dosis que se va a probar. Cuando no se dispone de datos previos orientativos de la toxicidad general del compuesto en el sistema experimental elegido, se debe realizar un ensayo previo de toxicidad en las mismas condiciones en las que se va a llevar a cabo el ensayo principal de mutagenicidad. El rango de dosis para el ensayo de mutagenicidad se elegirá de acuerdo con los datos obtenidos; la dosis más alta deberá ser aquella a la cual se ponga de manifiesto algún signo de toxicidad, sin comprometer totalmente la viabilidad del sistema experimental.

Un factor importante a tener siempre en cuenta es precisamente la solubilidad del compuesto en los medios acuosos en los que se mantienen las bacterias o las células en cultivo, porque en el caso de estar disuelto en disolventes orgánicos pueden precipitar al ser añadidos al medio de cultivo.

Controles

En todos los ensayos de mutagenicidad se incluyen controles negativos y positivos. Al control negativo se le administra el disolvente utilizado para el

compuesto; en determinadas ocasiones, si se utiliza un disolvente nuevo cuyo efecto en el sistema experimental no es conocido, se emplean dos controles negativos, uno sin tratar y otro tratado con el disolvente. Se incluye el control positivo para verificar que el sistema experimental ha funcionado correctamente: se trata de un grupo al que se le administra un compuesto químico a una sola dosis, a la que se tienen garantías de provocar un efecto mutagénico evidente en el sistema experimental elegido.

Los resultados obtenidos, tanto en los controles positivos como negativos, se pueden comparar con un control histórico propio de cada laboratorio, elaborado con los datos de los sucesivos estudios de mutagenicidad realizados.

Umbral de toxicidad

Teóricamente, en el caso de los efectos mutagénicos, se considera que en ocasiones no existe la dosis umbral o dosis sin efecto. Se acepta que incluso a la dosis más baja, existe la posibilidad de que una molécula mutagénica pueda unirse al ADN y, si no es reparada, dar lugar a una mutación. En este caso, se trataría de un proceso aleatorio de suceso único. Si por el contrario, se necesitan varios sucesos para producir un efecto, debido por ejemplo a que se da una reparación correcta del ADN y sólo se produce la mutación cuando los sistemas de reparación están saturados, se tendría un umbral de respuesta, por debajo del cual no se produciría el efecto. La consideración de la existencia o no de una dosis umbral tiene importancia desde el punto de vista de la evaluación del riesgo, ya que la predicción será distinta en uno y otro caso.

No obstante, en la práctica siempre se encuentra una *dosis umbral experimental* que es la dosis a la que aparece el efecto medible. El efecto aumenta proporcionalmente a la dosis hasta un cierto nivel, después del cual decrece debido a la toxicidad. Este umbral de dosis depende de las condiciones experimentales: diana genética, tamaño del experimento, tasa de mutación espontánea, sistemas de reparación presentes y en general, sensibilidad del ensayo de que se trate.

Test de mutaciones génicas en bacterias

Las mutaciones son sucesos raros que ocurren con una frecuencia del orden de uno por cada millón de células. Por lo tanto, aislar por ejemplo seis células mutantes requeriría analizar seis millones de células. Esta ardua tarea se puede obviar mediante técnicas experimentales diseñadas para permitir exclusivamente el crecimiento de las células mutantes. Este es el tipo de técnicas que se utilizan en los ensayos de mutaciones génicas.

El test de mutagenicidad en bacterias más utilizado es el de reversión de estirpes His⁻ de *Salmonella typhimurium*, conocido abreviadamente como test de Ames, por ser Bruce Ames el investigador que lo diseñó y perfeccionó.

Es un ensayo en el que se utilizan cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* auxotrofas para la histidina, es decir incapaces de sintetizar dicho aminoácido y, por lo tanto, de crecer en un medio carente del mismo. Las distintas cepas se diferencian en el gen del operón de la histidina que está mutado, así como en el tipo de mutación que poseen, unas por desfase y otras por sustitución (Tabla 6.4). Estas mutaciones revierten al genotipo normal de manera espontánea con una frecuencia característica de cada estirpe.

Además, estas bacterias tienen otras mutaciones que incrementan su sensibilidad frente a la acción de los compuestos mutagénicos: la *mutación rfa*, que afecta a la estructura del lipopolisacárido constitutivo de la pared bacteriana, por lo que se ve favorecida la entrada en las bacterias de las moléculas de un considerable tamaño, que de otra manera no podrían acceder al ADN; la *mutación uvrB*, delección que incluye un gen que interviene en el sistema de reparación del ADN de la bacteria, y que por consiguiente hace que la reparación del ADN lesionado no se efectúe de manera eficaz en estas cepas; algunas cepas que igualmente incrementan la sensibilidad de estas bacterias a la acción de compuestos mutagénicos, al disponer de la presencia del *plásmido pKM101*, con un gen que interviene en el sistema de reparación propenso al error.

El procedimiento experimental es relativamente sencillo y aparece esquematizado en la Figura 6.6. A un cultivo bacteriano en crecimiento exponencial se le añade el compuesto en estudio y se siembra sobre una placa de medio mínimo que se incuba durante 48 h a 37 °C. Al cabo de este tiempo, las bacterias que han retromutado se habrán dividido el número de veces suficiente como para dar lugar a una colonia bacteriana visible. Si el producto ensayado no induce mutaciones, el número de colonias será aproximadamente igual al de las placas control tratadas con el disolvente, en las que solamente habrán crecido las bacterias surgidas por retromutación espontánea. Si el producto es mutagénico el número de colonias será superior que en las placas control.

En este ensayo siempre se prueban varias dosis del compuesto, con un mínimo de cinco, y se incluyen los correspondientes controles negativos y positivos. El producto debe probarse tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica, con objeto de dilucidar si se trata de un mutágeno directo o depen-

Tabla 6.4. **Mutaciones en estirpes de *Salmonella typhimurium* más utilizadas**

Estirpe bacteriana	Tipo de mutación		Gen mutado
TA97	Desfase	Ganancia CC	hisD
TA98	Desfase	Pérdida C	hisD
TA100	Sustitución	AT → GC (mutado)	hisG
TA102	Sustitución	GC → AT (mutado)	hisG
TA 1537	Desfase	Ganancia CCC	hisC
TA1538	Desfase	Pérdida C	hisD

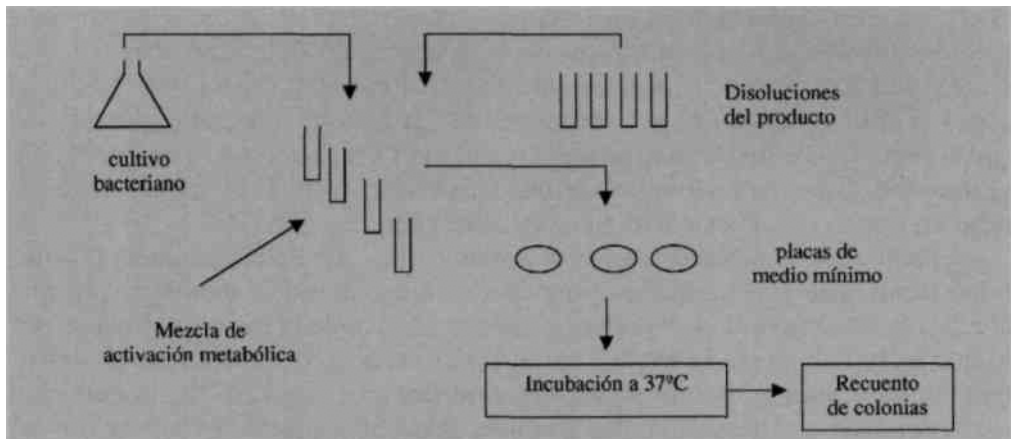


Figura 6.6. *Esquema de ensayo de mutación génica en bacterias.*

diente de activación metabólica. Por otra parte, como cada estirpe es poseedora de una mutación específica, el experimento completo requiere la utilización de al menos cinco estirpes bacterianas distintas.

Se considera que la respuesta es positiva si se cumplen una o las dos condiciones siguientes:

1. Se produce un incremento (como mínimo el doble) en el número de revertientes His^+ respecto del control negativo, a alguna de las concentraciones ensayadas.
2. El número de revertientes His^+ está relacionado estadísticamente con la concentración testada de producto, condición que se verifica mediante un test de regresión.

Test de alteraciones cromosómicas en células de mamífero en cultivo

Se trata de un test *in vitro* para detectar alteraciones cromosómicas, fundamentalmente alteraciones de tipo estructural, ya que el diseño experimental está concebido para analizar metafases de la primera división mitótica tras el tratamiento. Utiliza las técnicas clásicas de citogenética para la obtención del cariotipo.

El ensayo se puede realizar con unas líneas celulares de crecimiento indefinido ya establecidas o con cultivo primario de linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica. En el primer, caso las líneas celulares más recomendables, por estar bien caracterizadas desde el punto de vista citogenético y por haber sido validadas para los ensayos de mutagenicidad, son las CHO, derivadas de ovario de hámster chino, y las V79, derivadas de fibroblastos de pulmón de hámster chino. No obstante, es preferible utilizar cultivo de linfocitos humanos obteni-

dos a partir de sangre de individuos sanos, a la que se le añade fitohemaglutinina para estimular la división de los linfocitos T.

El procedimiento experimental aparece esquematizado en la Figura 6.7. Se inicia el cultivo de sangre total en un medio de cultivo adecuado, que ha sido suplementado con fitohemaglutinina, y se incuba durante 48 horas a 37 °C, tiempo suficiente para que se produzca la estimulación de la división celular. Al cabo de este tiempo, se añade una concentración conocida del compuesto. El tratamiento, que se sitúa alrededor de las dos horas, se realiza en paralelo tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica. Por último, se procede al cosechado de las células, que se someten a un choque hipotónico, para conseguir una buena separación de los cromosomas; después de varios pasos en solución fijadora, para preservar la estructura cromosómica, se realizan las extensiones con los cromosomas metafásicos en los correspondientes portaobjetos. Una vez secas las preparaciones, se tiñen y se montan para poder ser analizadas al microscopio.

Se deben ensayar no menos de tres concentraciones subtóxicas de compuesto, con sus correspondientes controles negativos y positivos. Como mínimo se analizan 200 metafases por concentración y se hace el recuento total de alteraciones, tanto de tipo cromosómico como cromatídico.

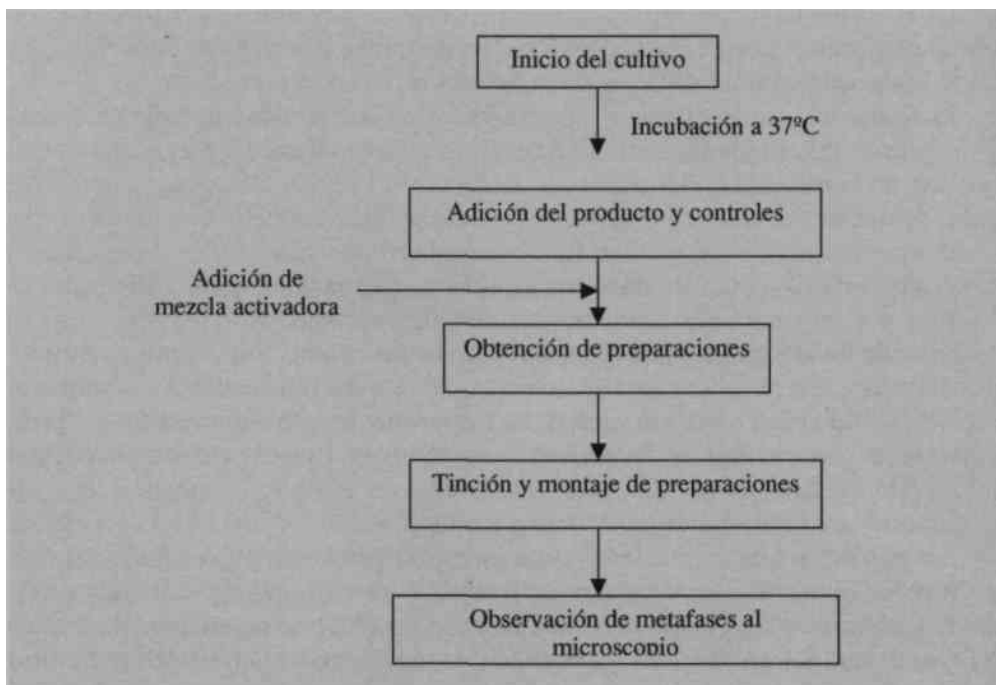


Figura 6.7. *Esquema del ensayo de alteraciones cromosómicas.*

Se considera el resultado positivo si se da una o las dos de las siguientes condiciones:

1. Un incremento estadísticamente significativo en el número de alteraciones cromosómicas respecto del control negativo a alguna de las dosis testadas.
2. Existe una relación entre el número de alteraciones cromosómicas encontradas y las concentraciones de producto ensayadas.

En el caso de necesitar una mayor profundización a nivel molecular acerca del tipo de efecto producido se aplican técnicas más recientes, como por ejemplo la FISH (*fluorescence in situ hybridization*) que, utilizando sondas moleculares específicas de determinadas regiones cromosómicas, permite precisar puntos de roturas, regiones frágiles etc. Cuando lo que se está descartando es una posible actividad clastogénica general, no hace falta recurrir a dichas técnicas.

Test del micronúcleo

El test del micronúcleo es un test *in vivo* que permite evaluar la capacidad de un compuesto para inducir alteraciones cromosómicas, tanto de tipo estructural como numérico. Es un ensayo que se realiza en roedores —ratas o ratones fundamentalmente— y, por lo tanto, como todos los ensayos *in vivo*, tiene la ventaja de que en él se pueden reproducir los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción del tóxico. No obstante, como todos ellos, también tiene la desventaja del problema de la extrapolación interespecífica.

Los micronúcleos se forman a partir de material cromosómico que ha quedado rezagado durante la fase mitótica de disyunción anafásica, en la cual se separan las dos cromátidas hermanas hacia cada uno de los dos polos anafásicos para, posteriormente, dar lugar a las dos células hijas, genéticamente idénticas, resultantes de la división celular. Ese material cromosómico, que no llega a ninguno de los dos polos anafásicos, debido a alguna alteración cromosómica (rotura) o a un malfuncionamiento del aparato mitótico, no queda incluido en ninguno de los dos núcleos que van a constituir las células hijas, y puede formar, por sí sólo, un núcleo de tamaño muy pequeño —un micronúcleo—, perfectamente visible al microscopio óptico. Los micronúcleos están constituidos principalmente por fragmentos acéntricos, pero también algunos cromosomas enteros pueden formar parte de ellos. Mediante este ensayo, se pueden detectar compuestos tanto clastogénicos como aneugénicos.

Los micronúcleos se pueden formar en todo tipo de células de cualquier tejido proliferativo, pero se detectan más fácilmente en aquellas que carecen de núcleo, como son los eritrocitos. Por esta razón, aunque se pueden analizar otros tejidos, el test del micronúcleo se realiza con mayor frecuencia en los eritrocitos de la médula ósea de rata o ratón, en concreto en los eritrocitos inmaduros, inmediatamente después de haber expelido el núcleo, cuando todavía mantienen

una características propiedades de tinción que los diferencian de los eritrocitos maduros.

El procedimiento experimental aparece en la Figura 6.8. Se dispone de tres grupos de animales:

- Un grupo al que se le administra el vehículo,
- Otro grupo al que se le administra la sustancia a ensayar a una dosis sub-tóxica, normalmente la DL_{10} ,
- Un tercer grupo al que se le administra el control positivo.

La vía de administración suele ser aquella que se prevé va a tener lugar en el ser humano, normalmente la oral. Los animales se sacrifican escalonadamente a dos o tres tiempos distintos, entre 24 y 48 horas después del tratamiento y con la médula ósea, que se extrae a partir del fémur de los animales, se realiza el correspondiente frotis sobre un portaobjetos. Posteriormente, las preparaciones se tiñen y se montan para ser analizadas al microscopio, y se recuentan 2.000 eritrocitos por animal. El resultado se considera positivo cuando se obtiene un incremento estadísticamente significativo en el número de micronúcleos encontrados en el grupo tratado respecto del control negativo.

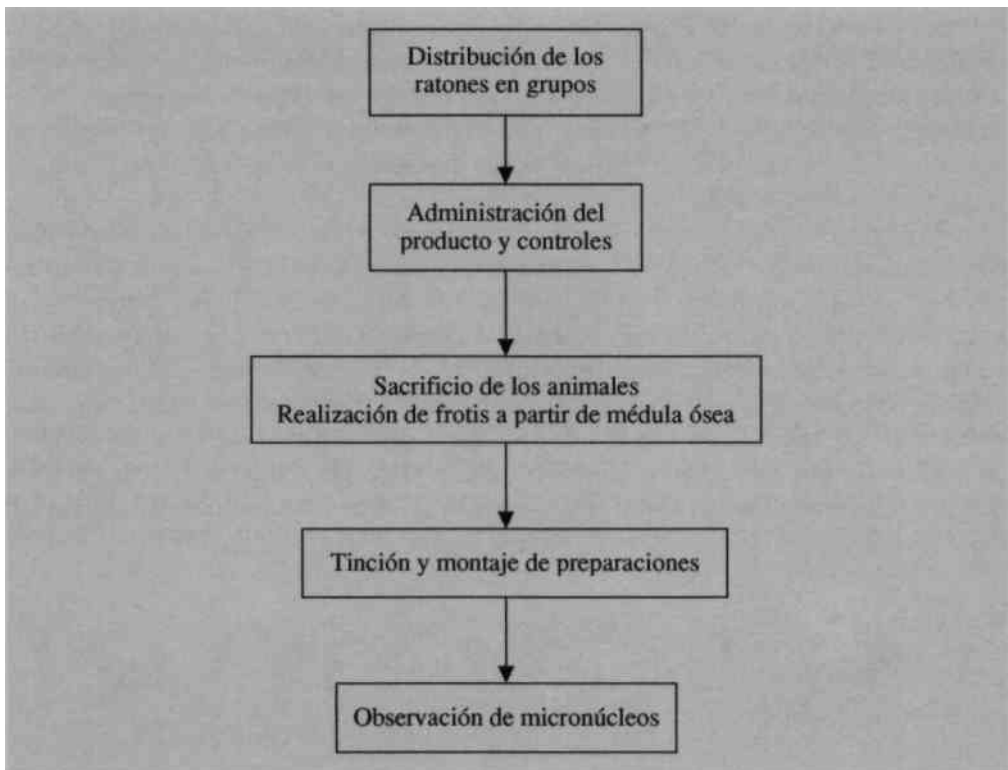


Figura 6.8. *Esquema del ensayo de micronúcleos.*

Modelos transgénicos

Los animales transgénicos son producto de las modernas técnicas de biotecnología que permiten obtener un animal en cuyas células se ha insertado y se expresa un gen de interés, proveniente de otro organismo. Con el objetivo de estudiar la mutagénesis *in vivo*, se han desarrollado diversos modelos transgénicos. De hecho, existen dos modelos en roedores, ya comercializados, con los que se han probado más de 50 compuestos químicos: uno es el sistema *lacI* (BigBlue™) desarrollado tanto en ratones como en ratas, y otro el sistema *lacZ* (Muta™Mouse) desarrollado hasta el momento sólo en ratones. Otros sistemas se encuentran, por el momento, en distintas fases de su desarrollo.

Los ensayos de mutagenicidad que utilizan estos sistemas transgénicos tienen la ventaja de combinar por un lado, lo que es propio de un ensayo *in vivo* como la toxicocinética y metabolismo íntegro, y por otro lo que es propio de un ensayo *in vitro*, es decir un sistema simple de detección microbiana de la mutación, que permite un análisis en profundidad de la misma y además en células obtenidas a partir de distintos tejidos.

En el sistema BigBlue™ los animales portan en todas sus células el gen *lacI* —que codifica para la proteína represora de la transcripción de *lacZ*— y que constituye la diana mutacional para el análisis de la mutación *in vivo*. El vector está representado en la Figura 6.9 e incluye el gen *lacI*, el promotor *lacI*, la secuencia del operador (*lacO*) y el fragmento (*alacZ*). El vector completo tiene una longitud de 45,6 kb y el gen *lacI* comprende 1.080 bases. Después del tratamiento de los roedores transgénicos con el producto químico y de un tiempo de observación que permite la fijación de las mutaciones, se extrae el ADN de los tejidos u órganos relevantes.

El sistema del fago λ sirve como vehículo entre las células eucariotas y procariontes. Cuando el ADN genómico se mezcla con un «extracto empaquetador» del fago λ , una terminasa reconoce y rompe los lugares cos que flanquean el vector por ambos lados, de tal manera que copias únicas de la diana mutacional se empaquetan en partículas de fago infecciosas. Posteriormente, se infecta una cepa de *Escherichia coli* SCS8, deficiente en el fragmento de restricción que contienen los fagos, con ese stock de fagos; una vez que se ha producido la adsorción de los fagos sobre las bacterias, se mezcla con un agar de cobertera que contiene un sustrato (X-gal) cromogénico y se incuba durante toda la noche.

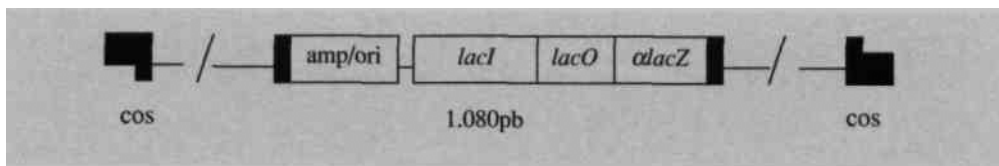


Figura 6.9. Vector incluido en las células de los ratones transgénicos BigBlue.

Las mutaciones en el gen *lacI* se pueden detectar utilizando el gen *lacZ*, que codifica para β -galactosidasa, como marcador.

El extremo amino terminal *alacZ* del vector complementa el extremo carboxiterminal del huésped *E. coli*, lo que da lugar a una β -galactosidasa funcional. Los mutantes *lacI* se detectan coloriméticamente. La unión del represor *lacI* no mutado sobre *lacO* inhibe la interacción de la ARN polimerasa con el promotor y por lo tanto la transcripción del gen *lacZ*. Por lo tanto una mutación en el gen *lacI* puede dar lugar a una proteína represora no funcional que no se una a la secuencia del promotor y que permita la expresión del gen β -galactosidasa. La enzima β -galactosidasa rompe el sustrato cromogénico X-gal y da lugar a una colonia de color azul. La frecuencia de mutación se determina contando el número de colonias azules sobre el total de colonias (Figs. 6.10 y 6.11).

El sistema MutaTMMouse se basa en un principio semejante. Una de las ventajas de estos modelos transgénicos es que permiten el estudio de los distintos órganos y tejidos por separado; así se han analizado los efectos mutagénicos de más de 50 compuestos químicos en hígado, pulmón, mucosa nasal, riñón, colon, vejiga etc. información que tiene un gran valor para dilucidar el mecanismo de genotoxicidad y carcinogenicidad órgano-específica. Además este sistema permite también el estudio de la secuencia del ADN para el análisis del espectro mutacional, que contribuye al estudio de la mutagénesis en dos aspectos: a) proporciona una evidencia adicional de cambios mutagénicos específicos en aquellos casos en los que se obtiene una respuesta débil en conjunto b) identificando las alteraciones específicas en la secuencia de ADN se pueden dilucidar los posibles mecanismos que las han producido.

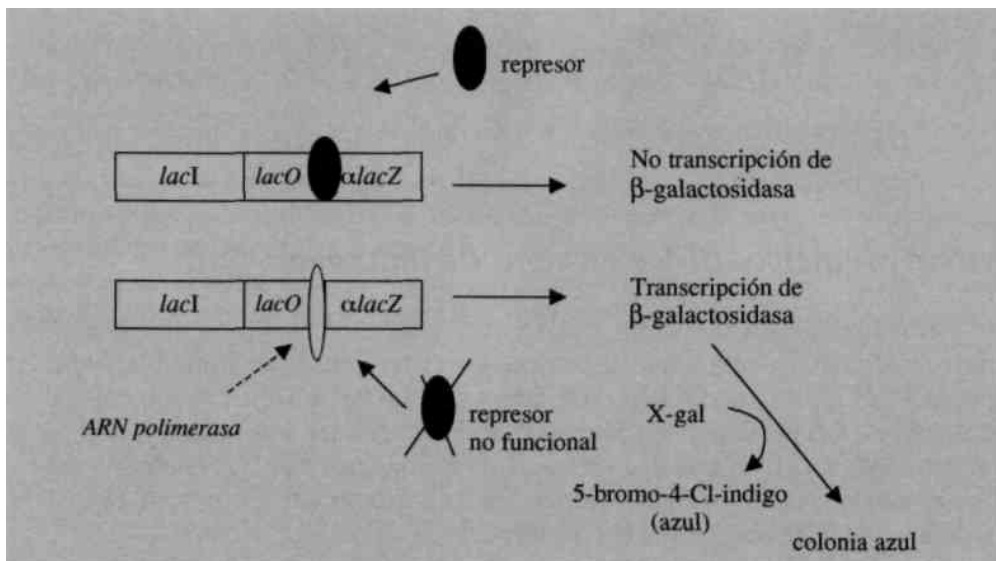


Figura 6.10. *Modelo transgénico BigBlue: fundamento del ensayo.*

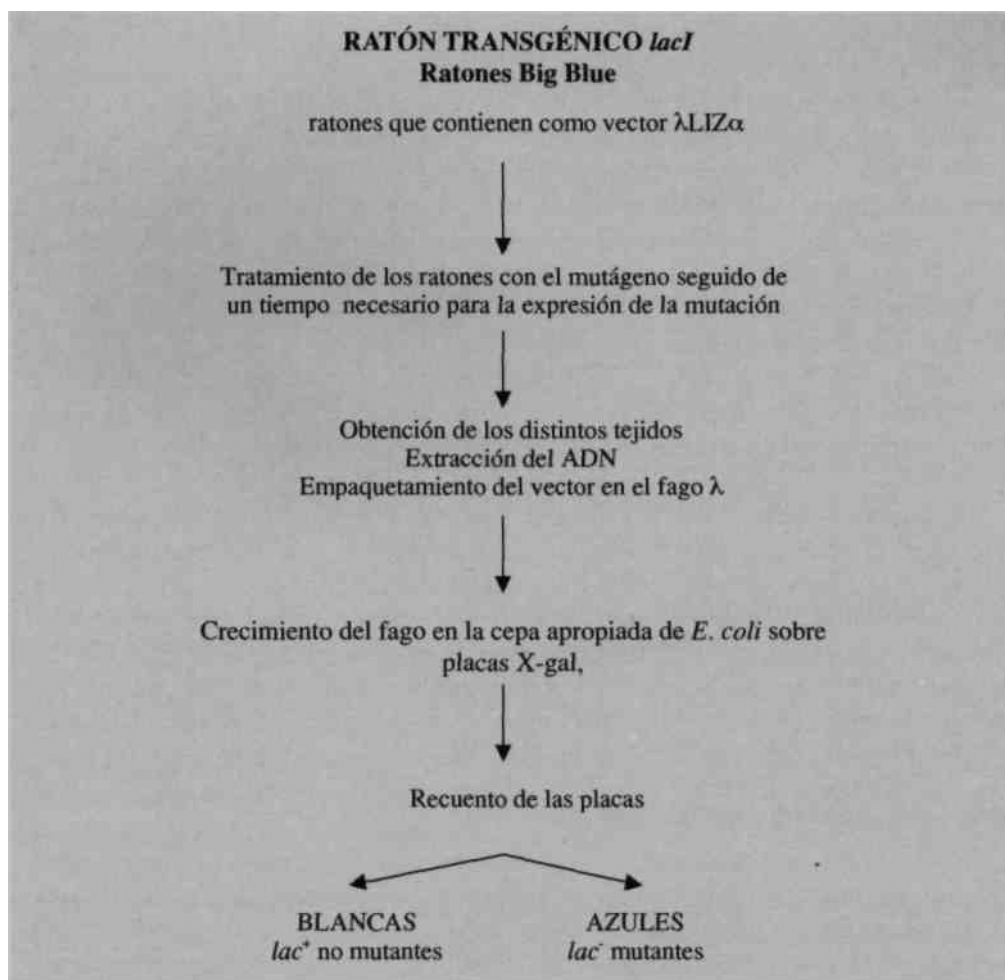


Figura 6.11. *Modelo transgénico BigBlue para el estudio de mutagénesis: esquema del estudio.*

Valor predictivo de los ensayos de mutagenicidad

Un resultado positivo claro y reproducible en un ensayo de mutagenicidad bien caracterizado indica que el compuesto es un mutágeno animal y, debido a que el ADN es el material hereditario en todos los organismos, posiblemente es mutagénico también en el ser humano. Además, en razón de la asociación entre mutación y cáncer, un resultado de ese tipo es indicativo de que el compuesto es probablemente carcinogénico, si bien para confirmar esto último se considera necesario realizar ensayos de carcinogénesis en animales.

A finales de los años ochenta y principios de los noventa, se han realizado numerosos estudios para comparar los resultados de mutagenicidad y carcinoge-

nicidad de diversos compuestos químicos, con objeto de establecer el valor predictivo de los ensayos de mutagenicidad sobre el potencial cancerígeno de un compuesto. Debido a la escasez de datos en el ser humano, generalmente se han utilizado para dichos estudios los datos de carcinogénesis en animales, que a menudo son confusos y difíciles de interpretar por diversas razones: alta incidencia de tumores espontáneos en algunas estirpes de roedores; resultados positivos en unas especies y no en otras; ausencia de experimentos duplicados para confirmar la reproducibilidad de los datos; deficiencias en el tratamiento estadístico, etc. Las conclusiones a las que se han llegado en cuanto al porcentaje de carcinógenos positivos detectados por un ensayo simple de mutagenicidad como es el de Ames, son variables en función del tipo de los compuestos considerados en el estudio, así como de los criterios adoptados para considerar el compuesto como carcinógeno en animales. Los porcentajes encontrados oscilan entre un 56 y un 93 %.

Se acepta que en el test de Ames se detectan muy bien aquellos compuestos que ejercen su efecto tóxico a través de mecanismos que implican interacción con el ADN, como ocurre con los compuestos aromáticos con grupos amino o nitro y con otros que poseen otras alertas estructurales, considerados como *carcinógenos genotóxicos*. En cambio no sirve para detectar todos aquellos que actúan a través de mecanismos diferentes que no implican lesión en el ADN y que por lo tanto, se denominan *carcinógenos no genotóxicos*: metales, compuestos halogenados estables del tipo dioxinas, bifenilos policlorados (PCB) o bifenilos polibromados (PBB), estrógenos (disruptores endocrinos), proliferadores de peroxisomas (dietilhexil ftalato), etc.

En resumen, las relaciones entre mutación, alertas estructurales y cáncer indican que una respuesta mutagénica reproducible es un indicador claro de que el compuesto tiene propiedades mutagénicas. Por consiguiente, puede ser también un compuesto carcinogénico y la actitud más prudente sería profundizar en el estudio biológico para la obtención de más datos, que permitan una correcta evaluación del riesgo tóxico que conlleva la exposición del ser humano a dicho agente bajo unas determinadas condiciones.

Carcinogénesis química

- Introducción
- Perspectiva histórica
- Definición de agente carcinogénico
- Mecanismos y etapas de la carcinogénesis
- Tipos de carcinógenos
- Métodos de evaluación

Introducción

El cáncer es una enfermedad de tipo crónico muy relacionada con la exposición del organismo humano a compuestos medioambientales. En la mayoría de los países desarrollados constituye la segunda causa de muerte detrás de las enfermedades cardiovasculares y por lo tanto uno de los mayores problemas de la ciencia médica.

La enfermedad puede ser provocada tanto por las radiaciones ionizantes como por algunos virus y, en algunos casos, parece demostrada la existencia de una cierta predisposición genética a ciertos tipos de cánceres. Sin embargo, hoy día se conoce que la causa más común de la aparición de la enfermedad es la exposición a sustancias químicas a través del medio ambiente, de la alimentación, etc. Una especial relevancia etiológica parecen tener el alcohol y el tabaco, que frecuentemente aparecen asociados.

La responsabilidad de los compuestos químicos en la inducción del cáncer se ha visto avalada por observaciones de carácter epidemiológicos:

- a) Más del 90 % de los cánceres aparecen de modo preferente en los tejidos epiteliales (tracto intestinal, pulmón, sistema urogenital, etc.).
- b) Es una enfermedad típica de la edad madura: aproximadamente el 75 % de los cánceres surgen a partir de los 60 años.
- c) La incidencia de un tipo particular de cáncer suele cambiar con la emigración de las personas. Así por ejemplo, mientras que en Japón es muy alta

la incidencia de cáncer de estómago, la presentada por la segunda generación de emigrantes japoneses en los Estados Unidos se aproxima a la normalmente ofrecida por la población de este país.

Uno de los aspectos fundamentales del proceso canceroso lo constituye la aparición de daños en el ADN celular, que son acumulables con el transcurso del tiempo. El cáncer puede ser considerado como una enfermedad de base celular, que implica procesos biológicos relacionados de modo fundamental con una replicación celular desordenada y una desorganización de la estructura de los órganos y tejidos.

Un tumor se origina por el crecimiento anormal, y relativamente autónomo, de un tejido. En función de las características de su crecimiento, los tumores o neoplasmas pueden ser benignos o malignos; éstos últimos crecen de manera invasiva, infiltrando el tejido adyacente, y con frecuencia tienen la capacidad de dar lugar a metástasis en lugares alejados del tumor primario; estas dos propiedades son las que les diferencian de los tumores benignos. Se suele emplear el término de *cáncer* para designar a los tumores malignos, mientras que el *tumor* se reserva para describir una lesión espacial que puede ser, o no, neoplásica. La mayoría de los tumores benignos se describen aplicando la terminación *orna* al tejido afectado: fibroma, lipoma, adenoma, etc.; mientras que para los neoplasmas malignos, dependiendo de la procedencia embrionaria del tejido, se añade el sufijo *sarcoma* a los tejidos de origen mesodérmico: fibrosarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, etc., o se utiliza la palabra *carcinoma* para los tejidos de origen ectodérmico: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma gástrico etc.

Perspectiva histórica

El cáncer es una enfermedad conocida desde hace milenios. En el denominado Papyrus de Edwin Smith se describe una tumoración de mama y, a partir de Hipócrates, los médicos griegos hablan de una gran variedad de tumores; el término *neoplasma* fue acuñado mucho más tarde por Galeno, que lo define como un crecimiento de una zona corporal contrario a la naturaleza. La relación causal específica entre la exposición a sustancias medioambientales y la inducción de tumores fue sugerida por primera vez por el médico cirujano inglés Percival Pott, que en 1775 describe la clara propensión de los deshollinadores londinenses a desarrollar tumores de escroto, debido a su constante exposición a los efectos tóxicos del alquitrán de hulla, contenido en el hollín.

Sin embargo, hubo que esperar al siglo XIX para adquirir una mayor evidencia de la exposición peligrosa a una serie de compuestos aportados por la cadena alimentaria, la contaminación ambiental, el medio ocupacional, el hogar, etc. y tomara cuerpo la preocupación por la carcinogénesis a todos los niveles. Precisamente, la aparición del microscopio compuesto resultó esencial para que se pudiera apreciar la formación de células cancerosas y se fundamentara con ello

la etiología del cáncer. Finalmente, el establecimiento de modelos experimentales con animales en el siglo XX, permitió descubrir la capacidad de muchos compuestos para inducir el desarrollo de tumores y se facilitó el conocimiento de su patología microscópica, que condujo a los tratamientos específicos modernos y convirtió a la Oncología en una disciplina científica autónoma.

El primer estudio de carcinogénesis química fue publicado en el año 1917 por Yamagiwa e Ishikawa, quienes demostraron que el alquitrán de hulla, aplicado de manera continuada sobre la piel de animales de experimentación, inducía la aparición de tumoraciones cutáneas. Posteriormente, se comprobó que diversos compuestos con estructura de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), aislados del alquitrán, eran los responsables del efecto carcinogénico.

En la década de los años 40, diversos investigadores realizaron experimentos de carcinogénesis en el modelo de piel de ratón y observaron efectos muy irritantes para la piel de los HAP y de un aceite (crotónico) obtenido a partir de plantas del género *Euphorbia*. A dosis bajas, ninguno de los dos tratamientos por separado resultaba carcinogénico, sin embargo cuando se combinaban ambos tratamientos, las mismas dosis bajas inducían numerosos tumores. Además, advirtieron que la secuencia de los tratamientos resultaba crucial: sólo se formaban tumores cuando se aplicaban primero los HAP y después el aceite; nunca a la inversa. Concluyeron que la tumorogénesis dependía de dos procesos a los que denominaron iniciación y promoción, conceptos que siguen vigentes hoy día. Por otra parte, hacia esa misma época, muy poco después de su descubrimiento, se observó que los estrógenos inducían cáncer en algunos tejidos, en los que parecían actuar como promotores del crecimiento tumoral.

Definición de agente carcinogénico

Se entiende como *agente carcinogénico*, o simplemente *carcinógeno*, a la estructura química que tiene la capacidad de inducir, o de causar, una neoplasia. No obstante, debe ser tenido en cuenta que la carcinogenicidad no es una propiedad intrínseca de un compuesto químico, sino que se debe a la contribución de un conjunto de eventualidades, necesarias aunque no suficientes, para el desarrollo de un cáncer. Es decir, el agente cancerígeno no da lugar a la aparición de tumores bajo cualquier circunstancia, sino que se encuentra supeditado a la concatenación de diversos factores, entre los que destacan la especie viva afectada y el ambiente biológico en que se encuentra.

Se admite que muchos de los actuales hábitos de vida, poco saludables, son los responsables de la mayor incidencia observada en la actualidad para el desarrollo de tumores: el consumo de bebidas alcohólicas, la inhalación del humo del tabaco, la ingesta alimenticia diaria, la presencia de micotoxinas en los alimentos, etc. son elementos involucrados en el desarrollo de tumores, algunas veces benignos y muchas veces graves. Así mismo, se ha puesto de manifiesto la responsabilidad de muchas de las sustancias químicas presentes en el medio

laboral en el desarrollo de tumores: el asbesto empleado en materiales de construcción; productos aplicados en manufacturas químicas, tales como benceno, para-aminodifenoles, alcohol isopropílico, agentes alquilantes, monómeros de cloruro de vinilo, etc.; materias colorantes, como naftilamina y derivados, etc.; principios químicos incluidos en algunos medicamentos, como cloranfenicol, arsenicales inorgánicos, hormonas, etc.; incluso, algunos envueltos en la sospecha, como berilio, cadmio, óxido de etileno, aldehído fórmico, pesticidas organoclorados, etc.

Desde un punto de vista experimental, un *carcinógeno* es una sustancia química cuya administración a grupos de animales conduce a un incremento estadísticamente significativo de la incidencia de neoplasmas de uno, o más, tipos histológicos, comparado con lo observado en un grupo control de animales, que no reciben dicha sustancia. Pueden darse una o varias de las siguientes situaciones:

- Que en el grupo de animales tratados se aumente la frecuencia de tumores, también presentes en el grupo control.
- Que en el grupo tratado aparezcan tumores nuevos, no presentes en el grupo control.
- Que en el grupo tratado se adelante el desarrollo de los tumores con respecto del control.

No siempre es posible, como sería deseable, distinguir entre los compuestos que inducen neoplasmas a través de una acción directa sobre las células, que se convierten en neoplásicas, de aquellos otros que actúan a través de mecanismos indirectos sobre otros tejidos o sistemas del propio animal. Así por ejemplo, compuestos con actividad inmunosupresora pueden aumentar la incidencia de neoplasmas en tejidos previamente expuestos a carcinógenos, a través de efectos indirectos en el huésped. Cuando se sabe que la acción del xenobiótico es indirecta, es decir, no actúa en las propias células que sufren carcinogénesis, el compuesto químico no se puede definir como un carcinógeno.

Por otra parte, a pesar de la definición dada para carcinógeno, una sustancia química no debe ser calificada de *carcinógeno humano* mientras no exista una evidencia suficiente de su vinculación con el desarrollo de tumores específicos en el ser humano. En este sentido, se habla de tres tipos de evidencia:

- *Suficiente*: cuando existe una relación causal entre el agente, o los agentes, y el cáncer humano.
- *Limitada*: cuando se da una interpretación causal creíble, pero con posibles explicaciones alternativas.
- *Inadecuada*: cuando se dispone de escasos datos pertinentes.

Atendiendo a los resultados obtenidos en los estudios experimentales con animales y en los epidemiológicos, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS),

Tabla 7.1. **Algunos carcinógenos humanos**

2-naftilamina	Cloruro de vinilo
4-aminobifenilo	Compuestos de arsénico
Aflatoxinas	Compuestos de berilio
Benceno	Compuestos de cromo (VI)
Bencidina	Compuestos de níquel
Cadmio	Gas mostaza

con sede en Lyon, ha establecido una clasificación de los compuestos químicos en los siguientes grupos:

1. Carcinógeno con evidencia suficiente.
2. Probable (2A) o posible (2B) carcinógeno por su evidencia limitada.
3. Probable no carcinógeno por su evidencia inadecuada.
4. No clasificable en cuanto a su carcinogenicidad.

Los agentes que tienen capacidad para inducir un proceso cancerígeno corresponden a diversos tipos: radiaciones, agentes biológicos y xenobióticos químicos que llegan al organismo procedentes del medio ambiente o son suministrados por la alimentación o la medicación. Desde luego, todavía no se ha podido establecer cuáles son los porcentajes de incidencia de cada cancerígeno específico en el desarrollo de los diferentes tipos de tumores humanos. Algunos de ellos se presentan en la Tabla 7.1.

Carcinógenos directos y carcinógenos indirectos o procarcinógenos

La gran mayoría de compuestos químicos carcinogénicos son genotóxicos, es decir tienen capacidad para provocar un daño sobre la molécula del ADN y por lo tanto, pueden dar lugar a mutaciones: son compuestos genotóxicos y mutagénicos. En general se trata de compuestos electrofílicos que interaccionan con los centros nucleofílicos de ADN, aunque también pueden reaccionar con grupos nucleofílicos presentes en otras macromoléculas, como ARN y proteínas. Entre ellos, unos pocos compuestos químicos son ya inicialmente electrofílicos; tal es el caso de la mostaza nitrogenada, la β -propiolactona o la etilenimina (Fig. 7.1). Estas sustancias no se dan en la naturaleza, sino que son productos sintéticos utilizados tanto por la industria química, como aplicados por su carácter de agentes anticancerosos, desinfectantes e insecticidas. En general son sustancias muy irritantes para las mucosas (por ejemplo para la piel y los pulmones) y suelen ser carcinógenos muy potentes con una clara actividad transplacentaria.

Sin embargo, la mayoría de los xenobióticos carcinogénicos sólo consiguen ser electrofílicos después de la correspondiente biotransformación por las enzimas metabólicas normales del organismo humano. Es un proceso que se conoce

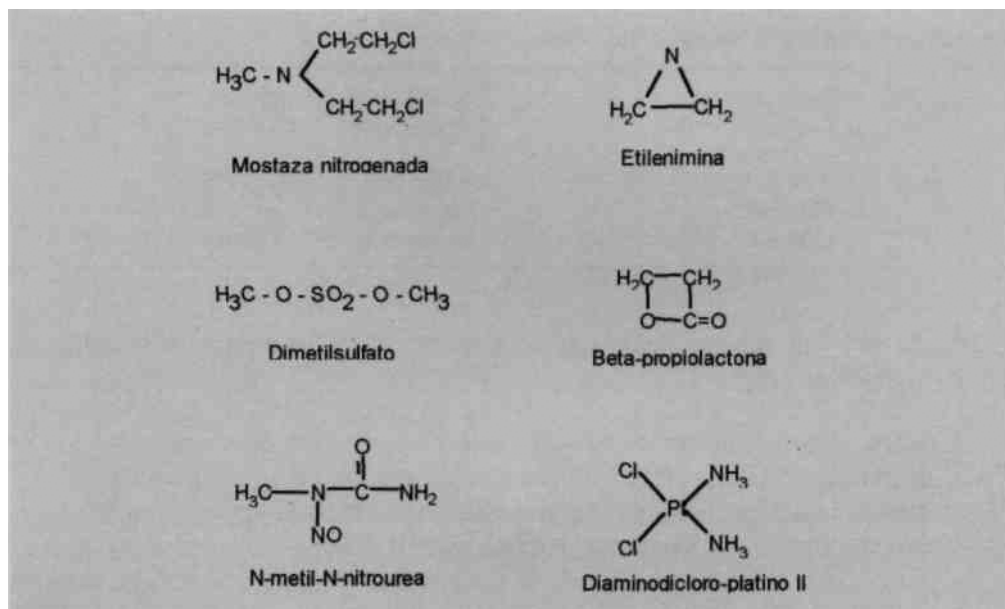


Figura 7.1. *Carcinógenos directos (agentes alquilantes).*

con el nombre de *activación metabólica* o *bioactivación* y en ocasiones puede tener lugar en varias etapas. Generalmente están implicadas enzimas oxidativas de la fase I, fundamentalmente de la familia citocromo P₄₅₀. El metabolito que presenta la capacidad de enlazar con la molécula del ADN recibe el nombre de *agente carcinogénico final* y el compuesto de partida el de *procarcinógeno*. En la Figura 7.2. se representa la activación del benzo(a)pireno (procarcinógeno) a 7,8-diol-9,10-epóxido (carcinógeno final). En estos casos, la capacidad metabólica específica de un organismo dado, o de un tejido en particular, explica por qué una sustancia química puede ser carcinogénica para una especie animal y no para otra, y por qué desarrolla tumores en un tejido y no en otro.

Además de los metabolitos electrofílicos, muchos xenobióticos pueden formar radicales libres que han sido implicados en el proceso de carcinogénesis. Avalan esta afirmación tres observaciones importantes:

1. Algunas moléculas que inhiben la formación de radicales libres (como varias sustancias antioxidantes), también inhiben la acción cancerígena de muchos compuestos considerados carcinogénicos.
2. El metabolismo de los compuestos carcinogénicos transcurre, a veces, a través de la formación de radicales libres intermediarios.
3. La formación de radicales libres desempeña un papel importante en el mecanismo carcinogénico de las radiaciones ionizantes.

También han sido implicadas otras vías diferentes a las oxidaciones catalizadas por monooxigenasas de función mixta en los procesos de bioactivación de

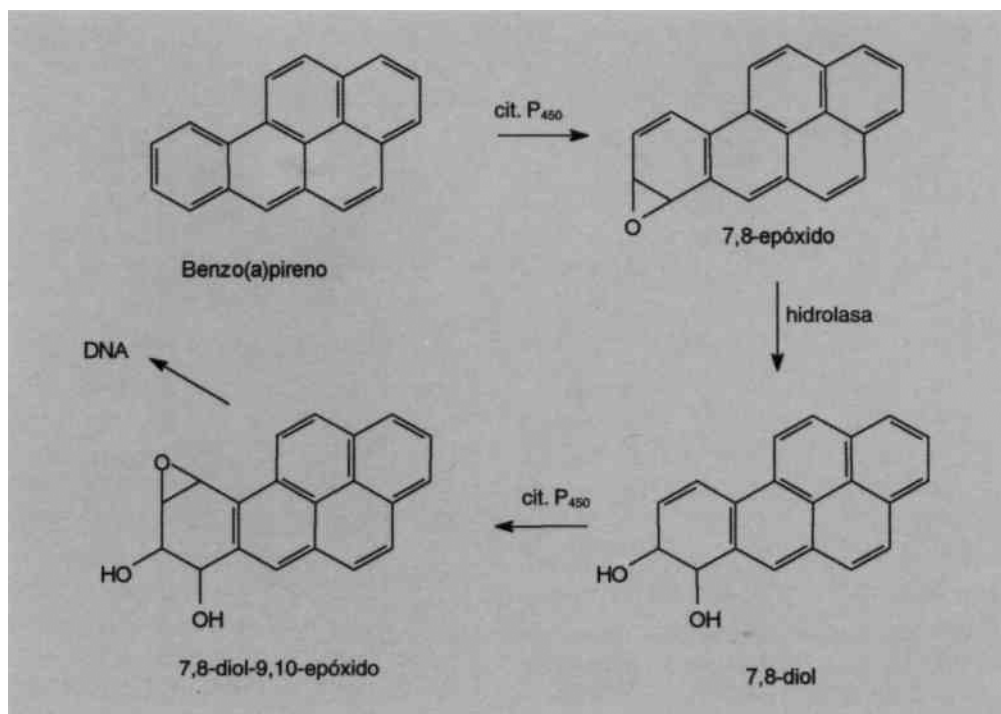


Figura 7.2. **Bioactivación del benzo(a)pireno.**

carcinógenos. Una de ellas transcurre simultáneamente a la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados, de modo especial el ácido araquidónico, y se ha asociado con la activación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. En la Figura 7.3 se representa la activación del benzo(a)pireno 7,8 diol acoplada a la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. La enzima prostaglandina sintetasa H tiene dos actividades catalíticas: una actividad ciclooxygenasa, que convierte el ácido araquidónico en prostaglandina G₂, y una actividad peroxidasa que transforma la prostaglandina G₂ en prostaglandina H₂, al mismo tiempo que oxida al benzo(a)pireno 7,8 diol dando lugar al correspondiente epóxido. Esta vía de activación metabólica parece tener su importancia en tejidos extrahepáticos; por ejemplo, algunos carcinógenos de vejiga, como 2-naftilamina, pueden sufrir activación directa en dicho tejido a través de esta vía.

Tanto los niveles enzimáticos activadores de carcinógenos como el mecanismo de detoxificación del xenobiótico pueden diferir de modo bastante apreciable de un tejido a otro, de una especie a otra, e incluso de una variedad a otra dentro de una misma especie; un carcinógeno químico puede conducir a un espectro singular de tumores en cada experiencia con animales o en los estudios epidemiológicos realizados sobre la población humana. Estas consideraciones conviene tenerlas muy en cuenta a la hora de realizar la evaluación de riesgo para el ser humano.

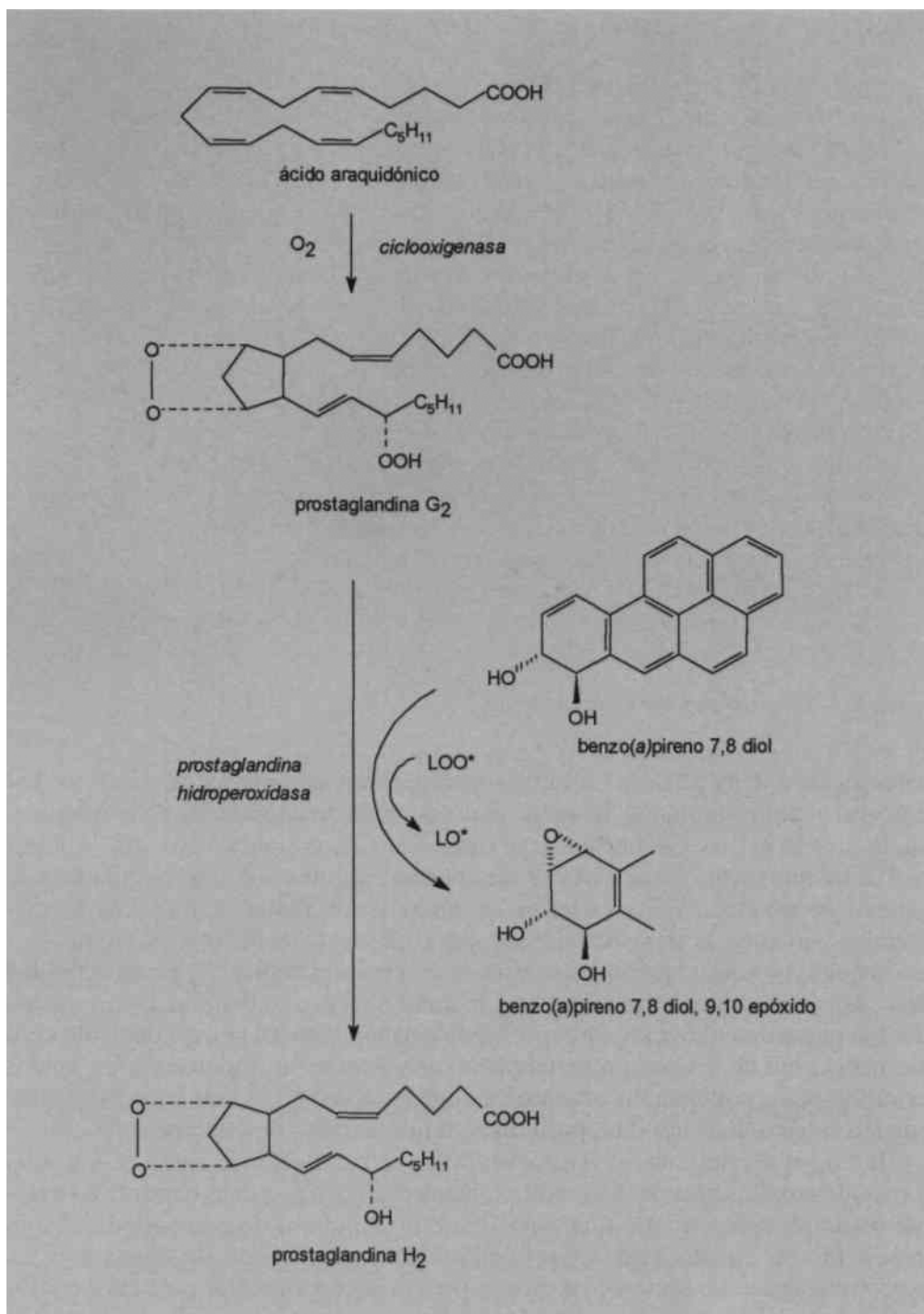


Figura 7.3. *Cooxidación de las prostaglandinas acopladas a la bioactivación del benzo(a)pireno.*

Mecanismos y etapas de la carcinogénesis

Partiendo de una célula única, como es el óvulo fertilizado, el cuerpo humano es el resultado de un proceso de desarrollo y crecimiento en el que cumple una actividad esencial la multiplicación celular: en el embrión y en el feto la replicación celular va dando forma a todos los órganos, sistemas y partes de la totalidad del cuerpo. También la división celular es la que permite que a través de la infancia y la adolescencia el neonato se convierta en una persona adulta. Ya en fase adulta, algunos tejidos muestran una gran capacidad de regeneración, por la que cualquier daño que implique destrucción tisular es reparado de modo inmediato, mediante el proceso de multiplicación celular.

En todos estos procesos, la replicación celular está sometida a una estricta regulación. Sin embargo, lo que caracteriza el crecimiento de un tumor maligno es una multiplicación celular desordenada y descontrolada, que da lugar a la aparición de células progresivamente más malignas que, por lo general, invaden el tejido circundante e incluso algunas adquieren la capacidad de emigrar a otras zonas distantes del organismo, en donde desarrollan tumores secundarios. Así mismo, conforme crece el tumor, se induce también un incremento en la formación de vasos sanguíneos, proceso que se conoce con el nombre de angiogénesis.

Actualmente, la carcinogénesis química se considera como un proceso multiestadio con desarrollo generalmente lento, que se inicia con la primera exposición al agente causal, a la que sucede un cierto *periodo de latencia* de duración variable, que desemboca en la manifestación clínica del tumor. Los estudios realizados en las últimas décadas con modelos animales, han llevado a la conclusión de que la patogénesis neoplásica transcurre a través de un complejo mecanismo que, al menos, se puede dividir en tres etapas bien definidas desde el punto de vista operacional: *iniciación, promoción y propagación* (Fig. 7.4).

El término multiestadio implica que las células normales del organismo no se transforman en células malignas de manera inmediata, es decir por un solo evento; por lo general, a medida que el tumor crece van surgiendo progresivamente células más malignas, que ofrecerán mayores diferencias geno y fenotípicas cuanto más alejadas estén de la célula inicial.

Se considera que se producen cambios estructurales en el genoma tanto en la primera como en la última fase del proceso neoplásico (iniciación y progresión), mientras que en el estadio intermedio de promoción no tienen lugar tales cambios, sino simplemente una multiplicación de la célula inicial alterada, que da lugar a un clon de células preneoplásicas.

Como en el ser humano la vida se desenvuelve bajo condiciones diferentes a las experimentales, la situación resulta mucho más compleja por estar sometido desde que nace a la exposición simultánea de una gran variedad de agentes químicos. Aunque en esencia el proceso de carcinogénesis sea el mismo, los diferentes compuestos químicos a los que puede estar expuesto a lo largo de su vida pueden modificar la velocidad de todo el proceso alterando diversos factores: la frecuencia de mutación, el ritmo de crecimiento de las células o la expresión

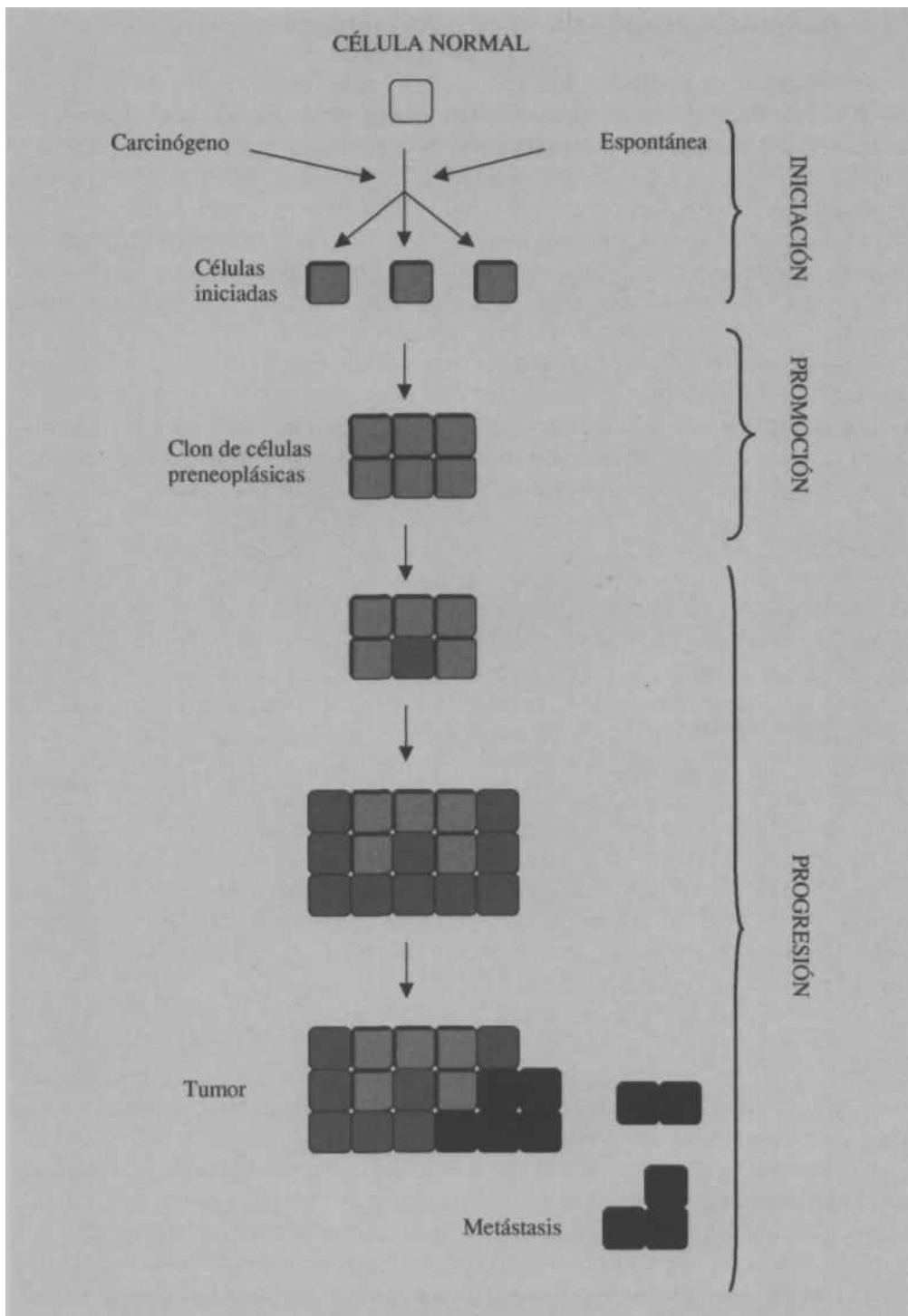


Figura 7.4. *Etapas de la patogénesis neoplásica.*

fenotípica de los genes alterados. Por otra parte, puede que la susceptibilidad de cada persona y sus niveles de defensas interactúen con modificaciones en cada una de las etapas de este proceso.

De aquí que en el mecanismo de la carcinogénesis humana se hayan contemplado también las siguientes secuencias de eventos:

- a) Exposición al agente (o agentes) carcinogénico.
- b) Metabolización del agente (o agentes).
- c) Interacción del agente (o los agentes) con los componentes celulares, de modo particular con el ADN, y concurrencia de varias posibilidades:
 - Reparación del ADN dañado.
 - Muerte de la célula.
 - Persistencia de la célula mutada.

En este último caso se habrá originado una célula «iniciada», cuya replicación puede dar lugar a un clon de células anormales dentro del tejido. Esta etapa equivale a la fase de *iniciación*.

- d) Crecimiento de clones anormales a partir de las células «iniciadas». Equivale a la fase de *promoción* que generalmente no es detectable clínicamente.
- e) Crecimiento del tumor y su extensión a otras partes del cuerpo. Equivale a la fase de *propagación*, en la que aparecen los signos y síntomas clínicos.

Etapas de iniciación

Comienza con una alteración inicial en alguna célula individual integrante de un tejido, como resultado de la actividad tóxica de un carcinógeno químico bajo la exposición de una dosis única. Es decir, se produce la transformación de una célula, que hasta el momento era normal, en otra célula que se denomina iniciada, en la que los sistemas controladores del ciclo celular no funcionan de modo correcto.

Lo que diferencia una célula «iniciada» de otra normal es la ventaja proliferativa de la primera respecto de la segunda en presencia de un promotor. La iniciación por sí sola no conduce —o lo hace de una manera muy lenta— a la formación de un tumor.

Varias son las características de la fase de iniciación:

1. La iniciación es un proceso *irreversible*. Se trata de una alteración celular persistente y transmisible a las células hijas. Puede ser producida por carcinógenos completos e incompletos.
2. La iniciación es un suceso *poco frecuente*. En los experimentos con animales, las dosis altas de carcinógenos genotóxicos dan lugar a pocas células iniciadas. Así por ejemplo, en el hígado de rata el tratamiento con una dosis alta de nitrosamina sólo da lugar a una célula *iniciada* por cada 10^6 células. La iniciación requiere aparentemente un tipo de lesión muy específica.

3. La iniciación es un fenómeno *rápido*. Una sola dosis de un carcinógeno de semivida corta es suficiente para producir células *iniciadas* en aquellos tejidos que son susceptibles.
4. La iniciación parece *requerir la replicación celular*. Los organismos en desarrollo, tanto en el periodo embrionario como postnatal, son mucho más susceptibles a los efectos carcinogénicos que los adultos. Algunos carcinógenos incompletos como metilnitrosourea, tienen una actividad muy baja como iniciadores en el hígado de los animales adultos, mientras que si se estimula el crecimiento celular por hepatectomía, la susceptibilidad aumenta considerablemente. Probablemente se deba a la incapacidad de las células para reparar el ADN antes de su replicación.

Desde el punto de vista mecánico, la iniciación se debe a *mutaciones* en el ADN, si bien no se puede descartar por completo otros tipos de mecanismos en algunos casos. La estructura del ADN puede quedar alterada cuando el compuesto químico forma un *aducto* mediante un enlace covalente, especialmente con las bases nitrogenadas a través de sus átomos de N o de O. Muchos de estos aductos pueden llegar a tener relevancia por diversas razones:

- a) Distorsionan la forma de la molécula del ADN, que potencialmente puede ser la causa de una transcripción molecular errónea.
- b) Durante la replicación del ADN afectado puede ocurrir una falsa lectura de la base aductada y ocasionar una mutación en la nueva cadena.
- c) Los aductos voluminosos pueden dar lugar a una rotura en la cadena del ADN, que a su vez ocasiona una mutación o un deterioro del material genético.
- d) La reparación de los aductos puede realizarse de manera incorrecta.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el potencial carcinogénico de una sustancia química viene determinado por la estabilidad del aducto formado con el ADN y por la capacidad de inducir alteraciones heredables en los genes dianas. Por ello se les conoce con el nombre de carcinógenos *genotóxicos*.

Además de aductos, los compuestos químicos pueden dar lugar también a otros tipos de lesiones en el ADN como *pérdidas o hidroxilaciones de bases, formación de puentes intercatenarios, roturas monocatenarias*, etc. Todas ellas son *lesiones premutagénicas* que pueden ser corregidas por los sistemas de *reparación* de la célula. Pero también puede ocurrir que estos daños se estabilicen tras la replicación y se conviertan en cambios irreversibles o *mutaciones*. En el caso de que falle la apoptosis y la célula mutada no muera, se habrá formado ya una célula «iniciada» con la posibilidad de que se cree un clon de células mutadas por división celular de ésta.

En consecuencia, a través de un mecanismo molecular se pueden producir una, o más, mutaciones en aquellos genes que desempeñan una función importante en el control del ciclo celular, tales como los *oncogenes* y los *genes supresores* implicados en el desarrollo de numerosos cánceres. Algunos de estos

genes por ejemplo, codifican proteínas que impiden que las células se reproduzcan cuando su ADN se encuentra muy dañado; otros codifican proteínas que activan la muerte celular programada, o apoptosis, en el caso de no poder ser reparado el ADN dañado, etc. Queda fuera del objetivo de este libro una profundización molecular en este tipo de mecanismos complejos, pero se comprende que fallos en genes con funciones reguladoras del ciclo celular favorezcan la aparición de nuevas mutaciones y la transmisión de las mismas a las células hijas.

De lo dicho anteriormente se deduce que, al menos son tres los procesos con especial importancia en esta primera fase de *iniciación* del mecanismo neoplásico: el metabolismo del xenobiótico, la reparación del ADN y la proliferación celular. Una perturbación en cualquiera de ellos tendrá su impacto sobre la iniciación de un proceso tumoral.

Etapa de promoción

Llegado a este punto, el mecanismo neoplásico continua con la implicación de importantes alteraciones en la expresión de genes y en la proliferación celular, que son la base de la fase de *promoción*, donde la célula «iniciada» se transforma en una población perceptible de células precancerosas.

La característica principal por tanto de la promoción es la multiplicación selectiva de las células iniciadas (Fig. 7.4). No obstante, se pueden señalar otras características de esta etapa y de los agentes promotores:

- a) Puede ser una fase *reversible*, es decir, puede ocurrir una regresión en la multiplicación de las células mutadas, una vez desaparecido el agente promotor, posiblemente por apoptosis celular.
- b) Requiere siempre un periodo *largo* de acción que puede ser de algunas semanas, meses, o incluso años, durante el cual se necesita la presencia del agente promotor.
- c) Se asocia frecuentemente con la estimulación del crecimiento tisular en el órgano diana (regeneración del tejido lesionado).
- d) Los sucesos genotóxicos y mutacionales no parecen ser necesarios en esta etapa.
- e) Es una etapa susceptible de ser *modulada por factores fisiológicos*: edad, dieta, actividad hormonal, etc. Así por ejemplo, la nutrición hipercalórica parece tener un efecto promotor general en numerosos órganos.
- f) Se requieren dosis relativamente altas del promotor. Los agentes promotores, por debajo de una cierta *dosis umbral* no son efectivos.
- g) Especificidad respecto del órgano diana. Muchos agentes promotores muestran una gran especificidad respecto del órgano en el que ejercen su efecto, al revés de lo que ocurre en el periodo de iniciación, donde pueden actuar sobre muchos órganos.

Este concepto de promoción de tumores se comenzó a utilizar cuando en los experimentos de carcinogénesis con animales se descubrió la existencia de sustancias químicas, que careciendo por sí mismas de actividad cancerígena apreciable, sin embargo presentaban la propiedad de enaltecer el desarrollo de tumores al actuar en conjunción con un agente cancerígeno propiamente dicho. No parece que estos promotores tumorales, que responden a diversos tipos de estructuras químicas (etanol, barbitúricos, hidrocarburos clorados, etc.), actúen mediante interacción directa con el ADN, al revés de lo que ocurre con los xenobióticos implicados en la primera etapa, que actúan a través de procesos en los que están implicados fenómenos de mutagénesis. De aquí que se les denomine carcinógenos *no genotóxicos*. No obstante, se ha observado que tales agentes presentan una particular potencia en su capacidad para originar una replicación celular y ocasionar cambios profundos en la expresión de genes, con alteración del control sobre el crecimiento celular. Por otra parte, parece que, de modo indirecto, los promotores tumorales también pueden provocar acciones oxidativas moleculares, que dan lugar a daños en el ADN con sus consecuencias correspondientes.

Aunque en un principio la definición de promotor tumoral implicaba la carencia de actividad iniciadora, hoy en día no se considera así, porque nunca puede ser probada la ausencia de un determinado efecto biológico; además, en estudios a largo plazo y a elevadas dosis, casi todos los promotores tumorales inducen tumores sin haber recibido un tratamiento previo con un agente iniciador.

Etapas de progresión

La secuencia que transcurre desde la iniciación hasta la promoción produce sólo lesiones preneoplásicas y tumores benignos. Su transformación en lesiones malignas es la última de las etapas del proceso canceroso y se conoce con el nombre de *progresión*. Representa la fase en la que se ve muy incrementado el crecimiento y expansión de las células cancerosas, dando lugar a una masa tumoral invasiva.

A medida que se multiplican las células aumenta el número de cambios genotípicos y fenotípicos. La fuerza que dirige todo el proceso es una combinación de mutación y selección; la mutación actúa de manera aleatoria, mientras que la selección lo hace en el sentido de favorecer el crecimiento de aquellas células con mayor autonomía, es decir con un ciclo celular más desregulado, y con potencial metastático. Parece claro que se necesita más de un cambio genético para alcanzar la malignidad, pero no parece evidente que el camino recorrido por las células sea siempre el mismo; en los tumores en estado avanzado se encuentran una gran variedad de mutaciones en genes que controlan el ciclo celular, pero la secuencia de dichas mutaciones parece ser variable.

Una característica particular de esta etapa es la *inestabilidad genómica* de las células, en la cual podría estar implicado el gen supresor *p53* que con una gran frecuencia aparece mutado en los tumores humanos. El gen *p53* contribuye a la monitorización y reparación del ADN lesionado: su función consiste en retrasar la progresión hacia la fase S del ciclo celular hasta que la reparación del ADN se ha terminado. Por eso se denomina a veces a este gen como *guardián del genoma*. La inactivación de este gen por mutación, que es la situación en la que se encuentra en muchos tumores humanos en estadio avanzado, podría dar lugar a una acumulación de lesiones genéticas y a una aceleración de la fase de progresión tumoral.

Tipos de carcinógenos

Al ser la carcinogénesis un proceso que se realiza en diversas etapas, se ha querido hacer una clasificación de los agentes químicos de acuerdo con la incidencia que puedan tener en cada una de esas etapas. De este modo se han establecido las denominaciones siguientes:

- a) *Agentes iniciadores o carcinógenos incompletos*: aquellos que únicamente son capaces de inducir la etapa de iniciación, es decir, dar lugar a células mutadas iniciadoras. Ejemplos son las metil y etil-nitrosourea y el uretano.
- b) *Agentes promotores*: aquellos que tienen la capacidad de causar la expansión clonal a partir de la célula mutada inicial, como puede suceder con el fenobarbital y la sacarina.
- c) *Carcinógeno completo*: aquellas estructuras químicas que poseen la capacidad de inducir cáncer a partir de células normales. Por lo general, tienen propiedades de agentes iniciadores y promotores. Se pueden citar los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas aromáticas y las nitrosaminas.

Los xenobióticos que específicamente se comportan como agentes iniciadores se caracterizan por actuar mediante un mecanismo con capacidad de alterar la estructura del ADN y/o los cromosomas. Se suelen considerar como *carcinógenos genotóxicos*, cuya actividad está vinculada de modo directo a la inducción de neoplasias. Estos agentes carcinógenos presentan una correlación entre estructura y actividad y se caracterizan por ser mutagénicos y activos a todas las dosis, pudiendo afectar a varias especies de animales y a diferentes órganos.

Aquellos otros xenobióticos capaces de inducir el desarrollo de una neoplasia, sin que se tenga la evidencia de actuar mediante una actividad genotóxica directa sobre las células dianas, son los denominados *carcinógenos no genotóxicos*. Estos agentes carcinógenos no ofrecen una clara correlación entre estructura y actividad, no son mutagénicos y presentan un efecto umbral con respecto a la dosis, además de limitar su actividad a un órgano determinado y a una especie animal concreta.

Todos los miembros de este grupo tienen la capacidad de acelerar el crecimiento celular en su órgano diana, que puede ser debido a un proceso regenerativo o inducido por un sistema hormonal. Dentro de este grupo se incluyen los agentes promotores, aunque muchos de ellos se comportan como carcinógenos completos (es decir inducen tumores sin un tratamiento previo con un agente iniciador) en ensayos con animales. Esta aparente contradicción tiene dos posibles explicaciones: o bien el efecto genotóxico no se ha podido poner en evidencia en los ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad disponibles, o bien en los experimentos de carcinogénesis las células iniciadas han podido originarse espontáneamente; en éste último caso, puede pensarse en un efecto indirecto del propio agente promotor que, al incrementar la división celular, puede favorecer que en la célula se produzcan errores en la replicación del ADN y mutaciones.

Diferentes xenobióticos que llegan al organismo humano a través de diversas procedencias han demostrado tener alguna relación con los procesos tumorales malignos, bien por datos de tipo epidemiológico, bien por estudios experimentales con animales. Pertenecen a distintas clases de entidades químicas, tanto elementos inorgánicos como compuestos orgánicos.

Carcinógenos genotóxicos

Compuestos orgánicos:

Entre los compuestos orgánicos hay que destacar los que responden a los siguientes tipos de estructuras:

1. Los *hidrocarburos aromáticos policíclicos* (HAP), que se forman en muchos procesos de combustión de la materia orgánica y se pueden considerar como contaminantes ubicuos del medio ambiente: están presentes en el humo del tabaco (se han descrito 280 HAP), en el humo emanado por los motores de vehículos (se han descrito 146 HAP), en el alquitrán de hulla, en el petróleo y otros combustibles fósiles, etc. También se pueden formar *de novo* durante la preparación térmica de los alimentos (asado, fritura, cocción, ahumado). Todos ellos pueden tener un efecto local (piel) y efectos sistémicos en muchas especies animales. Los primeros en demostrar una actividad cancerígena fueron los aislados del alquitrán de hulla

Responden a estructuras muy variadas, que difieren en su potencia carcinogénica; se ha comprobado que un factor determinante, o al menos influyente, de la cancerogenicidad de estos compuestos es su estructura espacial plana. Los más potentes son el 3-metil colantreno, el 7,12-dimetil-benzo(a)antraceno y el benzo(a)pireno (Fig. 7.5).

Se activan por epoxidación a través de CYP1A1 (inducible por HAP) y la destoxificación está mediada por la enzima epóxido hidrolasa y la conjugación con glutatión. Por consiguiente, su actividad biológica dependerá del equilibrio existentes en las células diana entre activación y destoxificación.

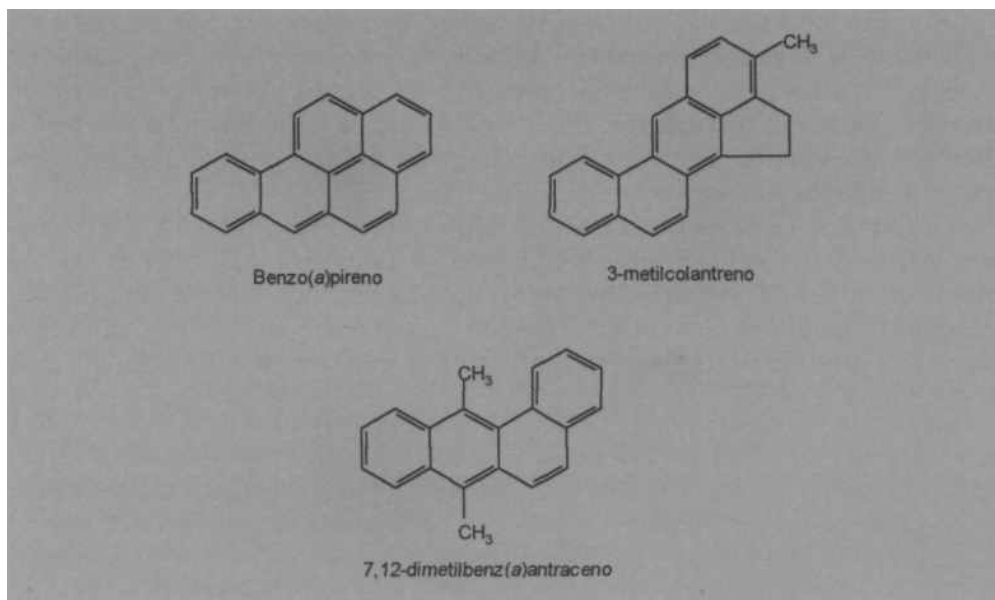


Figura 7.5. *Hidrocarburos aromáticos policíclicos.*

2. Las *aminas aromáticas* son hidrocarburos aromáticos que contienen grupos amino como sustituyentes. Excepto algunas estructuras complejas que se forman en la pirólisis de aminoácidos por tratamiento térmico de algunos alimentos ricos en proteínas, son generalmente productos sintéticos utilizados como tintes, antioxidantes y precursores de productos farmacéuticos (Figura 7.6).

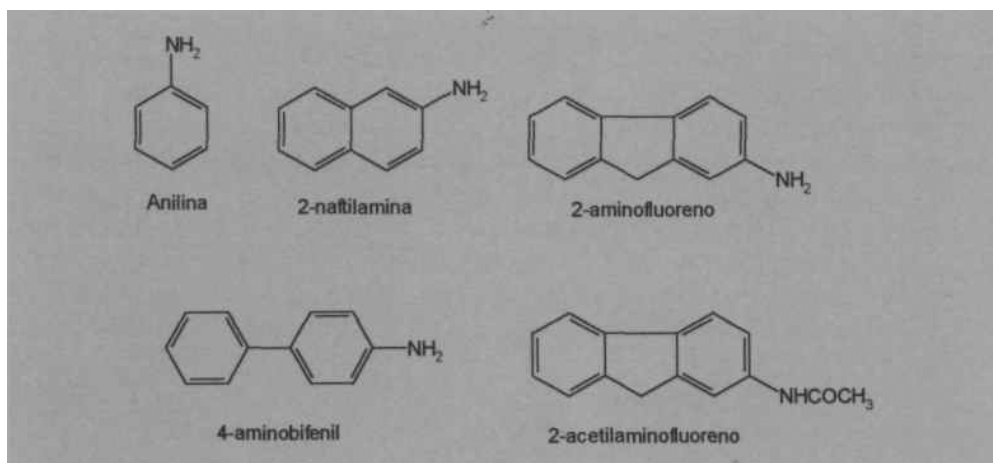


Figura 7.6. *Aminas aromáticas carcinogénicas.*

Son carcinógenos dependientes de activación metabólica, que actúan sistémicamente y muestran bastantes diferencias interespecíficas. En roedores, muchas de estas sustancias inducen cáncer de hígado, de vejiga urinaria en machos y de mama en hembras. En el ser humano, la 1,2-naftilamina y la benci-dina producen cáncer de vejiga, particularmente en aquellos que por sus sistemas enzimáticos son acetiladores lentos.

La activación está mediada por el sistema microsomal (P450 1A2) que cataliza la formación del derivado N-hidroxilado; estas sustancias N-hidroxi son muy tóxicas para el sistema hematopoyético. La segunda fase de la activación tiene lugar fundamentalmente en el hígado e intervienen las enzimas sulfotransferasas, N-acetiltransferasas y prostaglandina H sintetasa para dar lugar al carcinógeno final (Fig. 7.7).

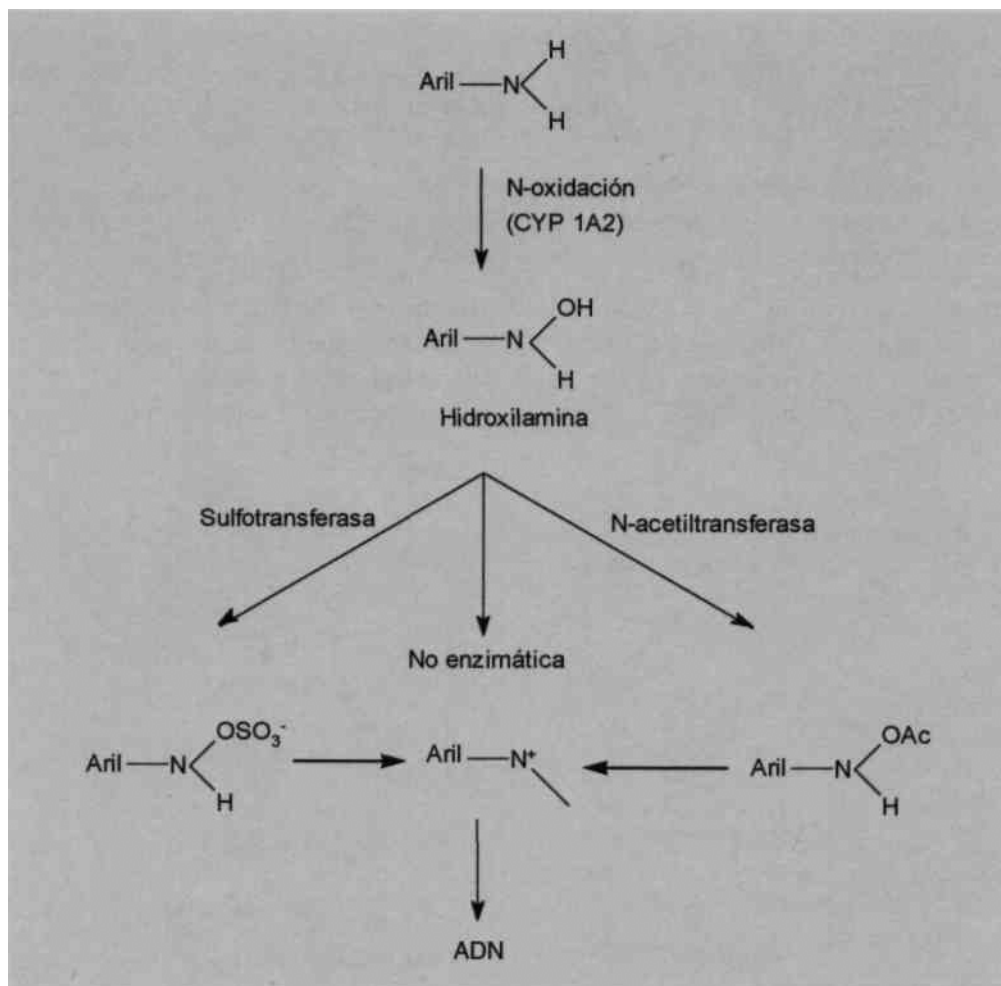


Figura 7.7. *Activación metabólica de aminas aromáticas.*

3. Algunos medicamentos están considerados como carcinogénicos para el ser humano, y entre ellos, destacan numerosos *agentes alquilantes*, muchos de los cuales se emplean en la terapia anticancerosa, que se manifiestan como potentes cancerígenos.

4. Las *nitrosaminas*, unas productos naturales y otras sintéticas, son carcinógenos dependientes de activación metabólica. En ocasiones, se pueden formar de manera endógena, principalmente en el medio ácido del estómago, a partir de aminas secundarias (formadas a partir de las proteínas durante el tratamiento térmico de algunos alimentos) por reacción con los nitritos (utilizados como aditivos y formados también por las nitratorreductasas bacterianas a partir de los nitratos presentes en los alimentos). La activación metabólica se produce por la oxidación del átomo de C próximo al grupo amino.

Desde el punto de vista de su estructura se dividen en compuestos simétricos, asimétricos y cíclicos (Fig. 7.8) y muestran un característico órganotropismo debido a la activación metabólica. Inducen tumores en todas las especies testadas. Destaca la dimetil-nitrosamina que suele ser un potente carcinógeno de hígado y riñón en la mayoría de las especies animales. En el ser humano las nitrosaminas se han relacionado con el cáncer de estómago debido a dos tipos de observaciones:

- a) Los compuestos N-nitro administrados oralmente producen cáncer de estómago. Este tipo de cáncer es más frecuente en Japón, en donde el contenido en nitritos de la dieta es alto debido a sus hábitos alimentarios.

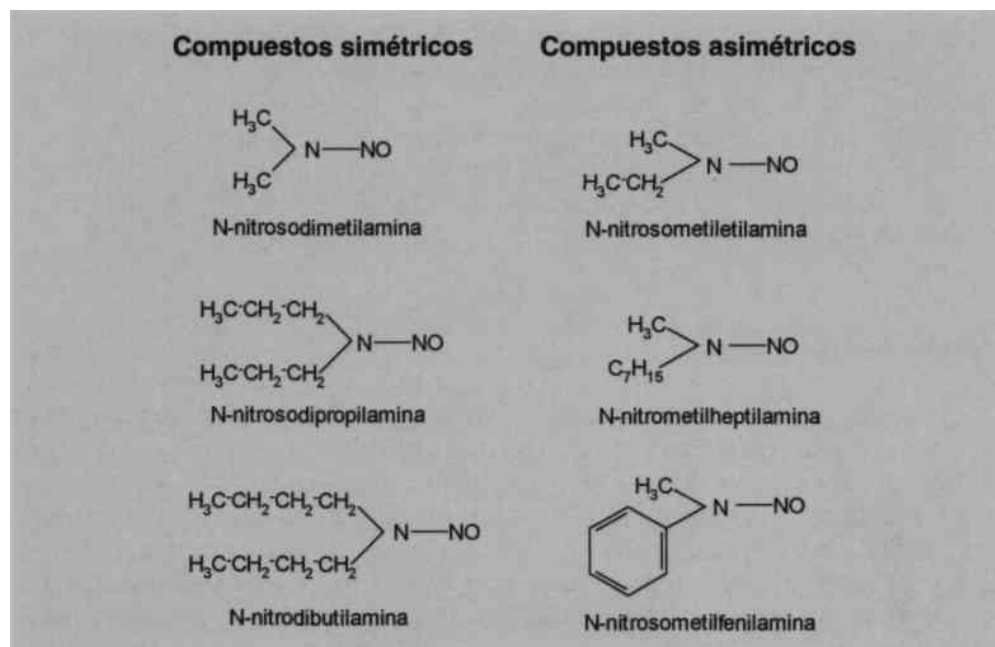


Figura 7.8. *N-nitrosaminas*.

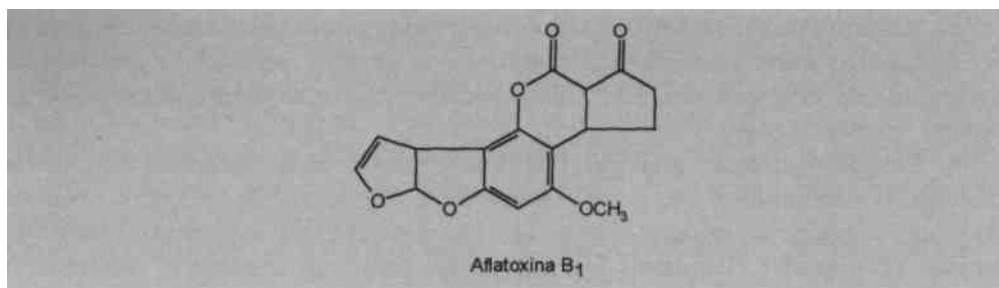


Figura 7.9. *Aflatoxina B₁*.

- b) La reacción de bioactivación de nitrosaminas se inhibe por la vitamina C. En este sentido, se ha observado que una nutrición deficiente en dicha vitamina y una más alta incidencia de cáncer de estómago aparecen asociadas en los países del norte frente a los del sur, con dietas más ricas en vegetales, por ejemplo, Canadá *versus* Florida o Suecia *versus* Italia.

5. Entre los compuestos naturales se pueden citar las *micotoxinas* y en particular la aflatoxina B, (Fig. 7.9), producida por algunas cepas de *Aspergillus flavus*. La aflatoxina B₁ se activa por epoxidación (CYP3A4) y es uno de los compuestos conocidos más potente capaz de producir carcinogénesis hepática en rata. En el ser humano también está relacionada con el cáncer de hígado: en algunas regiones de África existe una alta incidencia de cáncer hepático. En estas regiones se ha detectado un alto contenido de aflatoxinas en la dieta, pero también es alta la proporción de personas infectadas con el virus de la hepatitis B (VHB). Se ha estimado que el riesgo de carcinoma hepatocelular se duplica tras exposición a la aflatoxina, se quintuplica por la infección con VHB y es 60 veces más alto si se da simultáneamente exposición a la aflatoxina e infección con VHB.

Compuestos inorgánicos

Bastantes xenobióticos inorgánicos han demostrado un efecto carcinogénico en experimentos con animales, mientras que han sido muy pocos los que se han podido relacionar con el cáncer humano. Sin embargo, en muchos de los asociados con el cáncer humano no se han podido confirmar los mismos efectos nocivos mediante experiencias con animales: el *cadmio* produce carcinoma de pulmón y próstata; el *cromo* induce carcinomas pulmonares y gastrointestinales; el *níquel* provoca carcinomas de pulmón, nasofaringe, estómago y riñón; el *arsénico* induce linfomas, leucemias, angiosarcomas hepáticos y carcinomas pulmonares y dérmicos.

Carcinógenos no genotóxicos o epigenéticos

Los carcinógenos no genotóxicos son aquellos compuestos carcinogénicos que no reaccionan con el ADN, o al menos no se ha podido demostrar que tal reacción se produzca, pero que muestran otros efectos biológicos que podrían constituir el fundamento de su carcinogenicidad, tales como:

- Citotoxicidad y proliferación celular (efecto mitogénico).
- Inflamación crónica.
- Influencias hormonales.

Este grupo de carcinógenos no genotóxicos está creciendo en los últimos años, lo que plantea preguntas importantes respecto del mecanismo implicado y, por otra parte, tiene una gran repercusión desde el punto de vista de la evaluación del riesgo. La exposición a muchas de estas sustancias tiene lugar a través del medio ambiente: dioxinas, ftalatos, DDT etc.

Algunos de estos compuestos parecen *ser promotores tumorales* como por ejemplo tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD), fenobarbital, DDT y otros plaguicidas organoclorados, la sacarina, el butil-hidroxitolueno (BHT) y

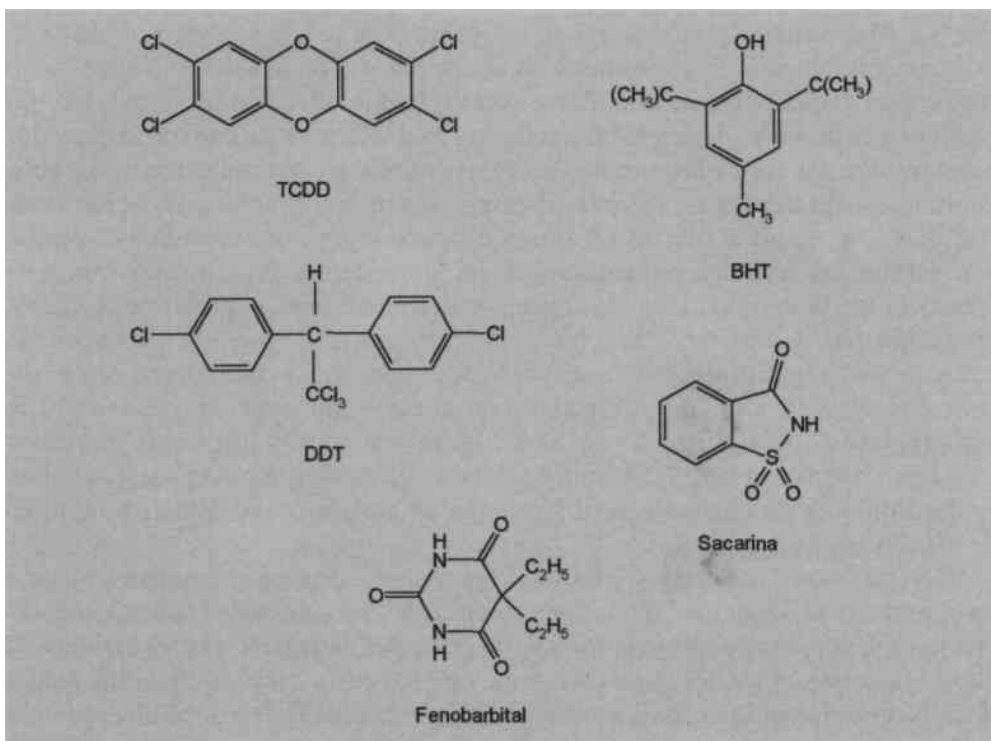


Figura 7.10. *Compuestos químicos que se comportan como promotores tumorales.*

butil-hidroxianisol (BHA) (Fig. 7.10). Los promotores tumorales se definen como sustancias que, sin ser ellos mismos carcinógenos, aumentan la incidencia de cáncer después de la exposición a un compuesto cancerígeno. Probablemente, el fenómeno se basa en la expansión clonal de células iniciadas (mitogénesis). Como no se conoce muy bien el mecanismo de promoción existen pocos procedimientos experimentales para detectar este tipo de efectos: *in vivo*, la inducción de papilomas en la piel de ratón, de *foci* en hígado de rata o de tumores de pulmón en algunas estirpes de ratones; *in vitro*, ensayos de transformación celular o de inhibición de las uniones intercelulares.

Otros compuestos parecen actuar a través de *mecanismos hormonales*. Se sabe desde hace tiempo que las hormonas naturales pueden inducir cáncer en diversos tejidos, aunque por lo general suelen requerir dosis muy altas y tratamientos muy largos. El mecanismo por el que las hormonas inducen cáncer no se conoce, pero se sabe que, en todos los casos, se produce una estimulación de la proliferación celular en los tejidos diana. Actualmente existe un gran debate alrededor de los llamados «*disruptores endocrinos*», o compuestos presentes en el medio ambiente, que por su estructura química mimetizarían la acción de las hormonas naturales y cuya posible contribución al cáncer humano permanece sin aclarar.

Existen aproximadamente 100 sustancias no tóxicas que aumentan el número de peroxisomas en el hígado de rata y que inducen tumores hepáticos, que se denominan «*proliferadoras de peroxisomas*». Los peroxisomas son unos orgánulos celulares presentes en el citoplasma de todas las células eucariotas, pero especialmente abundantes en los hepatocitos. Su principal función biológica consiste en la degradación de los ácidos grasos de cadena larga y tienen también un papel importante en el metabolismo del colesterol. Además, las oxidasas presentes en los peroxisomas tienen una gran significación toxicológica, ya que su actividad catalítica produce H_2O_2 a partir del cual se pueden formar las especies radicalarias de oxígeno. Se ha sugerido una relación causal entre la actividad de las oxidasas peroxisómicas y la carcinogénesis, pero está sin demostrar. Por otra parte, los proliferadores de peroxisomas inducen a menudo proliferación celular en el hígado y actúan como promotores tumorales en animales. Algunos compuestos que muestran este tipo de actividad son los siguientes: agentes hipolipemiantes (clofibrato), plásticos (ftalatos), disolventes (1,1,2-tricloroetileno). Sin embargo, no existe evidencia epidemiológica de que estos proliferadores de peroxisomas induzcan tumores de hígado en el ser humano.

Determinados materiales plásticos (polímeros orgánicos) pueden inducir sarcomas en el lugar de aplicación cuando se colocan subcutáneamente. El efecto depende exclusivamente de las propiedades físicas de las superficies ya que el material es inerte. Parece ser que, en este caso, están implicados mecanismos de inflamación crónica e incremento de la proliferación celular, aunque se discute también la participación de los macrófagos en la producción de radicales libres.

También las fibras y polvos de *asbestos* son carcinógenos no genotóxicos, aunque parece que las responsables del proceso canceroso son las propiedades físicas de las fibras y su larga semivida biológica. Producen mesoteliomas (tumor maligno de la pleura) tras exposición por inhalación y cáncer de pulmón, si la exposición ocurre en combinación con el humo del tabaco. Existe la evidencia epidemiológica que en el ser humano los asbestos son cancerígenos a las elevadas concentraciones (> 100.000 fibras/m³) existentes en algunos ambientes laborales.

Evaluación de la carcinogenicidad

Debido al escaso conocimiento existente sobre el mecanismo molecular de la carcinogenicidad, los métodos disponibles hoy día para evaluar el potencial carcinogénico de un compuesto químico son bastante limitados. Dejando a un lado los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad, que permiten identificar los carcinógenos genotóxicos, y que han sido comentados en el Capítulo 6, los procedimientos propios de evaluación de la carcinogenicidad se agrupan en tres tipos de metodología:

1. Ensayos *in vitro* de transformación celular:

Se mide la capacidad de un compuesto químico para transformar una célula «normal» en una célula tumoral. Se han descrito distintos ensayos que utilizan líneas celulares diversas, generalmente derivadas de ratón o de hámster (3T3, SHE, etc), en las que la transformación se detecta mediante cambios en su morfología celular. Este tipo de ensayos ha demostrado capacidad para detectar carcinógenos no genotóxicos.

Las críticas que reciben este tipo de ensayos son comunes a los ensayos *in vitro* en general, fundamentalmente basadas en el hecho que el metabolismo de las células en cultivo no es el mismo que el metabolismo *in vivo*: las fases de bioactivación y detoxificación pueden estar ausentes en esos sistemas.

Por otra parte, los datos disponibles sobre los efectos de compuestos cancerígenos en estos sistemas es muy inferior a la que existe respecto de los ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad, y de carcinogénesis en animales, por lo que las conclusiones que se pueden extraer son bastante limitadas.

2. Ensayos *in vivo* de carcinogénesis:

Los ensayos de carcinogénesis en roedores constituyen realmente el único procedimiento experimental de que se dispone para descubrir el potencial cancerígeno de un compuesto químico.

Existen unos pocos ensayos de duración relativamente corta, como la inducción de tumores de piel en ratón, de tumores de mama en ratas hembra Sprague-Dawley, o de tumores de pulmón en algunas estirpes de ratón. El ensayo clásico

de carcinogénesis es el de dos años en roedores, que en la práctica transcurre durante toda la vida de los animales (como mínimo dos años de duración en rata y año y medio en ratón), y que por lo tanto resulta complicado y costoso.

Este ensayo se realiza administrando de modo crónico a los animales un compuesto a la máxima dosis tolerada (MDT); es decir, a una dosis alta que produce efectos tóxicos sin comprometer la vida de los animales, evaluando la incidencia de tumores en todos los lugares posibles. En los últimos años, este ensayo ha recibido numerosas críticas debido a la dificultad de extrapolar sus resultados al ser humano; sin duda alguna, extrapolar los resultados obtenidos con animales sometidos a dosis muy altas, hasta las bajas dosis de exposición, que son normales para el ser humano, representa un paso lleno de incertidumbre:

- Se ignora si el modelo de roedor es un modelo representativo de la carcinogénesis humana.
- No se comprueba si existe una relación lineal, o de otro tipo, dosis-respuesta, por lo que la deducción de lo que ocurre a dosis bajas, sin conocer la forma de la curva es totalmente incierta.
- No se tienen en cuenta los efectos sinérgicos de otros compuestos químicos
- No se tienen en cuenta los efectos protectores del organismo (destoxificación metabólica, reparación del ADN, etc.), ya que éstos están probablemente saturados a dosis tan altas.
- Las dosis altas pueden dar lugar a una proliferación celular regenerativa del tejido.

A pesar de todo, la experiencia acumulada en los últimos cincuenta años permite señalar los siguientes factores a favor de dichos ensayos:

- Todas las sustancias que han demostrado una actividad carcinogénica en el hombre, salvo escasísimas excepciones, son también positivas en los ensayos con roedores.
- Aunque muchos compuestos químicos son carcinógenos en animales y no en el hombre, muchos de los carcinógenos humanos se han descubierto a partir de los ensayos en animales, como por ejemplo, aflatoxina, dietilstilbestrol o cloruro de vinilo.

3. Estudios epidemiológicos:

Constituyen realmente la única herramienta para detectar los compuestos cancerígenos humanos y son muy importantes para los estudios de evaluación de riesgo para la población humana. No obstante, la realización de estudios epidemiológicos de calidad científica resulta muy complicada por diversas razones, entre las que cabe señalar las tres siguientes:

- La dificultad de medir la exposición externa e interna a un determinado agente químico.

- La imposibilidad de controlar la exposición simultánea a otros compuestos químicos o la influencia de factores ambientales o fisiológicos, que pueden afectar profundamente al transcurso de la enfermedad.
- El largo periodo de latencia que puede transcurrir entre la primera exposición y el desarrollo de la enfermedad.

Por todas estas razones, sólo en algunos casos como, por ejemplo, para el humo del tabaco, la evidencia epidemiológica de asociación causal no admite dudas.

NOTA DE LOS AUTORES

Esta obra corresponde a los *APUNTES DE CLASE* utilizados por los alumnos de las Licenciaturas de Farmacia, Biológicas, Química y Bioquímica, que han cursado la disciplina de *Toxicología General*, bajo nuestra enseñanza durante los cuatro últimos cursos.

Estos *Apuntes de Ciencia Toxicológica* se han venido gestando a lo largo de 20 años, en tanto que la disciplina se impartía a los alumnos de la Licenciatura de Farmacia. Durante varios cursos, las explicaciones de clase han tenido como base principal el excelente texto del profesor Manuel Repetto, *TOXICOLOGÍA FUNDAMENTAL*, que edita Díaz de Santos, y que figura como libro de referencia en la bibliografía de consulta incluida al final de estos *apuntes*.

Algunos de los temas aquí tratados han sido desarrollados de acuerdo con los conocimientos toxicológicos aportados por el profesor Repetto en su libro, a quien los autores quieren expresar su profundo agradecimiento y admiración.

J. Bello - A. López

Teratogénesis

- Concepto de teratogénesis, toxicología del desarrollo, toxicología de la reproducción
- Desarrollo histórico
- Principios que rigen la teratología
- Principales factores que modulan la teratogenicidad
- Manifestaciones de las alteraciones en el desarrollo
- Evaluación de la teratogenicidad: ensayos con animales, métodos *in vitro*, estudios epidemiológicos
- Principales xenobióticos teratogénicos

Concepto de teratogénesis, toxicología del desarrollo, toxicología de la reproducción

La palabra *Teratología* proviene de la raíz griega *teras*, que significa malformación o monstruosidad, y en un principio, se entendía como el estudio de los defectos anatómicos congénitos. Sin embargo, durante la década de los años setenta se acuñó el término *Toxicología del desarrollo* con la finalidad de ampliar el concepto toxicológico para que los efectos nocivos considerados no sólo abarquen a las malformaciones estructurales o anatómicas, sino también alcancen a situaciones de retraso mental o a cualquier otra alteración funcional, que se produzca durante el periodo de desarrollo del embrión y feto.

Con el término *teratogénesis* se nombra el proceso por el que se producirían las malformaciones y los compuestos químicos capaces de inducir malformaciones se denominan *teratógenos*.

En definitiva, se trata de aquella parte de la Toxicología que se ocupa de la identificación de los agentes físicos y químicos capaces de alterar el desarrollo normal del embrión, así como de los mecanismos de acción, de las patogénesis que conducen a dichas alteraciones y también de los riesgos que conlleva la exposición del ser humano a dichos agentes.

Durante el embarazo se producen unos cambios fisiológicos en la mujer, que afectan a las interrelaciones con el feto a través de la placenta. Además, también pueden ocurrir modificaciones en los sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo de los compuestos que recibe, sobre todo en lo que puede hacer referencia a la biotransformación de los xenobióticos. Como bien se sabe, la placenta desempeña un papel esencial en la toxicidad de algunos xenobióticos, o de sus metabolitos, al regular el flujo sanguíneo y, por tanto, el transporte de los xenobióticos que porta.

Recientes estudios estadísticos han puesto de manifiesto que menos del 50 % de los embarazos tienen como resultado final el nacimiento de niños completamente sanos. Las causas que justifican estos resultados tan poco optimistas pueden ser muy diversas: abortos espontáneos, defectos físicos más o menos importantes, bajo peso, funciones neurológicas anormales, mortalidad infantil, etc. En su mayor parte, responden a una serie de anomalías de etiología desconocida, aunque al menos un 15-25 % parece que responden a causas genéticas. No obstante, la proporción de defectos congénitos atribuidos a una exposición de tipo químico responde a una fracción muy pequeña, que probablemente venga a ser el 1 % del total.

Como en la actualidad existe bastante evidencia acerca de los efectos nocivos de algunos xenobióticos sobre el tejido testicular, no es de extrañar que tales efectos se reflejen en la descendencia. Evidentemente, los efectos directos sobre el espermatozoides constituyen un factor primordial que puede causar toxicidad embrionaria, junto a otros que también pueden tener una contribución no desdeñable. La tendencia moderna presta una especial atención de los efectos sobre la reproducción a través de la vía masculina. Por esta razón, se puede hablar en sentido más amplio de *Toxicología de la reproducción* en lugar de *Toxicología del desarrollo*.

Desarrollo histórico

Desde luego, los defectos de nacimiento ya eran conocidos desde la más remota antigüedad y en la primitiva cultura griega se pensaba que surgían como una consecuencia de traumas físicos, tal como sostenían Hipócrates o Aristóteles. Sin embargo, las bases experimentales de la Toxicología del desarrollo no se inician hasta los principios del siglo XIX, con estudios en los que se emplean huevos de aves, de anfibios o de reptiles; mientras que las primeras experiencias con mamíferos son llevadas a cabo ya en pleno siglo XX.

La primera epidemia humana de malformaciones congénitas debidas a un agente ambiental aparece en 1941, cuando en Austria se pudo relacionar la incidencia del virus de la rubéola con algunos de los defectos presentados por algunos niños cuando nacen: problemas de vista, oído, corazón o retraso mental. A pesar de ello, el impacto que tuvo sobre las medidas a tomar para la prevención de tales riesgos fue más bien escaso. Hay que esperar a la década de los 60 para

que el tema adquiriera una especial relevancia, cuando la elevada incidencia de malformaciones congénitas en niños fue asociada con la ingestión de talidomida por parte de las madres durante su embarazo. El problema fue objeto de numerosos estudios, que plantearon la necesidad de incluir ensayos específicos en los estudios toxicológicos de los nuevos compuestos químicos, con la finalidad de poder establecer los probables efectos sobre el desarrollo del embrión.

Las experiencias con animales en las que fueron investigados más de tres mil compuestos químicos pusieron de manifiesto que el 63 % de ellos no eran teratogénicos, el 7 % lo eran solo en una especie animal, mientras que un 21 % lo eran en la mayoría de las especies animales ensayadas y sólo había un 9 % que ofrecían resultados equívocos.

Las observaciones sobre seres humanos han permitido señalar varios factores y compuestos químicos que han demostrado cierta capacidad para alterar el desarrollo prenatal. Entre todos ellos, se pueden destacar los siguientes:

- *Radiaciones*: ambientales y terapéuticas.
- *Agentes infecciosos*: virus de la rubéola, citomegalovirus, el protozoo de la toxoplasmosis, la bacteria de la sífilis, el virus del herpes humano, etc.
- *Desequilibrios metabólicos maternos*: diabetes, alcoholemia, hipertenсия, deficiencia en ácido fólico, enfermedades reumáticas, etc.
- *Compuestos químicos*: talidomida, tetraciclina, dietilestilbestrol, compuestos organomercuriales, litio, plomo, etanol, cocaína, óxido de etileno, compuestos retinoides, el anticoagulante cumarínico warfarina, algunos compuestos de actividad anticancerígena como la aminopterina o la ciclofosfamida, etc.

Principios que rigen la teratología

De acuerdo con las conclusiones aportadas por el conjunto de estudios y observaciones disponibles, Wilson estableció en 1959 los principios generales que habrían de regir la ciencia teratológica, y que siguen vigentes en la actualidad:

1. La susceptibilidad a la teratogénesis depende del *genotipo* del embrión y de la manera en que interacciona con los factores ambientales adversos.
2. Esta susceptibilidad también varía de acuerdo con la *fase del desarrollo* en la que se encuentre el embrión en el momento de producirse la exposición a los agentes adversos.
3. Las manifestaciones vinculadas al desarrollo anormal *incrementan* su frecuencia y grado a medida que aumenta la dosis de exposición.
4. Los agentes teratogénicos actúan a través de *mecanismos* específicos sobre las células y tejidos en desarrollo, dando lugar a una secuencia de sucesos anormales que desarrollan una patogénesis.
5. El acceso de los agentes adversos a los tejidos en desarrollo depende de la propia *naturaleza* del agente.

6. El desarrollo anormal del embrión puede conducir a cuatro tipos de *manifestaciones*: malformación anatómica, déficit funcional, retraso mental y muerte.

Principales factores que modulan la teratogenicidad

Diversos factores deben ser tenidos en cuenta cuando se trata de determinar las propiedades teratogénicas de las sustancias químicas:

Susceptibilidad de la especie

No todas las especies son igualmente sensibles a los efectos teratogénicos de un determinado compuesto químico. Estas diferencias interespecíficas se deben indudablemente a factores genéticos, aunque también se observa a menudo una variabilidad de respuesta entre especies congénicas, que no puede ser atribuida a la constitución genética. Las diferentes características en relación con la reproducción de algunas especies animales se presentan en la Tabla 8.1.

Las variabilidades intra- e inter-específicas se pueden manifestar de diversas maneras: un compuesto que es teratogénico en una especie puede tener un efecto muy leve, o incluso ninguno, sobre otra especie distinta:

- Puede dar lugar a anomalías completamente diferentes según la especie sobre la que actúen.
- Puede producir defectos similares en dos especies, aunque con una frecuencia muy desigual.

Tabla 8.1. Características de la reproducción de algunas especies.

Especies	Tamaño carnada	Ciclo reproductivo			Desarrollo embrionario	
		Tipo	Duración (días)	Madurez sexual (días)	Implantación (días)	Duración Gestación (días)
Ratón	11	Estro	4-5	28-49	4,5-5	19
Rata	10	Estro	4-5	46-53	5,5-6	22
Conejo	7	Estro	15-16	120-240	7	30
Gato	4	Estro	14-28	210-245	13-14	65
Perro beagle	6	Estro	150-200	270-425	13-14	63
Cerdo	10	Estro	19-23	200-210	10-12	114
Mono <i>Rhesus</i>	1	Menstrual	24-38	1642	9	165
Humana	1	Menstrual	28-29	4380-4745	6	270

La heterogeneidad de las reacciones frente a un teratógeno puede ser debida a diferencias cuantitativas en los niveles de la actividad, o bien a diferencias cualitativas marcadas por las vías metabólicas seguidas por cada compuesto químico en las distintas especies animales. Por ejemplo, en el feto humano los medicamentos se metabolizan tanto en el hígado como en tejidos extrahepáticos, mientras que en los fetos de ratas, cobayas, conejos y cerdos la actividad extrahepática no existe, o es despreciable. Así, el metotrexato es un potente teratógeno en ratas, pero en conejos se necesita una dosis 45 veces más elevada para inducir defectos; esta diferencia se explica porque en el conejo se produce una rápida degradación y excreción del compuesto, mientras que la rata es incapaz de desactivarlo por hidroxilación a través de la enzima aldehído oxidasa.

Incluso, aunque la tasa de metabolización sea semejante, los diferentes metabolitos producidos pueden dar lugar a diferencias en la respuesta teratogénica. Por ejemplo, la imipramina es teratogénica en algunas especies animales y no en otras, porque como ha sido comprobado da lugar a diferentes metabolitos, según las especies. Estos hechos incrementan los problemas inherentes a la extrapolación de los resultados de las experiencias con animales a los seres humanos.

Algunas diferencias interespecíficas, en cuanto a los efectos teratogénicos, pueden ser debidas a la accesibilidad del compuesto químico al embrión debido a que los xenobióticos pueden cruzar la placenta por diversos mecanismos. Un factor que tiene una gran importancia es la capacidad de unión del compuesto químico a las proteínas plasmáticas. La transferencia a través de la placenta está modulada tanto por las características del compuesto libre (liposolubilidad, grado de ionización o peso molecular), como por las propiedades de la placenta (flujo sanguíneo materno y fetal, metabolismo o edad de la placenta). Las características de la placenta son ya importantes por sí solas para el desarrollo fetal y constituye un órgano diana para algunos xenobióticos capaces de inducir lesiones en la misma, que finalmente desembocan en una teratogénesis. En tal sentido, se acepta que lesiones del tipo fibrosis o infarto, que afecten a la placenta en un 10 %, pueden provocar alteraciones en su desarrollo.

Se puede decir que la placenta no constituye realmente una barrera al paso de xenobióticos: la mayoría de los compuestos químicos que se administran a un animal en estado de gestación llegan al feto a una concentración significativa en un corto espacio de tiempo después de la administración. Solamente no atraviesan la placenta aquellos compuestos con un peso molecular superior a 1.000; mientras que los de peso molecular inferior a 600 lo hacen normalmente. Como la mayoría de los medicamentos tienen un peso molecular entre 250 y 400, en general no tienen dificultad en atravesarla. El resto de xenobióticos ambientales, cuyas características químicas pueden ser distintas, pueden tener un comportamiento también variable.

En los estudios de teratogénesis se han utilizado diversas especies animales con el objetivo de determinar cual es la especie que constituye el mejor modelo para predecir el riesgo de teratogénesis en el hombre. Se acepta que los estudios se deben realizar en un mamífero, aunque no existe una especie ideal; la mejor

especie sería aquella que, en cada caso, metabolice el compuesto de la misma manera que lo hace el ser humano.

Periodos críticos de susceptibilidad

No todas las fases del desarrollo embrionario presentan la misma susceptibilidad frente a la acción de los agentes tóxicos, de tal modo que los efectos resultantes pueden ser bien diferentes. Para que se produzca un efecto teratogénico, las sustancias deben ser administradas durante la organogénesis, que es la fase de diferenciación embriológica. Precisamente, el factor determinante en la teratogénesis de la talidomida fue el momento del tratamiento, más que la dosis recibida.

En el inicio, cuando tiene lugar la fase de *fertilización o preimplantación*, durante los primeros 5-14 días según las especies, apenas se dan efectos tóxicos, o al menos resulta difícil su detección. Se trata de la formación del blastocisto, integrado por unas mil células, de las que posiblemente solo tres van a dar lugar al embrión propiamente dicho. Con mayor frecuencia, los abortos o muertes embrionarias se pueden producir en esta fase de prediferenciación. A pesar de todo, algunas experiencias con animales han puesto de manifiesto algunas malformaciones fetales, como resultado de la exposición a los agentes tóxicos durante la fase de preimplantación sufrida por las hembras en gestación.

Tras la *implantación*, que según las especies puede ocurrir entre los días 5-14 de la gestación, los periodos más críticos suelen ser los de *gastrulación y organogénesis*. La gastrulación es el proceso de formación de las tres capas embrionarias a partir de las cuales se originan los distintos tejidos: ectodermo, mesodermo y endodermo. La organogénesis transcurre en el ser humano durante los días 21 a 56 de la gestación con la formación de los rudimentos de la mayor parte de las estructuras del cuerpo. Por ello, se trata de un periodo de elevado grado de susceptibilidad para que tengan lugar las malformaciones físicas.

El *periodo crítico de la organogénesis* varía entre las distintas especies y depende en parte de la longitud total de la gestación (Tabla 8.2). El factor determinante es el grado de diferenciación del tejido susceptible.

Como el desarrollo de los diferentes órganos es continuo durante la organogénesis se puede observar en ocasiones una gran especificidad en el efecto tera-

Tabla 8.2. Momentos de fases de la gestación en algunas especies de mamíferos.

	Rata	Conejo	Mono	Hombre
Formación del blastocisto	3-5	2,6-6	4-9	4-6
Implantación	5-6	6	9	6-7
Organogénesis	6-17	6-18	20-45	21-56
Duración de la gestación (días)	22	32	165	267

togénico a medida que progresa el desarrollo embrionario. Así, algunos compuestos dan lugar a distintos tipos de defectos cuando varía la pauta de tratamiento; esto se explica porque el órgano más susceptible de malformación será aquel que se encuentre en desarrollo cuando el tóxico acceda al embrión más rápidamente (Fig. 8.1).

A partir de la novena semana, comienza el *periodo fetal* en el ser humano, durante el cual se produce la diferenciación tisular, el crecimiento y la maduración orgánica. Aunque en esta fase decrece la sensibilidad a los agentes teratogénicos, sin embargo cualquier exposición a otros tipos de agentes tóxicos puede traer consecuencias importantes, por alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso central, como retraso mental, deficiencia motora, etc. Las de mayor importancia desde el punto de vista de la susceptibilidad a los efectos teratogénicos se producen en la especie humana, desde la tercera a la octava semana, cuando el embrión está experimentando las principales transformaciones morfológicas.

No obstante, en algunas ocasiones, un tratamiento con un agente teratogénico presenta más de un periodo de máximo efecto. Los compuestos que se absorben, metabolizan y eliminan del organismo con rapidez, ejercen su actividad cuando son administrados durante el periodo de organogénesis; en cambio, aquellos otros que se absorben, o se metabolizan, de modo lento puede que no manifiesten efectos teratogénicos si se administran durante dicho periodo. Este factor constituye un posible fallo en el diseño de los experimentos de teratogé-

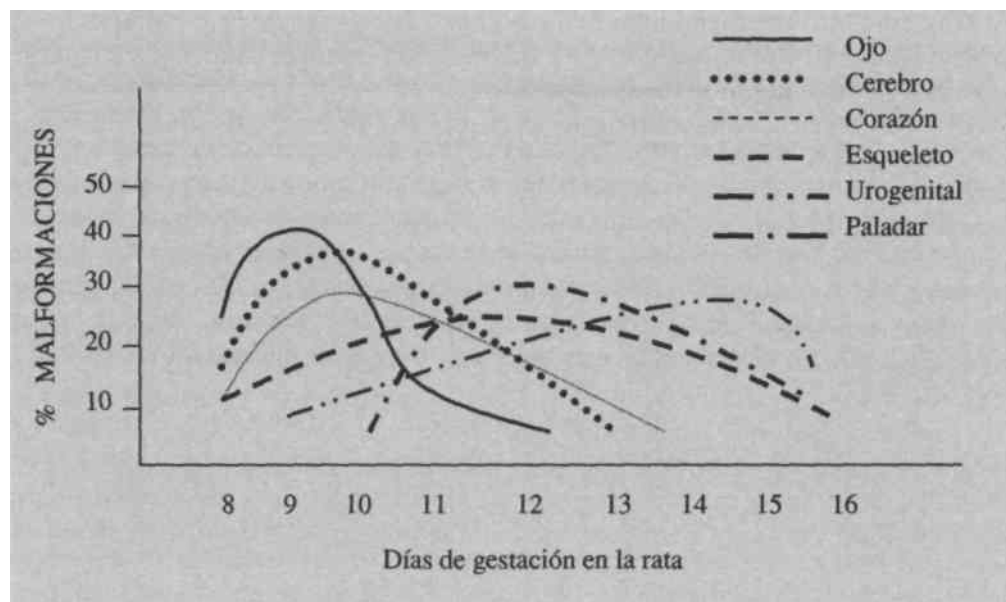


Figura 8.1. *Porcentaje de malformaciones en distintos órganos de acuerdo con los días de gestación.*

nesis y puede dar lugar a la obtención de falsos negativos. Así por ejemplo, para ver el efecto de una determinada avitaminosis en el desarrollo embrionario, se debería retirar la vitamina de la dieta antes de la organogénesis con el fin de dar tiempo a que se produzca la correspondiente carencia y se dé una situación de verdadera deficiencia durante el periodo crítico de la organogénesis. Algunos compuestos manifiestan efectos teratogénicos cuando son administrados en los primeros días de la gestación, ya que requieren un tiempo de bioactivación: dactinomicina, ciclofosfamida, óxido de etileno etc. Otros en cambio producen anomalías cuando se administran en fases tardías, como por ejemplo 6-aminonicotinamida, que produce defectos oculares cuando se administra a ratas en el día 20 de la gestación.

Dependencia de la dosis

En la teratogenicidad también se pueden obtener curvas dosis-respuesta, como ocurre con otras evaluaciones toxicológicas; sin embargo, la curva muestra generalmente una pendiente muy pronunciada. La relación dosis-respuesta tiene una importancia capital para determinar si verdaderamente se trata de un efecto teratogénico. La teratogénesis es un tipo de *efecto tóxico con umbral*, es decir, existe una dosis por debajo de la cual no hay efecto teratogénico a diferencia de la mutagénesis y carcinogénesis que se consideran sucesos estocásticos. Este hecho tiene una gran importancia para la evaluación de riesgos ya que para la teratogénesis, tanto la incidencia como la severidad de las malformaciones se restringen conforme disminuye la dosis y, por debajo de la dosis umbral, no se producen efectos; mientras que para la inducción mutagénica decrece el riesgo tóxico a medida que se reduce la dosis.

Para un determinado compuesto, las dosis teratogénicas se sitúan dentro de un margen muy estrecho entre las que no producen ningún efecto y las que matan el feto. Es posible que las alteraciones en el desarrollo y la muerte fetal representen simplemente distintos grados de reacción frente al mismo estímulo; el embrión tendría una dosis umbral por encima de la cual se producirían daños irreparables, que darían lugar a una malformación o a la muerte del embrión de un modo secundario. No obstante, no siempre suele darse la correlación entre teratogénesis y letalidad, e incluso para algunos compuestos como ciclofosfamida o 6-aminonicotinamida, parecen ser sucesos perfectamente distinguibles.

También, algunos compuestos muestran una curva dosis-respuesta con meseta. Así por ejemplo, la administración intraperitoneal de 200 mg/kg de 5-clorodesoxiuridina a ratones hembras gestantes da lugar a un 40 % de fetos malformados, pero esta frecuencia no cambia con dosis de dos a tres veces superiores.

Como regla general, la administración de una dosis tóxica de un teratógeno puede dar lugar a una descendencia con diversas posibilidades: en parte normal, en parte con malformaciones, en parte muerta y en parte aparece reabsorbida. Si

la dosis es muy alta puede que toda la progenie muera; si la dosis es muy baja puede no detectarse ningún efecto en los fetos. Actualmente, se tiende a pensar que existe un verdadero riesgo teratogénico cuando a dosis no tóxicas para el adulto sí acaece una alteración en el desarrollo.

No cabe duda que, la toxicidad ejercida por un compuesto químico sobre la madre puede afectar al desarrollo embrionario; sin embargo, no se trataría propiamente de un riesgo teratogénico, puesto que ocurre a dosis capaces de ocasionar otros tipos de efectos. Por tanto, existirá un mayor riesgo teratogénico cuanto mayor sea la separación entre las dosis que inducen teratogénesis y las dosis tóxicas para el organismo materno.

Otro factor a tener en cuenta es la *duración del tratamiento*. En general, las pautas agudas de administración conllevan una mayor agresión teratogénica que los regímenes crónicos. En algunos casos, se ha demostrado que una inducción de los sistemas enzimáticos responsables de la metabolización del compuesto reduce el efecto teratogénico al favorecer su eliminación.

También hay que tener en cuenta la *vía de administración y el vehículo* o disolvente utilizado, ya que la respuesta teratogénica puede variar. Las diferencias en las respuestas se deben sobre todo a variaciones en la absorción debido a diversas causas: la concentración del compuesto, duración de la exposición, tasa de liberación, metabolismo, etc. Incluso aunque se utilice la misma vía, se han descrito diferentes respuestas de acuerdo con el modo de administración; por ejemplo, para la vía oral existen diferencias si el agente se administra con la dieta o a través de sonda nasogástrica.

La *administración conjunta* de dos o más compuestos puede conducir a la aparición de un efecto teratogénico nuevo. Por ejemplo, la administración por separado de 10 mg/kg de ciclofosfamida y 5-fluorouracilo en ratas produce malformaciones en el 26 % y 10 % de los casos respectivamente; sin embargo, administradas conjuntamente a las mismas dosis, las malformaciones alcanzan el 100 %. Aunque este tipo de efectos sinérgicos son muy frecuentes en experiencias con animales, también deben ser tenidos en cuenta para la especie humana porque, generalmente, suele estar expuesta a mezclas de compuestos químicos.

Mecanismos teratogénicos

El término mecanismo debe ser entendido aquí como el conjunto de eventos que, a nivel celular, inician un proceso que conduce a un desarrollo anormal de órganos y tejidos. Las secuelas que los efectos de diversos factores dejan sobre las células de tejidos y órganos, y que se ponen de manifiesto a través de anomalías, se denominan patogénesis.

El mismo Wilson estableció en 1977 una relación de los posibles mecanismos implicados en los procesos teratogénicos: mutaciones, roturas cromosómicas, alteraciones de la mitosis, alteración de la integridad de los ácidos nucleicos

o de sus funciones, reducción en el suministro de sustratos o de sus precursores, modificaciones en las propiedades de las membranas, desequilibrio osmótico, inhibición enzimática, etc. En resumen, se pueden dar diversos mecanismos moleculares y celulares.

Los rápidos avances de la biología molecular, y sus técnicas relacionadas, han permitido una mejor comprensión de todos los mecanismos involucrados en la teratogénesis. Sin embargo, todavía queda bastante por conocer en esta área, que sin duda progresará a medida que lo haga la Embriología.

La toxicidad de un xenobiótico a nivel celular puede conducir a una alteración del desarrollo mediante un daño, que puede ser debido a un efecto directo sobre el embrión o el feto, pero sin descartar la posibilidad de un efecto indirecto del agente tóxico sobre la fisiología de la madre o sobre el funcionamiento de la placenta o, incluso, de combinación de ambas cosas. Así, una reducción del flujo sanguíneo en el útero, la anemia materna, un estado nutritivo anormal, la diabetes, cualquier función orgánica alterada, etc., pueden ser factores inducidos, o exacerbados, por los agentes tóxicos y su repercusión sobre el desarrollo fetal dependerá del historial genético materno, edad, estado de salud, etc.

La distinción entre los efectos directos e indirectos es de verdadera importancia para interpretar de modo adecuado los resultados que aportan los tests de evaluación llevados a cabo con animales hembras en gestación.

Influencia de la toxicidad materna

Para una evaluación de los efectos tóxicos sobre el embrión resulta esencial poder distinguir cuando los efectos se deben a una acción directa del compuesto químico sobre el embrión y cuando la toxicidad es secundaria o coexistente con la toxicidad materna. Sin embargo, no siempre es posible, porque los ensayos normalizados exigen alcanzar una dosis que sea tóxica para la madre, con objeto de maximizar la detección de la toxicidad en la descendencia.

Los procesos que pueden verse afectados en los animales hembras suelen ser diversos: *a)* el apareamiento y, por consiguiente, la fertilidad, *b)* la ovulación, *c)* la implantación, *d)* a través de una acción directa sobre la madre se puede producir un aborto o bien un retraso en el parto, *e)* inhibición de la secreción láctea materna tras el parto, lo que repercutirá en el crecimiento postnatal.

Desde el punto de vista del riesgo tóxico, lo que interesa realmente determinar es la dosis que afecta al desarrollo embrionario sin perturbar a la madre. Es decir, es preciso aclarar si el producto químico induce una toxicidad sobre el desarrollo embrionario de una manera selectiva. En este sentido, la respuesta selectiva para el feto sólo ocurre en una proporción del 10 % o menor, pues la mayoría de los compuestos posibles son tóxicos solamente para la madre (15 %) o para ambos (75 %) (Fig. 8.2).

Para expresar la relación entre la toxicidad materna y la toxicidad sobre el desarrollo se han propuesto diversos procedimientos. Uno de ellos es la determi-

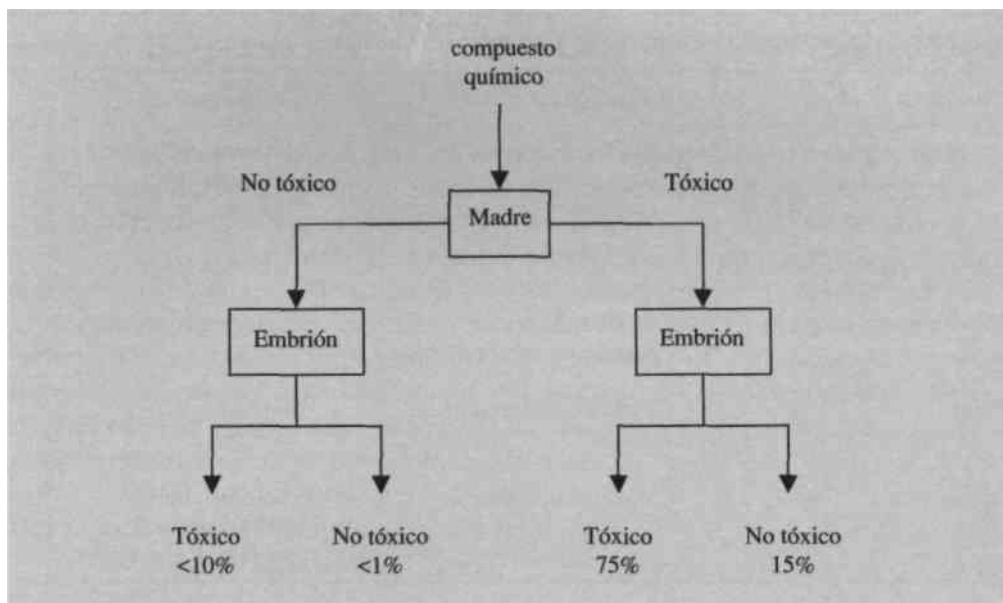


Figura 8.2. *Respuesta selectiva del feto a la toxicidad materna.*

nación de la relación A/D, siendo A la dosis NOAEL o LOAEL materna y D la dosis LOAEL o NOAEL embrionaria. La extrapolación de estos cálculos ha sido utilizada para realizar las estimaciones de riesgo. Se estima que aquellos compuestos con una relación A/D próxima a 1 serían poco peligrosos, mientras que valores de 2, 3, o superiores deben ser considerados como muy peligrosos al ser muy selectivos en la producción de ese tipo de toxicidad. Así por ejemplo, la relación A/D para la talidomida es de 60.

Incidencia de la toxicidad en el sexo masculino

Existen otros parámetros en relación con la reproducción con posible relevancia para la especie humana y que pueden ser estudiados mediante experiencias con animales. La toxicidad de un compuesto químico puede incidir en el sexo masculino a distintos niveles: *a)* afectación del ciclo reproductivo, que puede tener como consecuencia la producción de menos esperma o de peor calidad, *b)* lesión anatómica del tejido testicular, *c)* pérdida de libido, *d)* impotencia.

A pesar de que cada una de ellas puede tener como consecuencia una disminución de la fertilidad, sin embargo, la evaluación de la toxicidad embrionaria vinculada a un tratamiento químico se suele llevar a cabo solamente con animales hembras, porque en cierto modo se considera que los efectos sobre el feto tienen lugar a través del organismo materno. Si bien esto es cierto, también hay que tener en cuenta el papel del animal macho en las fases de pre- y perifertili-

Tabla 8.3. Alteraciones en el desarrollo a través de la vía masculina.

Compuesto	Animales	Ser humano
Alcohol	Malformaciones. Bajo peso. Disminución de la carnada.	Malformaciones. Bajo peso. Síndrome del alcohol fetal.
Agentes quimioterapéuticos		Malformaciones.
Ciclofosfamida	Malformaciones. Alteración comportamiento.	Malformaciones.
Plomo	Déficit comportamiento.	Malformaciones. Abortos.
Dioxina	Malformaciones.	Malformaciones. Muerte neonatal. Problemas aprendizaje.

zación, por la repercusión que pueden tener en el desarrollo embrionario. En este sentido, existe cierta evidencia del acceso de los compuestos químicos al tejido testicular, y algunos datos experimentales demuestran que la exposición del animal macho a ciertos compuestos químicos también puede afectar a su descendencia (Tabla 8.3).

Manifestaciones de las alteraciones en el desarrollo

Existen cuatro tipos de manifestaciones de alteraciones en el desarrollo embrionario: malformaciones, retraso en el crecimiento, letalidad embrionaria y alteraciones funcionales.

Malformaciones

Los compuestos teratogénicos pueden aumentar la frecuencia de *malformaciones* espontáneas, o bien inducir algunos tipos de malformaciones que no se dan de forma espontánea. El efecto inicial teratogénico ocurre probablemente a través de una muerte celular programada, o apoptosis, o de alguna alteración en la tasa de crecimiento celular; sin embargo, la deformidad resultante representa la consecuencia no sólo de esta primera lesión, sino también de los procesos de regeneración que se inician como consecuencia de esa agresión. Se reserva el término *deformación* para aquellas alteraciones ocurridas en la forma, o en la estructura, de un órgano producidas exclusivamente por factores mecánicos.

En todas las especies existe una incidencia natural de malformaciones congénitas, conocidas como malformaciones espontáneas, que es una característica de cada especie y pueden ser el resultado de una conjunción de factores tanto genéticos como ambientales. La frecuencia de malformaciones espontáneas varía según las especies; así por ejemplo, es más elevada en ratones y conejos y más reducida en ratas y monos *rhesus*.

También la incidencia de los tipos de malformaciones varían entre las distintas especies. Aunque la mayoría ocurren en casi todas las especies animales, la frecuencia con la que se da un determinado tipo de malformación depende de la especie. En este sentido, los defectos oculares son muy frecuentes en ratones, mientras que los defectos craneofaciales son más habituales en conejos; en cambio, las ratas tienen una baja incidencia de malformaciones espontáneas sin que predomine ningún tipo en especial, salvo quizás algunas que afectan al esqueleto.

Con frecuencia, las malformaciones inducidas por compuestos químicos muestran una distribución bilateral, aunque no faltan algunas excepciones, como es el caso del óxido nitroso, que provoca malformaciones en las extremidades del lado izquierdo de ratas y ratones, o del nitrofenol que origina hipoplasias del pulmón izquierdo en ratones y del pulmón derecho en las ratas.

Los compuestos teratogénicos conocidos producen un patrón de defectos congénitos más o menos específico: bien pueden producir un efecto único y típico, o bien dan lugar a todo un síndrome de malformaciones, aunque con un cierto grado de uniformidad, si es que se trata realmente de una teratogénesis química.

Retraso en el crecimiento

El tamaño fetal es un parámetro muy importante para evaluar el potencial teratogénico de un compuesto químico. Como regla general, cualquier teratógeno clásico produce retrasos en el crecimiento, además de las malformaciones.

Letalidad embrionaria

Es otro tipo de efecto tóxico que afecta al desarrollo. Cuando ocurre en los primeros días de la gestación en los animales, el embrión muere, se reabsorbe, y en su lugar queda únicamente el sitio de la implantación (glándula metrial); sin embargo, en la especie humana puede tener lugar un aborto espontáneo, que normalmente se expulsa del útero antes de haber transcurrido veinte semanas. Cuando la muerte ocurre en etapas más avanzadas de la gestación, el feto no puede ser reabsorbido completamente y el resultado es por tanto un feto muerto, tanto en animales como en el ser humano. En ambos casos se trata de respuestas tóxicas del embrión o feto.

La mortalidad puede ser ocasionada por una acción directa del compuesto químico sobre el embrión, con independencia de que esté malformado o no, o puede ser consecuencia de los efectos sobre la madre. Distinguir uno y otro caso es prácticamente imposible.

Alteración funcional

En los momentos actuales, se presta una mayor atención al tipo de alteraciones no estructurales, que pueden producir los compuestos químicos cuando se administran en el periodo prenatal. Son alteraciones que afectan a la habilidad motora, capacidad de aprendizaje, de emoción, etc.; a veces se habla también de alteraciones del comportamiento. Algunos datos indican que si se produce la exposición a ciertos productos químicos durante periodos críticos de la fase fetal, se pueden producir alteraciones específicas en el comportamiento, como una consecuencia de las modificaciones ocurridas en el desarrollo de los sistemas específicos de neurotransmisores. Algunas alteraciones ocurren con dosis presumiblemente teratogénicas, mientras que otras acontecen a niveles mínimamente teratogénicos o claramente subteratogénicos. Algunos ejemplos de compuestos que producen efectos en el comportamiento de los animales son: aspirina, hidroxiurea, azacitidina, fenitoína etc.

La parte de la Toxicología que se ocupa de este tipo de efectos se la conoce con varios nombres: Toxicología del desarrollo funcional, Teratología funcional o, incluso, Psicoteratología. En un principio, no se evaluaban los efectos funcionales porque el protocolo estándar sobre teratogénesis no incluía la evaluación postnatal, sin embargo últimamente sí se incluyen entre los tipos de efectos- que es necesario examinar para efectuar la evaluación completa de un compuesto químico sobre la reproducción, como es el caso de los medicamentos. Algunos compuestos químicos como el alcohol, mercurio inorgánico, plomo, anticonvulsivos o la hipervitaminosis A, tienen este tipo de efectos sobre el ser humano.

Evaluación de la teratogenicidad

Desde el punto de vista de la protección de la salud pública es importante conocer los datos acerca del comportamiento tóxico de los compuestos sobre el desarrollo, y para ello se disponen de tres tipos diferentes de metodologías: ensayos con animales, métodos *in vitro* y estudios epidemiológicos.

Ensayos con animales

Los ensayos con animales de laboratorio para evaluar la toxicidad de los xenobióticos químicos sobre la reproducción se realizan tanto con fines regula-

dores, para la comercialización de medicamentos y otros productos químicos, como en investigación para comprender los mecanismos de toxicidad. La tragedia de la talidomida supuso el verdadero comienzo del desarrollo de los tests de toxicidad de la reproducción. Antes de 1960 los únicos estudios realizados hacían referencia a la toxicidad crónica durante 6 semanas de un reducido grupo de compuestos y abarcaba a dos generaciones de roedores machos y hembras; al final de las experiencias sólo se valoraba el número de fetos muertos. En el año 1966, la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos elaboró unas guías con unos protocolos de ensayo (de segmento I, de segmento II y de segmento III) para aplicar a un rango de compuestos mucho más amplio.

Estas guías han sido básicamente aceptadas en todo el mundo por otros cuerpos reguladores, y durante unos 30 años no han sufrido modificaciones. Sin embargo, la experiencia acumulada durante todo este tiempo, junto con un mejor conocimiento de los procesos reproductivos, ha propiciado que en estos últimos años se hayan revisado dichos procedimientos y diseñado otros (Tabla 8.4). Por otra parte, el incesante crecimiento de los costos de la experimentación animal, la duplicación de estudios debido a los distintos requerimientos en diferentes países industrializados y la creciente internacionalización de la industria far-

Tabla 8.4. Ensayos *in vivo* de evaluación de la toxicidad reproductiva.

Ensayo	Parámetros que se evalúan
<i>Segmento I</i> Test de fertilidad y de reproducción	Capacidad reproductiva de hembras y machos (desarrollo de los gametos, fertilidad, viabilidad pre y post-implantación, parto y lactancia)
<i>Segmento II</i> Test de teratogenicidad	Viabilidad y morfología (externa, visceral y esquelética) del feto inmediatamente antes del nacimiento
<i>Segmento III</i> Test perinatal	Supervivencia postnatal, morfología externa y crecimiento
<i>ICH 4.1.1</i> Protocolo de fertilidad masculina	Similar al estudio de segmento I pero mejorando la evaluación de los parámetros de toxicidad
<i>ICH 4.1.2</i> Efectos sobre el desarrollo prenatal y postnatal, incluyendo funciones maternas	Similar al estudio de segmento III
<i>ICH 4.1.3</i> Efectos sobre el desarrollo embrionario y fetal	Similar al estudio de segmento II

macéutica, han favorecido la celebración de unas Conferencias Internacionales de Armonización (ICH), sobre distintos aspectos de los requerimientos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano, como consecuencia de las cuales se han llegado a aceptar unas nuevas guías para la evaluación de la toxicidad reproductora. Su principal característica es que permiten una mayor flexibilidad en cuanto a la estrategia y protocolos experimentales, siempre en función de las características particulares del compuesto a estudiar.

En cuanto a la especie animal, no existe *a priori* ninguna que constituya el modelo ideal para predecir el riesgo en el ser humano. Hasta el momento, se han utilizado ratas, ratones, conejos, hámsters, cobayas, gatos, perros, cerdos, monos e incluso hurones, que parecen ser bastante útiles para estudios de comportamiento. En cada caso, se deberá elegir aquella en la que el compuesto se distribuya, metabolice y atraviese la placenta de la manera más similar a cómo ocurre en la especie humana.

En el diseño del protocolo de ensayo conviene tener en cuenta las alteraciones que en la toxicocinética del compuesto se pueden dar como consecuencia de la gestación. Toda gestación implica en la madre una serie de cambios fisiológicos orientados a proporcionar al feto los nutrientes esenciales y eliminar sus productos de desecho (Tabla 8.5).

Entre los factores que pueden afectar a la accesibilidad del compuesto químico al feto se pueden señalar los siguientes: *a)* diferente absorción en la madre, *b)* aumento en la madre de la fracción de compuesto no unido a proteínas, *c)* aumento del volu-

Tabla 8.5. Cambios fisiológicos durante la gestación que pueden alterar la toxicocinética.

Parámetro fisiológico	Cambio
Absorción	
<i>Tiempo del vaciado gástrico</i>	Aumento
<i>Función pulmonar</i>	Aumento
<i>Gasto cardíaco</i>	Aumento
<i>Flujo sanguíneo hacia la piel</i>	Aumento
<i>Motilidad intestinal</i>	Disminución
Distribución	
<i>Volumen plasmático</i>	Aumento
<i>Contenido de agua</i>	Aumento
<i>Grasa corporal</i>	Aumento
<i>Proteínas plasmáticas</i>	Disminución
Excreción	
<i>Flujo sanguíneo renal</i>	Aumento
<i>Tasa de filtración glomerular</i>	Aumento
<i>Función pulmonar</i>	Aumento
<i>Proteínas plasmáticas</i>	Disminución

men plasmático materno, *d*) alteración del aclaramiento hepático, *é*) aumento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular, *f*) transferencia placentaria, *g*) posible metabolismo placentario, *h*) el flujo sanguíneo placentario, *i*) el pH de la sangre materno-fetal, *j*) aumento de la fracción libre de compuesto en el feto, *k*) circulación preferente en el feto hacia corazón y cerebro, *l*) ausencia de barrera hematoencefálica en el feto, *m*) deficiente actividad enzimática en el hígado fetal. Lo deseable en un modelo experimental sería conseguir que las concentraciones plasmáticas en los animales de experimentación fueran comparables a los niveles terapéuticos alcanzados en el ser humano.

Entre los sistemas alternativos propuestos para afinar en el uso de los animales de experimentación, reducir su número o reemplazar, existe un test *in vivo* desarrollado por Chernoff y Kavlock en el año 1982, que ha sido bastante aceptado como alternativa o prescreening al ensayo de segmento II de teratogénesis. En este ensayo, se les administra el compuesto durante la organogénesis a ratones o ratas gestantes y se mide la viabilidad y crecimiento postnatal.

Los datos obtenidos en los estudios realizados con animales sirven, en primer lugar, para clasificar un compuesto químico como teratógeno o no; en segundo lugar, para obtener una dosis NOAEL (o dosis más alta que no produce un incremento significativo en los efectos adversos en la descendencia), que pueda ser usada en los procesos de evaluación de riesgo sobre la posibilidad de que se produzcan ese tipo de efectos adversos en el ser humano, bajo unas determinadas condiciones de exposición.

Los niveles aceptables de exposición varían, lógicamente, de acuerdo con la naturaleza del compuesto químico y con la finalidad de uso, en función de que se trate de un medicamento, un pesticida, un aditivo alimentario, etc.; y dentro de cada categoría, con el tipo de beneficio que se espere obtener.

Métodos in vitro

Debido en parte a la imposibilidad de realizar una completa evaluación de la toxicidad sobre el desarrollo embrionario de los miles de compuestos nuevos que continuamente están apareciendo, se están poniendo a punto y validando una serie de ensayos *in vitro* de screening, que utilizan sistemas de cultivo de células, órganos o embriones.

- Los estudios con *órganos* o con *embriones*, abarcan el mayor rango de eventos que tienen lugar durante el desarrollo de los mamíferos, y son muy válidos para el estudio de la teratogénesis. Sin embargo, no resultan apropiados para poder evaluar un gran número de compuestos, ya que son técnicamente complicados, relativamente caros y utilizan un número bastante elevado de animales.
- Los sistemas con *cultivos celulares* no son los más adecuados para evaluar la teratogenicidad y han recibido muchas críticas.

- Los sistemas que utilizan especies de *subvertebrados* ofrecen la ventaja de ser muy rápidos y baratos; entre ellos se ha utilizado mucho un pólipo de agua dulce (*Hydra attenuatá*), en un ensayo diseñado específicamente para estimar el riesgo teratogénico con una exactitud considerada superior al 90 %.

De los aproximadamente veinte modelos *in vitro* descritos, ningún sistema puede hoy día reproducir completamente el intercambio dinámico que existe entre el embrión y la madre. No obstante, pueden ser muy útiles para descartar compuestos que no van a requerir más ensayos con animales, para seleccionar el rango apropiado de dosis para ensayos posteriores o, sencillamente, para algunos datos sobre los miles de compuestos a estudiar.

Estudios epidemiológicos

Desde el punto de vista de la salud pública, además de datos con animales y sistemas *in vitro*, se necesitan datos sobre la población humana, es decir estudios de tipo epidemiológico, para evaluar el riesgo que conlleva la exposición a los productos químicos bajo unas determinadas condiciones conducentes a efectos tóxicos sobre el desarrollo.

La epidemiología reproductiva se puede definir como el estudio de la posible asociación estadística entre la exposición a un compuesto químico por parte del padre, o de la madre embarazada, y las consecuencias de todo el proceso de gestación reflejadas en el hijo nacido.

Aquellos casos particulares en los que existe un riesgo elevado y el tipo de efecto que se produce es un suceso raro (como puede ser la talidomida o la infección por rubéola), no necesitan de la realización de estudios formales epidemiológicos para identificar la causa que ha originado los defectos natales. En cambio, para otras situaciones hay que buscar esta posible asociación mediante estudios de casos y controles o de cohortes. Ambos tipos de estudios epidemiológicos requieren, disponer de muestras muy numerosas para poder detectar un riesgo más elevado en la población expuesta que en la no expuesta, además de una evaluación exacta tanto de las alteraciones embrionarias (efecto) como de la exposición. Así por ejemplo, para detectar un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de espina bífida en hijos de madres expuestas a ácido valproico, se estimó que sería necesario monitorizar más de un millón de nacimientos en la población de los Estados Unidos, en donde la frecuencia de exposición era inferior al 1 por 1.000 embarazos y el riesgo era solamente del doble sobre la población no expuesta.

Otro inconveniente de la aplicación de la epidemiología a los estudios sobre la reproducción es el alto porcentaje de embarazos malogrados, quizás superior al 31 % antes de la implantación y un 15 % adicional detectable clínicamente. Por lo tanto, la incidencia de recién nacidos con alguna alteración puede no ser

un reflejo de la verdadera tasa de anormalidades. Estos y otros factores hacen sumamente difícil el abordaje epidemiológico de la Toxicología de la reproducción, lo que explica la carencia existente en este campo toxicológico de tales tipos de estudios.

Principales xenobióticos teratogénicos

Diversos son los compuestos químicos considerados como teratógenos humanos (Tabla 8.6) y entre los cuales se encuentran unos pocos que han adquirido especial relevancia:

- Un compuesto sedante: la talidomida.
- Un estrógeno no esteroideo sintético: el dietilestilbestrol.
- Un anestésico local con propiedades vasoconstrictoras: la cocaína.
- Una vitamina retinoide: el ácido 13-*cis*-retinoico.
- Un compuesto anticonvulsivo: el ácido 2-propil-pentanoico (ácido valproico).
- Un componente de algunas bebidas: el etanol.

Talidomida

Este agente sedante fue introducido en 1956 como remedio contra las náuseas y vómitos provocados por los embarazos, puesto que hasta ese momento no había demostrado efectos tóxicos aparentes en las experiencias efectuadas a niveles terapéuticos con diferentes especies de animales; solamente había manifestado neuritis periférica en pacientes que la usaban en periodos prolongados de 18 meses. Sin embargo, su empleo por las madres gestantes dio lugar

Tabla 8.6. Algunos compuestos químicos considerados teratógenos humanos.

Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico	Litio
Ácido valproico (anticonvulsionante)	Mercurio (orgánico)
Aminopterina (anticancerígeno)	Metimazol (antitiroideo)
Bifenilos clorados	Óxido de etileno
Captopril	Penicilamina (quelante)
Ciclofosfamida (anticancerígeno)	Plomo
Cocaína	Talidomida
Colchicina	Tetraciclina (antibiótico)
Dietilestilbestrol	Trimetadiona (anticonvulsionante)
Difenilhidantoína (anticonvulsionante)	Vinblastina (anticancerígeno)
Etanol	Vincristina (anticancerígeno)
Humo del tabaco	Warfarina (anticoagulante)

al nacimiento de niños con claras malformaciones, que afectaba de manera principal al desarrollo anormal de los miembros superiores y, en menor cuantía de los inferiores, acompañadas en muchas ocasiones por enfermedades congénitas del corazón, ojos e intestinos. A pesar de los numerosos estudios que se han realizado para aclarar el tipo de mecanismo implicado en sus efectos nocivos, ninguno ha sido considerado totalmente satisfactorio: alteraciones bioquímicas que afectan a las vitaminas B, al ácido glutámico, a los ácidos nucleicos o a la fosforilación oxidativa; mecanismos de muerte celular; inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos y nervios; etc. No obstante los estudios recientes acerca de los efectos de la talidomida sobre el sistema inmune y la angiogénesis han abierto las puertas para su aplicación a otras enfermedades.

Dietilestilbestrol

Estrógeno sintético no esteroideo, que fue muy empleado en los Estados Unidos entre los años 1940 y 1970 como un remedio preventivo de los abortos espontáneos al estimular en la placenta la síntesis de estrógenos y progesterona. Sin embargo, por esas fechas fueron detectados carcinomas de vaginas en mujeres jóvenes, cuyas madres habían sido tratadas con este compuesto durante el primer trimestre de embarazo. Investigaciones más profundas pusieron de manifiesto que el riesgo de formar adenocarcinomas en cuello del útero, o en vagina, era solamente de 0,14-1,40 por 1.000, pero el de provocar alteraciones benignas en el aparato genital alcanzaba un 75 %.

Cocaína

Alcaloide vegetal derivado de la coca, que ha sido empleado desde un punto de vista farmacológico como interruptor de la transmisión nerviosa, al bloquear de modo rápido los canales de sodio. En cambio, su consumo abusivo como droga a partir de la década de los años 80 ha planteado un problema epidémico sanitario, de modo particular en lo que se refiere a la incidencia en mujeres embarazadas, por su repercusión sobre el desarrollo del feto. No obstante, resulta muy dificultoso el establecer sus verdaderos efectos nocivos, debido a los diferentes factores que concurren: situación socioeconómica, uso de tabaco, alcohol y otras drogas, etc. Por ello, no es nada fácil identificar y cuantificar su papel en los cambios neurológicos en el feto, así como las alteraciones del comportamiento en el niño. A pesar de todo, la exposición a la cocaína por parte de madres embarazadas ha sido asociada a toda una plétora de efectos adversos: desgarro de la placenta, alteración del desarrollo encefálico, escaso peso al nacer, síndromes neurológicos en el neonato, síndrome de muerte súbita infantil, malformaciones congénitas del tracto genitourinario, etc.

Retinoides

Desde la década de los años cincuenta se conoce que la ingestión de un exceso de retinol puede inducir malformaciones en cara, miembros, corazón y sistema nervioso durante el desarrollo del embrión. Años más tarde, fue demostrado que también el ácido retinoico podía inducir efectos semejantes en el ratón y en el hámster. Como durante unos años se ha aplicado el ácido 13-cis-retinoico para el tratamiento del acné recalcitrante, se han podido observar graves efectos nocivos en niños, que han sufrido la exposición a este compuesto durante su periodo fetal en el seno de su madre.

Ácido valproico

Este medicamento anticonvulsivo, comercializado en Europa a partir de 1967 y en los Estados Unidos a partir de 1978 para el tratamiento de mujeres epilépticas, fue relacionado en 1982 con la incidencia de casos de espina bífida, por sus efectos tóxicos durante el primer trimestre de gestación del feto. A pesar de los trabajos que han sido realizados, todavía se ignora el mecanismo implicado con su actividad tóxica.

Etanol

Al principio de la década de los años 70 fue descrito el síndrome alcohólico fetal con el que se ponía de manifiesto efectos teratogénicos inducidos por la ingestión de etanol por parte de las madres gestantes. Más tarde, fueron concretados varios de sus efectos: retrasos en el crecimiento, tanto uterino como postnatal, así como desarrollo psicomotor e intelectual retardado, además de otras anormalidades inespecíficas. Se ignora a través de que mecanismos ejerce el etanol sus efectos teratogénicos, aunque sí se ha observado un exceso de células muertas entre las poblaciones celulares sensitivas.

La respuesta tóxica del hígado

- Introducción
- Anatomía y funciones fisiológicas
- Agentes hepatotóxicos
- Mecanismos implicados en la hepatotoxicidad
- Principales tipos de lesiones hepáticas
- Factores moduladores de la lesión hepática
- Evaluación de la hepatotoxicidad

Introducción

Por su situación anatómica y sus funciones bioquímicas, el hígado desempeña un papel importante en lo que respecta a las respuestas tóxicas frente a las actividades de los diferentes xenobióticos. Su estudio toxicológico implica el conocimiento previo de sus bases anatómica y fisiológica.

Anatomía y funciones fisiológicas

El hígado, que en el ser humano puede alcanzar un peso de 1.200 -1.500 gramos, ha sido descrito durante muchos años como unos lóbulos, que en los cortes histológicos ofrecen unas estructuras hexagonales regulares orientadas alrededor de las venas hepáticas terminales, o venas centrales, que recogen toda la sangre que sale del hígado. Sin embargo, la opinión admitida a raíz de los trabajos del profesor francés Coinod se le considera como un «órgano formado por ocho *segmentos hepáticos* que actúan como unidades anátomofuncionales».

Se entiende por *segmento hepático*, la cantidad de parénquima hepático que drena a una vena; en ellos se encuentran situados los hepatocitos, células responsables de las principales funciones desempeñadas en el organismo por este órgano, debido a su elevado contenido en sistemas enzimáticos implicados tanto

en el metabolismo normal de los nutrientes, como en la biotransformación de aquellos xenobióticos que han podido llegar hasta él. Los hepatocitos están dispuestos en trabéculas o hileras de células entre las cuales discurren los conductos capilares, que reciben el nombre de sinusoides hepáticos. Las células endoteliales, que constituyen las paredes de los sinusoides, son finas, alargadas y con muchos poros. El espacio que separa cada sinusoide de los hepatocitos recibe el nombre de espacio de Disse, y en él se encuentran las células Ito o células estrelladas (que sintetizan colágeno y almacenan grasas y vitamina A), y las células Kupffer (que segregan citoquinas y actúan de macrófagos). Las ramificaciones de la arteria hepática, la vena portal y los conductos biliares discurren por los denominados tractos portales.

La capacidad metabólica del hígado viene determinada por los diferentes sistemas enzimáticos aportados por mitocondrias, ribosomas y retículo endoplásmico:

- Las mitocondrias, localizadas en el citoplasma, aportan enzimas implicadas en la cadena respiratoria, en la fosforilización oxidativa, en la oxidación de los ácidos grasos y en puntos importantes del ciclo del ácido cítrico, así como en el control del metabolismo hídrico y del equilibrio iónico.
- Los ribosomas, asociados o no al retículo endoplásmico, están implicados tanto en la síntesis de proteínas, sobre todo de la albúmina, o de enzimas como la glucosa-6-fosfato, como en la combinación de triglicéridos y proteínas para formar lipoproteínas.
- El retículo endoplásmico liso (no enlazado a ribosomas), que forma estructuras vesiculares y tubulares, sintetiza sistemas enzimáticos monooxigenasa dependientes del citocromo-P₄₅₀ y monooxigenasas que contienen FAD. Aquellos xenobióticos que son inductores de enzimas suelen incrementar la proliferación de este retículo. Estrechamente asociado con él se encuentran los peroxisomas, que sintetizan peroxidasas muy implicadas en el metabolismo graso.

Tales sistemas enzimáticos presentan algunas diferencias de unas zonas a otras, que explican la susceptibilidad específica ante los efectos de las deficiencias nutricionales, de la presencia de xenobióticos o de los desórdenes circulatorios.

Entre las funciones hepáticas importantes hay que destacar dos: el metabolismo de las grasas y la formación de la bilis.

Los ácidos grasos libres (AGL) son transportados por la sangre bajo la forma de complejos no polares con la albúmina. Algunos de ellos son captados por los hepatocitos para ser enlazados dentro de las células a dos fracciones proteicas diferentes: la proteína Y, que apenas es específica, y la proteína Z, con algo más de especificidad. El tratamiento con sustancias hipolipídicas aumenta la concentración hepática de proteína Z y, con ello, se reduce la secreción por el hígado de lipoproteínas VLDL y se rebajan los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos.

La mayor parte de los AGL son transformados en lípidos complejos, tales como fosfolípidos, ésteres de colesterol, triglicéridos y glucolípidos, que son usados por las células para su mantenimiento y crecimiento; aunque también bastantes de ellos son incorporados a las lipoproteínas y excretados a la circulación sanguínea por la vía de los espacios perisinusoidales.

El hígado sintetiza colesterol, lo esterifica y lo convierte parcialmente en ácidos biliares, que segrega con la bilis; bajo esta forma esterificada se suele encontrar en hígado, plasma, glándulas adrenales y piel; en cambio, formando parte de las membranas y de la bilis se halla de modo exclusivo bajo su forma libre.

La bilis es una solución acuosa compleja formada por componentes orgánicos e inorgánicos, que facilita la emulsificación y absorción de los lípidos ingeridos con la dieta. El hígado conjuga los ácidos biliares con la glicina y la taurina para dar lugar a las denominadas sales biliares, que son segregadas en el intestino. A menudo, estos ácidos biliares desempeñan un papel importante en el transporte hepatobiliar de los xenobióticos, puesto que en el caso de existir una formación alterada o su concentración sea insuficiente, se dificulta la eliminación de aquellos xenobióticos cuya excreción dependa de tales ácidos.

Agentes hepatotóxicos

Por su posición anatómica y fisiológica, el hígado desempeña diversas funciones importantes para la vida de un organismo: homeostasis de nutrientes, síntesis de moléculas esenciales (proteínas, colesterol, hormonas esteroideas, bilis, etc.) y procesos bioquímicos de metabolización de xenobióticos. Cualquiera de estas funciones puede verse afectada por una exposición, aguda o crónica, a un agente tóxico. Unas veces, sólo se perturbarán alguna de estas funciones, mientras que en otras pueden ser alteradas varias de ellas, bien de modo simultáneo o bien de modo secuencial.

Debido a su capacidad metabólica y a su posición en el sistema circulatorio, el hígado desempeña tales funciones en el organismo que le hace ocupar un lugar importante en el ámbito de aquellos procesos toxicológicos que afectan al ser humano. En principio, cualquier xenobiótico que sea absorbido en el tracto gastrointestinal ha de pasar por este órgano antes de pasar a la circulación sistémica.

La actividad nociva sobre el hígado ejercida por algunos compuestos industriales y agentes terapéuticos es un hecho bien conocido en la actualidad y, en consecuencia, existe la tendencia a limitar, o a prohibir, sus usos. Han sido reconocidos como tales agentes muchas de las sustancias empleadas en las actividades industriales (tales como el tetracloruro de carbono, C_1Cl_4 , aplicado entre otras cosas como desengrasante en los talleres de automóviles, o el cloruro de vinilo, $\text{CH}_2=\text{CHCl}$, utilizado en las industrias de plásticos) y medicamentos, como el paracetamol, ciclosporina A, isoniazida, el analgésico halotano, las

tetraciclinas, la metildopa, los esteroides inhibidores de la ovulación, etc., además de otras sustancias como etanol, aflatoxinas, etc.

No cabe duda, que muchos xenobióticos tienen capacidad para ocasionar una cierta variedad de procesos tóxicos con efectos eventuales muy diversos. Y este es el caso de los xenobióticos hepatotóxicos, diferentes unos de otros en las consecuencias a que dan lugar. Algunos ocasionan un daño directo sobre las células hepáticas, bien por su afinidad específica por la membrana hepatocelular, bien por su preferencia por algunos de los componentes celulares; otros, en cambio, han de experimentar primero una bioactivación metabólica para ser convertidos en estructuras tóxicas capaces de promover el daño correspondiente.

Así mismo, cabe distinguir dos tipos diferentes de sustancias que son capaces de promover algún perjuicio tóxico en el hígado:

- Los denominados *intrínsecos*, que corresponden a estructuras químicas que ocasionan daños hepáticos siempre similares, aunque actúen sobre diversas especies animales.
- Los considerados *impredecibles*, porque solamente resultan tóxicos para un cierto porcentaje de individuos de una población

A pesar de las estrictas regulaciones legales, tanto los seres humanos como los animales continúan expuestos a la acción hepatotóxica de muchos agentes a través de los alimentos y bebidas.

Precisamente, el estudio de los efectos provocados por los agentes hepatotóxicos mediante las nuevas técnicas de la biología molecular, las pruebas inmunológicas, etc., ha permitido una mejor comprensión de las funciones realizadas por el hígado y también de la naturaleza de los daños que le afectan. En cierto sentido, estos tipos de tóxicos han constituido una *herramienta* muy útil para profundizar en el conocimiento de este ámbito de la Toxicología.

Aunque con relativa frecuencia se califica a un producto químico de hepatotóxico, sin embargo éste concepto resulta bastante difuso porque el hígado puede responder de maneras muy diversas a las agresiones, agudas o crónicas, de los productos químicos. Así por ejemplo, aunque un elevado consumo de etanol se considera una causa importante de la cirrosis hepática, todavía se ignora por qué las mujeres resultan más vulnerables que los hombres a los efectos nocivos de este compuesto. También se conoce la existencia de muchos factores que justifican por qué el hígado es un objetivo diana de algunas toxinas específicas, por encima de otros órganos corporales; sin embargo, todavía se desconocen otros muchos factores responsables de la hepatotoxicidad de una estructura química o, al menos, de la intensidad variable con la que provoca el daño.

Mecanismos implicados en la hepatotoxicidad

Algunos xenobióticos que penetran en el organismo tienen la capacidad de alterar los procesos adaptativos del mismo y provocar una cierta variedad de

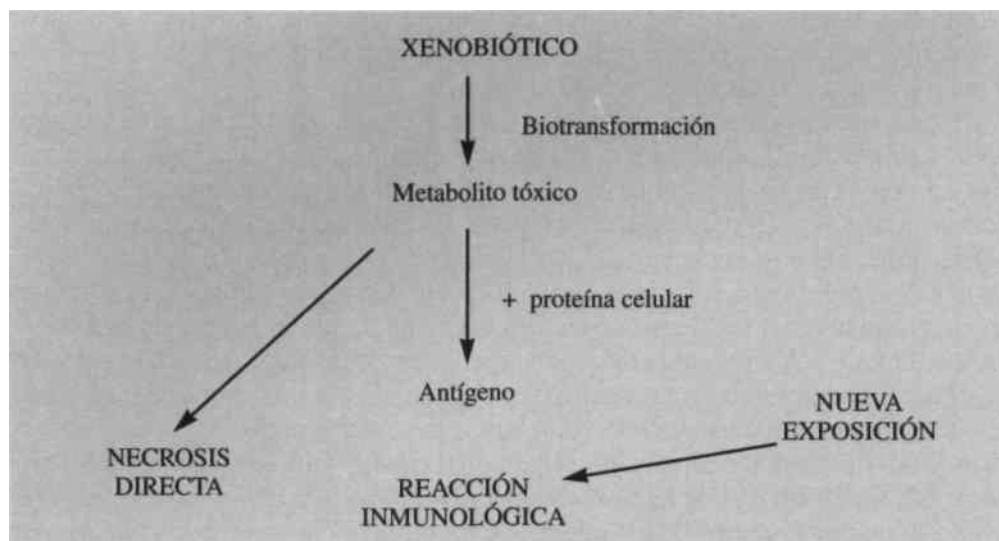


Figura 9.1. *Esquema de las diversas posibilidades hepatotóxicas de un xenobiótico.*

fenómenos tóxicos, según actúen sobre las membranas o sobre algunos de los componentes celulares, con unos efectos eventuales variables según los casos (Fig.9.1).

Esta circunstancia hace que, en la práctica resulte muy difícil clasificar los agentes hepatotóxicos de acuerdo con sus mecanismos de actuación, porque no siempre se dispone de una información completa acerca de los mismos. Por esta razón, algunos autores se limitan a una clasificación basada en los aspectos morfológicos. No obstante, parece que lo más acertado será tomar como base los dos aspectos, mecanístico y morfológico.

El daño que los xenobióticos pueden inducir sobre los hepatocitos puede aparecer como el resultado de una secuencia de eventos, que puede tener lugar tanto dentro del hígado como en alguna otra parte del organismo:

1. Absorción del compuesto primario y detoxificación.
2. Bioactivación de la molécula primaria absorbida y aparición de un daño celular temprano.
3. Aparición de cambios, que pueden ser tanto reparables, como irreversibles.
4. Manifestación de daños celulares, seguidos en algunas ocasiones de muerte celular.

Durante las décadas pasadas se ha prestado especial atención al papel que la bioactivación podía desempeñar en la inducción del daño celular. Como resultado pudo ser comprobado que algunos xenobióticos eran bioactivados, muchas veces a través de reacciones catalizadas por los sistemas monooxigenasa cito-

cromo P₄₅₀, dando lugar a estructuras intermediarias, capaces de formar enlaces covalentes con algunas de las macromoléculas hepatocelulares, y la consiguiente interferencia con las funciones de las células.

Como ejemplo bastante elocuente se puede citar a la molécula aceto-amino-fenol (paracetamol), un producto analgésico y antipirético, cuya ingestión masiva suele ser la causa de algunas muertes por suicidio, y que también es consumido de modo crónico por algunas personas. El compuesto puede ser eliminado por la orina, al conjugarse con ácido glucurónico o con radicales sulfatos, debido al grupo polar fenol que tiene en su molécula. Estas dos son las vías principales de eliminación o detoxificación. Sin embargo, también puede ser bioactivado mediante oxidación catalizada por algunas enzimas microsomales, para dar lugar a un metabolito con carácter tóxico que, en el caso de haber una escasez de glutatión para conjugarle, puede enlazarse a las macromoléculas de los hepatocitos y ocasionar una necrosis, con ligera esteatosis e inflamación, para desembocar a largo plazo en una hepatitis crónica (Fig. 9.2).

En la práctica, dentro de los agentes hepatotóxicos denominados *intrínsecos* existen dos tipos, que se diferencian en el modo de ocasionar sus efectos nocivos:

- *Directos*, que dan lugar a lesiones primarias como resultado de haber provocado perturbaciones en el metabolismo celular. Cabe citar como ejemplos el fósforo y el ácido tánico.
- *Indirectos*, que ejercen sus efectos al interferir con el metabolismo celular, de tal modo que la célula pierde finalmente su integridad. Así pueden actuar algunos esteroides anabólicos, los esteroides contraceptivos y el ácido litocólico. También en este grupo se pueden incluir aquellas sustancias cuyos efectos nocivos sobre el hígado lo ejercen a través de mecanismos inmunológicos: cuando el hígado sufre una segunda exposición, el xenobiótico es reconocido como un antígeno por el sistema inmune.

Los mecanismos implicados en el desarrollo del daño hepatotóxico se pueden reunir en tres grupos:

Mecanismos bioquímicos

Algunas estructuras de xenobióticos son convertidas por la actividad de enzimas microsomales en derivados reactivos, que se pueden enlazar a las macromoléculas esenciales de las células hepáticas y originar una necrosis. Este es el ejemplo del paracetamol ya mencionado. Por lo general, la conjugación de metabolitos tóxicos suele tener lugar con el glutatión, cuya deficiencia puede ser motivo para que se produzca el daño hepático. El riesgo de necrosis se incrementa cuando puede existir un pretratamiento con inductores enzimáticos. La disparidad de daños ocasionados responde parcialmente a diferencias existente en el metabolismo del xenobiótico.

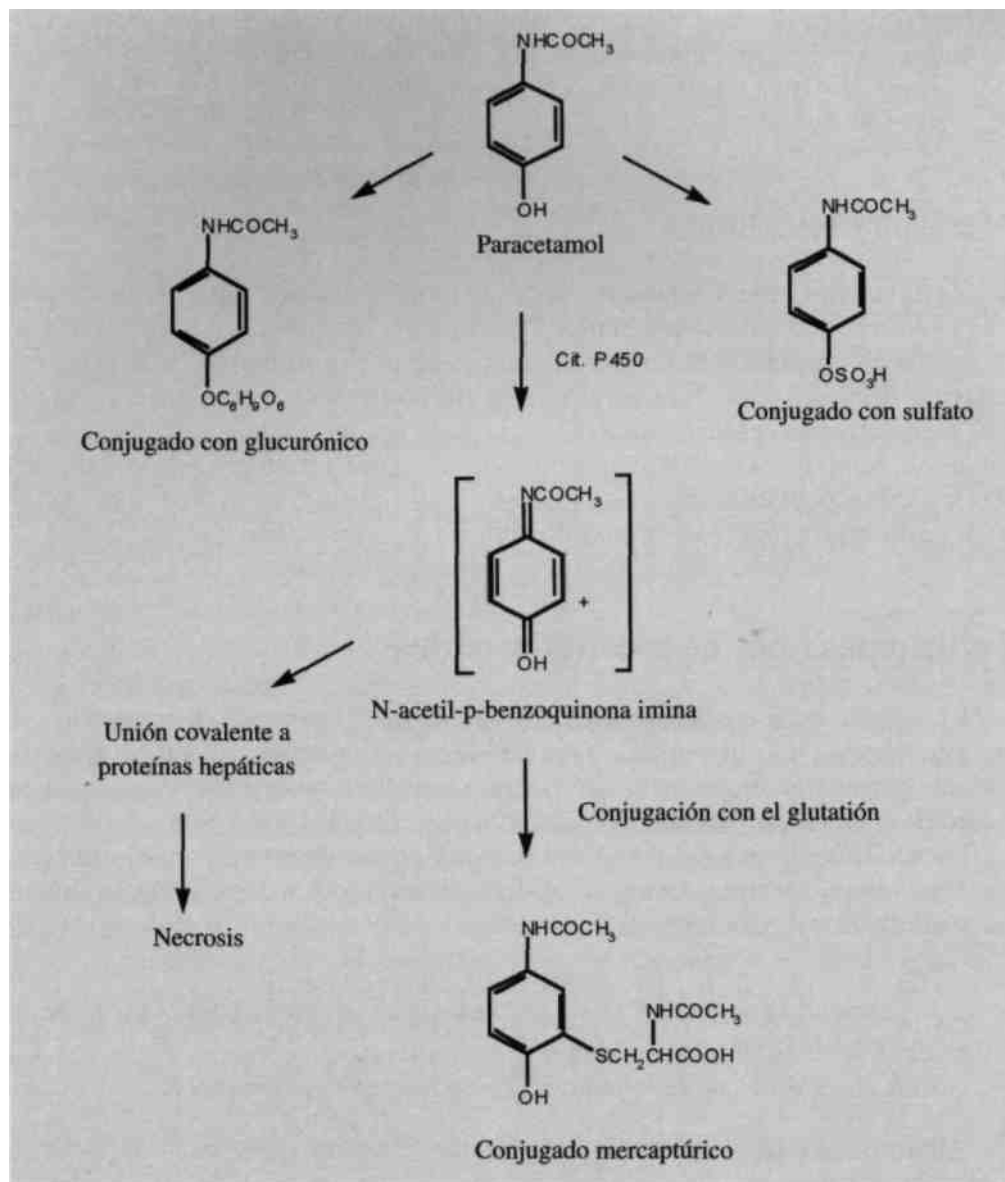


Figura 9.2. *Mecanismo de toxicidad del paracetamol.*

Mecanismos inmunológicos

Tanto el xenobiótico, como alguno de sus metabolitos, pueden enlazar con los compuestos de la membrana hepatocelular y desarrollar unas propiedades antigénicas capaces de sensibilizar a los linfocitos. Una segunda exposición al xenobiótico puede incitar una reacción inmunológica retardada y desembocar en

una necrosis hepatocelular. Por ello, las diferencias vinculadas a los procesos de biotransformación desempeñan un papel importante, como ocurre con la metabolización oxidativa del anestésico halotano, capaz de conducir a un estado de hipersensibilización.

Mecanismos colestáticos

Algunas estructuras xenobióticas presentan una toxicidad que, de modo primordial, se centra en las membranas intracelulares, dando lugar a una colestasis con reducción del flujo biliar, a inhibiciones de la bomba Na^+/K^+ y de la hidroxilación del colesterol. Tal ocurre con la clorpromazina, componente de algunos medicamentos antirreumáticos, antitiroideos, antiarrítmicos, citostáticos y laxantes. También los contraconceptivos orales y los esteroides anabólicos sintéticos, con sustitución en el C_{17} , pueden inhibir el flujo de la bilis y la excreción de aniones orgánicos, como bilirrubina y las sales biliares.

Principales tipos de lesiones hepáticas

El hígado, y de modo particular el parénquima altamente diferenciado, es muy vulnerable a la actividad tóxica de algunos xenobióticos, porque precisamente dicho parénquima es el que permite al órgano desarrollar sus funciones específicas de biotransformación metabólica, secreción y excreción.

La actividad tóxica de tales xenobióticos puede desembocar en la atrofia, degeneración y necrosis, aunque el tipo de respuesta a la agresión química puede depender de tres factores:

- La intensidad de la agresión, determinada por la dosis.
- La población de células afectadas, que pueden corresponder a los hepatocitos o las células sinusoidales.
- Las características de la exposición, según sea aguda o crónica.

Algunos tóxicos producen lesiones hepáticas muy específicas de algunas zonas: las aflatoxinas, muy cancerígenas, provocan tumores a partir de los hepatocitos, mientras que el cloruro de vinilo lo hace a partir de los sinusoides. Otros, como el etanol, actúan de manera secuencial o en combinación: en las primeras fases de abuso del alcohol se produce en el hígado una acumulación de lípidos, principalmente por una alteración de la síntesis de las lipoproteínas encargadas de su transporte fuera del órgano; pero a medida que progresa la enfermedad se produce la muerte de muchos hepatocitos, cuya masa es sustituida por tejido fibroso no funcional. En consecuencia, se reduce la capacidad del hígado para biotransformar algunos medicamentos y xenobióticos. También una exposición aguda al disolvente tetracloruro de carbono trae como primera con-

secuencia una acumulación grasa en el hígado, mientras que la exposición crónica lleva a la necrosis hepática.

Las funciones hepáticas resultan alteradas cuando los xenobióticos interfieren con los procesos metabólicos hepatocelulares o con la secreción de la bilis. El hecho de proceder de exposiciones agudas o crónicas marca el tipo de lesión que se pueda desarrollar.

Las exposiciones agudas pueden dar lugar a dos tipos de lesiones:

1. Lesiones citotóxicas agudas.
2. Lesiones colestáticas.

Las exposiciones crónicas ocasionan otros cuatro tipos diferentes:

3. Desórdenes hepáticos crónicos.
4. Lesiones hepáticas vasculares.
5. Tumores.
6. Lesiones granulomatosas.

Lesiones citotóxicas agudas

Desde el punto de vista de efectos agudos se pueden considerar cuatro tipos de lesiones citotóxicas: cambios grasos, degeneración parenquimatosa, degeneración hidrópica y muerte celular.

- Dentro del metabolismo de las grasas, el hígado ocupa una posición clave de tal manera que cualquier cambio en el mismo conduce a un incremento del contenido graso de las células parenquimales del hígado. Así, un hígado normal suele contener un 5 % de grasa, pero puede alcanzar hasta un 50 %, bajo la forma de triglicéridos, cuando se lesiona gravemente en este sentido.

Desde el punto de vista bioquímico, se define como *graso* aquel hígado cuyo contenido en materia grasa supera la cifra normal del 5 %. Sin embargo, desde un punto de vista histológico el tema se centra en las células parenquimatosas hepáticas, a las que se aplica el término de *cambios grasos* cuando llegan a ser visibles al microscopio. Los hepatocitos que contienen un exceso de grasa se caracterizan por manifestar múltiples vacuolas que desplazan al núcleo hacia la zona periférica de la célula. La palabra esteatosis hace referencia a un concepto inespecífico y se suele relacionar con efectos tóxicos directos de algunos xenobióticos como fósforo, arsénico, cobre y tetracloruro de carbono.

- La denominada *degeneración parenquimatosa* es una forma más suave de degeneración hepática. En ella, el hígado aparece hinchado y en su citoplasma se observan unas granulaciones eosinófilas finas como resultado del abultamiento de las mitocondrias.

- Cuando el daño hepatocelular llega a ser muy severo, se da una captación de agua que, a veces, se acompaña de proteínas plasmáticas y puede ocasionar una hinchazón bastante considerable, llegando a superar en varias veces el volumen inicial. En estos casos se habla de una *degeneración hídrica*.
- Muchos xenobióticos pueden provocar la *muerte* de las células del parenquima hepático, lesión que a menudo se acompaña de una degeneración y una esteatosis. La muerte celular se puede producir por necrosis y por apoptosis. Las células necrosadas pueden persistir durante días y se pueden detectar por métodos histológicos, ya que mantienen sus estructuras durante un cierto tiempo; cuando la muerte afecta a un gran número de células también se puede detectar bioquímicamente porque, al romperse la membrana celular, se liberan enzimas citosólicas (transaminasas y lactato deshidrogenasa) con aumento de su concentración en plasma.

Todas estas lesiones citotóxicas se producen en el hígado como consecuencia de una exposición aguda a tetracloruro de carbono, halotano, salicilatos, acetaminofenol, tetraciclinas, además de algunos agentes citostáticos, antituberculosos y antiinflamatorios.

Lesiones colestáticas

La *colestasis canalicular* es una denominación que hace referencia a una mayor lentitud, o retraso, en el flujo biliar como resultado de un daño en el paso de la bilis o de una perturbación en la conjugación y transporte de la bilirrubina.

Desde un punto de vista fisiológico se define como una reducción en el volumen de bilis producido que, por consiguiente, se traduce en la secreción modificada de algunos de sus componentes específicos: bilirrubina, colesterol, ácidos biliares. Bioquímicamente se caracteriza por un incremento en el plasma "sanguíneo de sustancias que, en condiciones normales, se excretan con la bilis: bilirrubina, ácidos biliares, sales biliares. Cuando se reduce la excreción de bilirrubina, el pigmento se acumula en los ojos y la piel, apareciendo una ictericia. Como una baja concentración de sales biliares a nivel intestinal reduce la absorción de las grasas, las vitaminas liposolubles y el calcio, tiene como consecuencia que, en estos casos, las heces adquieran un aspecto pálido y grisáceo. Por otra parte, la lentitud del flujo biliar origina una acumulación de los pigmentos biliares en los canalicúlos, hepatocitos y células de Kupffer. Su detección histológica resulta difícil y requiere estudios de ultraestructura, que son los que permiten visualizar la dilatación de los canalicúlos biliares.

Son muy variados los xenobióticos que ocasionan este tipo de lesión: manganeso, etanol, estrógenos, la faloidina de la *Amanita phalloides*, pero sobre todo los medicamentos neurolépticos que llevan clorpromazina y los inmunosupresores que llevan ciclosporina A. Estas colestasis inducidas por tales xenobióticos

pueden resultar tanto transitorias como crónicas y cuando son intensas se asocian con una necrosis celular.

Otra variedad de este tipo de lesión es la *colestasis colangiodestructiva*, debida de modo específico a una lesión de los conductos biliares intrahepáticos. Desde un punto de vista histológico, el daño se caracteriza por unas lesiones iniciales:

- Hinchazón de los conductos biliares.
- Restos de células dañadas en la luz de los conductos biliares.
- Infiltración de células inflamatorias en el tracto portal.

Un índice bioquímico de gran utilidad es la liberación de enzimas localizadas en los conductos biliares, de modo especial la fosfatasa alcalina. Además se encuentran elevados los niveles de la bilirrubina y de los ácidos biliares. La administración crónica de los xenobióticos responsables conlleva una proliferación de los conductos biliares y la aparición de fibrosis. El caso más relevante fue producido por la metilendiamina, utilizada para la fabricación de resinas epoxi, que en 1966 fue la responsable de un brote de ictericia en Inglaterra.

Desórdenes hepáticos crónicos

Los desórdenes hepáticos provocados por xenobióticos que responden a una toxicidad crónica son diversos, entre los que cabe destacar los siguientes: la hepatitis activa, la fibrosis y la cirrosis.

La *hepatitis activa crónica* se caracteriza por presentar una extensa inflamación portal y periportal, con infiltraciones de células plasmáticas y linfocitos, por lo general acompañada de necrosis unicelular. Puede responder tanto a una etiología viral como a la actividad tóxica del etanol y de algunos medicamentos, como isoniazida, sulfonamidas, etc. El síndrome se desarrolla cuando el tratamiento terapéutico se realiza de un modo continuado.

La *fibrosis* se define como la presencia de un incremento de fibras de colágeno y reticulina de nueva formación, resultado de la actividad de fibroblastos, aunque en el proceso también pueden intervenir otros tipos de células, tales como lipocitos. Por lo general, la nueva formación de tejido conectivo suele estar precedida de lesiones, más o menos intensas, de necrosis parenquimal.

La *cirrosis* responde a un proceso difuso caracterizado por fibrosis y transformación de la estructura normal del hígado, que es irreversible y tiene mal pronóstico. Puede ser provocado por el etanol, el arsénico o por una ingesta masiva de vitamina A.

Como ya se ha visto con otras lesiones, el alcohol actúa a través de sucesivas etapas en las que, de modo progresivo, la masa de tejido funcional es sustituida por tejido fibroso no funcional. Su estadio final sería la cirrosis hepática en la

que este acumulo de tejido fibroso resulta verdaderamente importante. Bajo estas condiciones, el organismo es incapaz de eliminar el amoníaco proveniente del catabolismo de las proteínas y de la rotura de la hemoglobina, e incluso puede complicarse con hemorragias incontroladas, debidas a una síntesis deficiente de los factores de coagulación.

Lesiones hepáticas vasculares

Algunas estructuras químicas, como las que corresponden a los compuestos contraceptivos orales, estrógenos o andrógenos, originan de modo específico lesiones vasculares, que pueden ocurrir en los sinusoides o en los grandes vasos de los seres humanos y también se ha observado en roedores. En realidad debe ser considerado como un efecto secundario de la actividad tóxica de algunos xenobióticos sobre los hepatocitos.

Al ser afectados los sinusoides, pueden aumentar de tamaño los poros de las células endoteliales y permitir el paso de eritrocitos al espacio de Disse, en donde quedan atrapados. De este modo resulta obstruido el hígado y el resto del organismo entra en un shock. Tales efectos nocivos ocurren con la administración de dosis elevada de paracetamol.

Otra forma de lesión vascular es la que responde a una destrucción del endotelio de las vénulas hepáticas, lo que da lugar a una enfermedad venooclusiva por una obturación no trombótica de las vénulas hepáticas terminales. Este tipo de lesión lo produce, por ejemplo, un agente alquilante empleado en la terapia anticancerosa, la dacarbazina, cuyos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que su toxicidad selectiva por las células endoteliales se debe al desequilibrio provocado entre la bioactivación y la destoxificación del compuesto en los hepatocitos.

Tumores

El hígado presenta una gran susceptibilidad a la inducción de cáncer por un gran número de agentes carcinógenos. En este sentido, son varias las estructuras químicas, tanto de origen natural como sintéticas, que han demostrado poseer una actividad hepatocarcinogénica. Entre las sustancias naturales se encuentra la aflatoxina Bi los alcaloides pirrolizidinas, la cicasina y el safrol; mientras que entre los sintéticos se encuentran las nitrosaminas (dimetil y dietil), el DDT, los derivados bifenilos policlorados, el tetracloruro de carbono, el cloruro de vinilo y el acetilaminofluoreno.

Dentro de los tumores observados existen de dos tipos:

1. Los hepatocelulares, que derivan propiamente de los hepatocitos y son los más frecuentes.
2. Los angiosarcomas, muy raros pero muy malignos, que derivan de las células sinusoidales.

Los verdaderos tumores hepatocelulares son los carcinomas, que se caracterizan por una marcada actividad mitótica y/o invasión y/o metástasis. Algunos de estos casos en el ser humano han sido asociados con el uso de esteroides anabólicos, de estrógenos y de algunos compuestos contraceptivos.

Lesiones granulomatosas

Combinada con las lesiones colestáticas y hepatocelulares puede existir una infiltración granulomatosa del hígado como consecuencia de la exposición a algunos xenobióticos, tales como halotano, fenilbutazona, o un tratamiento prolongado con sulfonamidas. Los granulomas pueden ser observados tanto en los segmentos hepáticos como en el área portal y, por lo general, se consideran indicativos de procesos inmunológicos. En la práctica, consisten en pequeñas masas de células del sistema fagocitario mononuclear.

Factores moduladores de la lesión hepática

Muchos y variados son los factores que pueden modular el desarrollo de lesiones hepáticas provocadas por la actividad tóxica de algunos xenobióticos, todos ellos relacionados con los procesos implicados en el mecanismo de la acción tóxica. Entre ellos cabe destacar los siguientes:

Absorción favorecida

Como el hígado es la puerta de entrada de los compuestos químicos que se ingieren y absorben a nivel intestinal, los xenobióticos que han penetrado en el organismo pueden pasar muy fácilmente al interior de los hepatocitos, fenómeno que se ve favorecido cuando el xenobiótico es capaz de utilizar un medio de transporte específico. Tal ocurre, por ejemplo, con dos toxinas altamente tóxicas, como son la faloidina y la microcistina, que pueden entrar en los hepatocitos mediante un proceso de absorción preferencial a través de los transportadores sinusoidales para los ácidos biliares.

Acumulación celular

Algunas estructuras químicas, muchas de ellas nutrientes, pueden ser acumuladas bajo determinadas condiciones dentro de algunas células hepáticas específicas con efectos muy negativos.

Entre ellas destaca la vitamina A, cuya ingestión prolongada como terapia para algunos problemas dermatológicos conduce a una acumulación en las células Ito y da lugar a una hiperplasia de las mismas e inicio de una cirrosis.

También pueden presentarse problemas de citotoxicidad como consecuencia de un acumulo de cationes Fe^{3+} o Cu^{2+} en los hepatocitos. Estas células regulan la homeostasis de estos dos iones metálicos, que extraen de los sinusoides a través de sistemas de transporte mediados por receptores, y los almacenan dentro de ellas vinculados a proteínas específicas, ferritina y metalotioneína respectivamente; cuando existe un exceso también se acumulan en los lisosomas. Al ser elementos donadores de electrones en reacciones que conducen a la aparición de radicales libres, todo exceso de esos metales se traduce en una mayor actividad de tales radicales con efectos muy negativos. La distribución zonal de la citotoxicidad se atribuye a las diferencias que pueden existir en las concentraciones de cada metal en las diversas zonas celulares afectadas.

Así mismo, el óxido de torio se solía administrar a determinados pacientes como medio de contraste radioactivo hasta el año 1950, fecha en la que se descubrió que se acumulaba en las células Kupffer y era la causa del desarrollo de tumores, porque desde ellas continuaba emitiendo radiaciones a lo largo de la vida.

Deficiencia en la excreción

También cuando se producen deficiencias en la excreción de los cationes Fe^{3+} o Cu^{2+} por parte del hígado existe una acumulación de esos metales, que conduce al desarrollo de algunas enfermedades: la acumulación de hierro origina la hemocromatosis y la de cobre da lugar a la enfermedad de Wilson. Ambas enfermedades tienen un origen genético que, en el caso de la segunda citada, ha sido posible reconocer la naturaleza del defecto molecular: la incapacidad por parte de los hepatocitos para el transporte de los cationes de cobre a través de la membrana del canalículo biliar.

Desequilibrio entre los procesos de bioactivación y detoxificación

Bajo condiciones normales de sujeto y dosis baja de xenobiótico, en el hígado se encuentran perfectamente equilibrados los procesos de bioactivación (muy relacionadas con la actividad constitutiva de las enzimas de Fase I), y las de detoxificación (que implican a las enzimas de Fase II) para dar normalmente metabolitos estables no reactivos y fácilmente excretables. Sin embargo, existen factores que pueden ser los responsables de que surjan desequilibrios entre ambos procesos, con las consecuencias negativas correspondientes. Los principales factores desequilibrantes pueden ser los tres siguientes:

- a) Una carencia de agentes antioxidantes.
- b) Una saturación de reacciones enzimáticas de Fase II.
- c) Una inducción de enzimas activadores.

Estimulación de las células sinusoidales

La actividad de algunos xenobióticos puede provocar un efecto estimulador de las células sinusoidales, circunstancia que tiene su repercusión en la respuesta fibrótica del hígado. Estos tóxicos puede estimular directamente las células Ito, pero también la estimulación puede ser indirecta a través de la liberación de citoquinas por parte de las células endoteliales y Kupffer. A su vez, esta liberación de citoquinas estimula la producción de colágeno en las células Ito.

Respuesta inmune

Algunos xenobióticos pueden formar aductos con proteínas contenidas en el hígado, que pueden comportarse como antígenos ante una segunda exposición al tóxico y formar anticuerpos específicos frente a ellos, poniendo en marcha un mecanismo inmunológico que lleva a la destrucción de las propias células. Tal comportamiento ha sido bien estudiado en el caso del halotano. También, en los consumidores reiterados de éxtasis se ha observado una necrosis hepática difusa, que se atribuye a una posible causa autoinmunitaria.

Intervención de células específicas

En la actualidad se discute si en algunas ocasiones, la muerte de los hepatocitos se puede asociar con una migración de células mediadoras en los procesos inflamatorios, como linfocitos, neutrófilos, etc. No cabe duda que la afluencia de este tipo de células suele tener un efecto beneficioso al facilitar la eliminación de las células lesionadas; sin embargo, algunas particularidades observadas hacen pensar que también pueden ejercer un efecto pernicioso. Así por ejemplo, los neutrófilos activados pueden liberar proteasas citotóxicas y especies radicalarias que acentúan el cuadro tóxico, además de que todas estas células pueden liberar citoquinas, estimuladoras de la producción de colágeno en las células Ito. Existe un hecho que apoya esta visión negativa: la hepatotoxicidad aguda inducida por algunos de estos compuestos se puede reducir mediante un pretratamiento con compuestos de acción antiinflamatoria.

Evaluación de la hepatotoxicidad

La lesión hepática puede ser detectada por métodos no invasivos mediante el análisis en plasma de enzimas y otros compuestos endógenos que pueden ser utilizados como marcadores. Las enzimas más específicas para detectar las lesiones hepática son las transaminasas *alanina-amino transferasa* (ALT) y

aspartato-amino transferasa (AST), cuyas concentraciones plasmáticas pueden aumentar de modo considerable con algunas lesiones del hígado, bien sea por necrosis o por cambios en la permeabilidad de las membranas. También pueden ser analizadas otras enzimas menos específicas del hígado, como *fosfatasa alcalina* o *γ -glutamyl transpeptidasa*. Así mismo, pueden ser indicativos de lesión hepática un aumento de bilirrubina en sangre o una disminución de la concentración de albúmina o protrombina.

El aclaramiento hepático de algunas sustancias, como el *sulfato de tetrabromoftaleína* o el *verde de indocianina*, administradas por vía intravenosa, permiten realizar ensayos de valoración de la función hepática. El primero se une a la albúmina, pasa al hígado en donde se conjuga la mayor parte con el glutatión, y se excreta en la bilis; el segundo no se conjuga, se excreta exclusivamente por la bilis, y no entra en el ciclo enterohepático.

El simple *examen macroscópico* del hígado, así como la relación del peso hepático respecto al peso corporal total, pueden poner de manifiesto una toxicidad hepática. El *examen microscópico* de cortes hepáticos mediante microscopía electrónica o microscopía óptica convencional, en combinación con las modernas técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas, proporcionan una amplia información sobre las posibles lesiones hepáticas.

La respuesta tóxica del riñón

- Introducción
- Anatomía y funciones fisiológicas
- Agentes nefrotóxicos
- Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad
- Principales tipos de lesiones nefrotóxicas
- Efectos de los principales xenobióticos nefrotóxicos
- Evaluación de la nefrotoxicidad

Introducción

Como demuestran las estadísticas clínicas, el riñón viene a ser el órgano diana de muchos agentes tóxicos que provocan perturbaciones en su comportamiento fisiológico, que algunas veces se traducen en lesiones graves. La integridad funcional del riñón resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasis corporal total de los seres humanos, porque este órgano desempeña un papel primordial en una serie de funciones biológicas importantes:

- Excreción de metabolitos de desecho.
- Regulación del volumen del fluido extracelular.
- Concentración de electrolitos y equilibrio ácido-base.
- Metabolización de la vitamina D₃, pasándola a su forma activa dihidroxilada.
- Síntesis y liberación de hormonas, entre las que destacan la renina y la eritropoyetina.
- etc.

Por todo ello, no es de extrañar que cualquier daño en el sistema renal capaz de alterar algunas de estas funciones, o incluso todas, tenga una notable repercusión sobre el metabolismo global del organismo humano.

Por suerte, el riñón también dispone de una serie de mecanismos bioquímicos que permiten la destoxificación de algunos xenobióticos, además de poseer una gran capacidad compensatoria funcional y una cierta capacidad de regeneración tisular, que posibilitan la superación de ciertos tipos de daños tóxicos. No obstante, la naturaleza y gravedad de la actividad tóxica puede ser de tal índole, que la capacidad de los anteriores mecanismos se vea sobrepasada y se produzca el fallo renal. La magnitud de este fallo puede alcanzar tal dimensión que tenga como consecuencia un daño renal permanente, para cuya solución sólo existe la alternativa de tratamiento de diálisis continua o bien un transplante del órgano.

Para una mejor comprensión de los procesos que desembocan en una nefrotoxicidad con motivo de la exposición a un xenobiótico es importante tener presente los conceptos más fundamentales acerca del funcionamiento anatómico y fisiológico del riñón.

Anatomía y funciones fisiológicas

En un corte sagital del riñón se pueden observar, de un modo aproximado, tres zonas anatómicamente bien definidas:

- La corteza, o zona más externa.
- La médula, o zona más interna.
- La papila.

La corteza constituye la porción mayor del órgano y recibe un 90 % del riego sanguíneo, mientras que la médula viene a recibir un 6 % y la papila solo un 1-2 %. La unidad funcional más pequeña del sistema renal es la nefrona, que consta de varios elementos: el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal.

Los glomérulos consisten en un manojo de capilares sanguíneos, interpuestos entre las arteriolas aferentes y las arteriolas eferentes, encerrados en la cápsula de Bowman. Representan una compleja estructura capilar especializada en la filtración del 20-40 % de la sangre que penetra en el glomérulo. La filtración de las macromoléculas resulta inversamente proporcional al peso molecular (p.m.) de las mismas, de tal modo que deja pasar compuestos como la inulina, con un p.m. de 5.000, y retiene a la albúmina cuyo p.m. oscila entre 60.000 y 70.000. Como regla general, puede afirmarse que las moléculas aniónicas tienen mayor dificultad para ser filtradas que las catiónicas o neutras con un peso molecular equivalente; no obstante, los cationes y aniones orgánicos débiles suelen disponer de sistemas especializados de transporte.

La pared de los capilares glomerulares está constituida por tres capas:

- Células endoteliales, cuyos poros son de tamaño considerable (aproximadamente 5 μm), aunque a través de los cuales pueden pasar moléculas, pero no células.

- La membrana basal, que retiene las moléculas cuyo peso molecular es mayor, o semejante, al de la albúmina plasmática.
- Células epiteliales de la cápsula de Bowman, que forman una especie de red alrededor del glomérulo.

La mayor parte del trabajo de la nefrona se realiza en el túbulo proximal, donde se reabsorbe el 60-80 % del agua y solutos, aunque las funciones no tienen lugar de modo homogéneo a lo largo de todo el túbulo, sino que éste dispone de zonas en las que se da una cierta especificidad. En esta zona de la nefrona existen bastantes sistemas especializados de transporte, que necesitan un elevado aporte de energía y, por ello, las células de las paredes de los túbulos proximales disponen de una gran cantidad de mitocondrias. Esta circunstancia explica por qué los xenobióticos que afectan a la producción de energía, o a cualquiera de estos sistemas especializados de transporte, puedan dañar profundamente a la función renal.

En el asa de Henle se reabsorbe un 15-20 % del agua y un 20-30 % de los cationes Na^+ y K^+ . El resto de los cationes Na^+ se reabsorben en los túbulos distal y colector, donde se regula el volumen de orina mediante la acción de las hormonas antiuréticas, que aumentan o disminuyen la permeabilidad del túbulo colector para el agua.

La sangre llega al riñón por la arteria renal, que de modo sucesivo se ramifica en arterias de menor calibre hasta formar la arteriola aferente, que desemboca en el glomérulo. La sangre abandona el glomérulo a través de la arteriola eferente. Ambas arteriolas están enervadas por el sistema nervioso simpático y controlan la presión y el flujo sanguíneo en el glomérulo al contraerse como respuesta a diversos factores: estímulo nervioso, angiotensina, vasopresina, endotelina, etc. El filtrado que supera cada glomérulo fluye hacia el interior del túbulo proximal, que a través del asa de Henle lo conduce a los túbulos distales para desembocar finalmente en el tubo colector conectado con el uréter.

Muchos xenobióticos llegan hasta el riñón una vez que han sido conjugados con el glutatión o con la cisterna; precisamente, algunas de las sustancias consideradas como potencialmente nefrotóxicas han demostrado que usan esta ruta metabólica para llegar hasta el riñón.

Agentes nefrotóxicos

Las características anatómicas y fisiológicas del riñón le proporcionan una especial susceptibilidad frente a los efectos tóxicos de muchos xenobióticos. Aunque desde el punto de vista ponderal, este órgano solo representa un 0,5 % de la masa corporal, sin embargo recibe el 20-25 % del gasto cardíaco, de tal modo que cualquier xenobiótico presente en la circulación sistémica puede llegar al riñón en cantidades relativamente elevadas. Además, la reabsorción de agua y electrolitos en el filtrado glomerular hace que se incremente la concen-

tración del agente tóxico en el fluido tubular y pueda alcanzar niveles tóxicos. Así mismo, el incremento de concentración también puede conducir a una precipitación del compuesto, que obstruiría el túbulo renal.

Recibe el nombre de *agente nefrotóxico* «toda estructura química que, situada en el sistema renal, es capaz de producir perturbaciones y desequilibrios de tal naturaleza en sus aspectos morfológicos y fisiológicos, que conducen a lesiones del órgano más o menos graves». Unas veces, el compuesto reactivo es la estructura inicial del xenobiótico, mientras que en otros muchos casos se necesita de un proceso de bioactivación para que el compuesto resultante tenga la capacidad de ejercer una actividad nefrotóxica.

Entre los xenobióticos con los que puede contactar el organismo humano existen algunos capaces de comportarse como agentes nefrotóxicos. De una parte, la nefrotoxicidad se asocia con frecuencia al consumo continuado de diversos medicamentos, y de otra, a sustancias que proceden del medio ambiente, de acuerdo con lo incluido en la Tabla 10.1.

Tabla 10.1. **Relación de xenobióticos considerados nefrotóxicos.**

I. Agentes terapéuticos:

- a) *Analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos*: paracetamol, aspirina, indometacina.
- b) *Antibióticos*: cefalosporinas, tetraciclinas, algunos del tipo aminoglucosidos como neomicina y gentamicina.
- c) *Antineoplásicos*: cisplatino, adriamicina.
- d) *Agentes de radiocontraste*: yodo hipuramato.
- e) *Inmunosupresores*: ciclosporina A.
- f) *Otros*: sales de litio.

II. Compuestos medioambientales:

- a) *Contaminantes*: hidrocarburos halogenados, herbicidas.
 - b) *Metales pesados*: mercurio, cadmio.
 - c) *Micotoxinas*: aflatoxina Bi, ocratoxina A, citrinina.
 - d) *Disolventes orgánicos*: gasolina, tricloroetileno.
-

Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad

Los daños provocados por la actividad de los diferentes agentes nefrotóxicos suelen afectar a determinadas zonas selectivas de la estructura anatómica de las nefronas. Así, muchos de estos agentes tienen como órgano diana el túbulo proximal de la nefrona, sobre el que ejercen una acción local específica, tal como ocurre con algunos antibióticos, compuestos antineoplásicos, hidrocarburos halogenados, micotoxinas y los metales pesados; otros como los iones fluoruros suelen actuar de manera nociva sobre el asa de Henle y los túbulos

colectores; en cambio, las mezclas analgésicas, consumidas de modo crónico, lo hacen sobre la médula o sobre las papilas.

Las causas responsables de esta especificidad suelen ser bastante complejas, aunque de alguna manera intervienen las variaciones que puedan darse en diversos factores: el flujo sanguíneo; el transporte y la acumulación del xenobiótico; las propiedades fisicoquímicas del epitelio; la reactividad celular o molecular del receptor; el tipo de biotransformación que sufre el xenobiótico, según se trate de un proceso destoxicador o bioactivador; procesos energéticos y/o regenerativos de las células; etc. El transporte renal, la acumulación del agente tóxico y su metabolismo contribuyen de modo muy significativo a esa susceptibilidad renal para las lesiones tóxicas.

Aunque los glomérulos representan la primera zona de exposición al xenobiótico por parte de la nefrona, sin embargo son pocos los agentes nefrotóxicos que causan daño en este segmento. Sólo en algunos casos, la susceptibilidad de los glomérulos a la actividad de un agente tóxico puede ser atribuida a la interacción entre dicho agente y las cargas amónicas fijadas sobre los elementos glomerulares; en otros casos, parece existir una reacción anticuerpo con antígenos formados en las superficies de las células. Algunos medicamentos actúan sobre el asa de Henle, el túbulo distal o el túbulo colector, de modo particular aquellos que se asocian con una toxicidad aguda, aunque como se ha indicado, el consumo abusivo de analgésicos puede conducir a efectos nocivos crónicos sobre las papilas renales. No obstante, la zona de la nefrona que con mayor frecuencia resulta atacada por los agentes nefrotóxicos corresponde al túbulo proximal, debido tal vez a la acumulación de xenobióticos que tiene lugar en este segmento de la nefrona.

Con independencia del lugar en el que se produzca la acción tóxica, un xenobiótico puede iniciar su daño celular mediante una cierta variedad de mecanismos:

- En algunos casos, es la reactividad intrínseca de su propia estructura química con macromoléculas celulares quien puede dar comienzo a su actividad tóxica. En este sentido, se puede señalar el ejemplo del catión mercurio, capaz de enlazarse a los grupos sulfhidrilos situados en la parte superficial de las moléculas proteicas celulares.
- Por el contrario, existen xenobióticos constituidos por moléculas no tóxicas, pero que por biotransformación, bien en el mismo riñón o fuera de él, se convierten en algún compuesto intermediario reactivo, como es el caso del cloroformo. Por lo general, estos intermediarios reactivos son estructuras deficientes en electrones y, por tanto, electrofílicas, con la tendencia a recibirlos de las moléculas nucleofílicas celulares, representadas fundamentalmente por las proteínas y los lípidos. El enlace covalente, que permite la formación de estos aductos, puede interferir con las actividades biológicas normales y dar principio al daño tóxico. Algunas veces, los metabolitos formados fuera del riñón se hacen reactivos solo cuando alcanzan el túbulo proximal donde se metabolizan.

- También el daño tóxico puede ser iniciado de un modo indirecto a través de radicales libres, que pueden inducir dos tipos de reacciones con efectos negativos: *a)* peroxidaciones lipídicas, capaces de originar diversos tipos de alteraciones en la fluidez de las membranas, en la permeabilidad de las mismas, en las características del transporte a través de ellas, en las actividades enzimáticas, etc., *b)* roturas en la molécula del ADN.

Cada uno de estos eventos no sólo puede provocar un daño tóxico, sino que también puede conducir a una muerte celular. De hecho, han sido identificados un cierto número de moléculas celulares que, actuando de objetivos diana, desempeñan un papel importante en la muerte celular por necrosis. Por regla general, se piensa que la muerte celular puede ocurrir a través de una necrosis o de una apoptosis, procesos que difieren en sus características morfológicas y bioquímicas.

La necrosis, que se considera el proceso más común vinculado a la actividad de la mayoría de los agentes nefrotóxicos, afecta a menudo a muchas células contiguas y como resultado los orgánulos se hinchan, el volumen celular se incrementa y la célula se rompe con un derrame de su contenido celular, seguido de inflamación.

La apoptosis es un proceso fuertemente controlado, que por lo general afecta a células individuales dispersadas. En este caso decrece el volumen celular y las células se rompen en pequeños fragmentos, que son fagocitados por las células adyacentes, o por macrófagos, sin provocar una respuesta inflamatoria.

Existen agentes nefrotóxicos cuya actividad nociva se centra en la alteración del volumen celular y de la homeostasis iónica, unas veces al interaccionar con la membrana celular e incrementar su permeabilidad y otras veces al impedir la producción de energía en forma de moléculas de ATP, que conduce a una inhibición de los transportadores de membrana, que mantienen el equilibrio iónico interno y controlan el movimiento de los iones a través de las membranas. Cuando falta ATP, decrece la actividad de la ATPasa-Na^+ , K^+ con modificación de los flujos de iones de sodio, potasio y cloro y, en consecuencia, se hincha la célula para finalizar con una lisis. Así mismo, este tipo de perturbación puede tener como consecuencia una disfunción mitocondrial, con los efectos negativos que ese trastorno conlleva. Tal es el caso del cloruro mercurico (Cl_2Hg).

Igualmente, pueden aparecer daños nefrotóxicos cuando se altera la homeostasis del catión Ca^{2+} , tan importante para el desarrollo normal de muchas funciones celulares.

Principales tipos de lesiones nefrotóxicas

Las perturbaciones que los agentes nefrotóxicos pueden provocar sobre el funcionamiento del riñón tienen como respuesta tres tipos principales de lesiones: fallo renal agudo, fallo renal crónico y adaptación renal posterior a una agresión nefrotóxica.

Fallo renal agudo

Se caracteriza por una caída brusca en la magnitud de la filtración glomerular, a la que sigue una azotemia o incremento de los valores en sangre de compuestos nitrogenados, particularmente de urea. En la práctica, se trata de una de las manifestaciones más comunes de la nefrotoxicidad. Después de la fase aguda, se puede recuperar la función renal siempre que el daño no haya sido muy severo.

Los fallos renales debidos a la nefrotoxicidad de un xenobiótico pueden ser la consecuencia de diversas lesiones en el sistema renal:

- Una hipofiltración, bien por lesión glomerular, bien por una vasoconstricción, como ocurre con la anfotericina B.
- Lesión tubular directa, que aumenta la permeabilidad de los túbulos de modo que el filtrado pasa de nuevo a la circulación. Es decir, se produce una disminución en la magnitud de la filtración glomerular. Tal ocurre con el cisplatino.
- Obstrucción tubular, que se puede producir por precipitación del xenobiótico, como ocurre con las sulfonamidas, o bien por un depósito del propio epitelio lesionado.

Fallo renal crónico

Consiste en un deterioro progresivo de la función renal, debido a una nefropatía túbulo intersticial crónica. Ocurre en los casos de tratamientos prolongados con litio, analgésicos, ciclosporinas, cisplatino, etc.

Adaptación renal posterior a una agresión nefrotóxica

El riñón tiene una gran capacidad para compensar una pérdida de la masa funcional renal y, por esta razón, en un primer momento pueden pasar bastante inadvertidos los efectos nefrotóxicos de algunos xenobióticos. En efecto, los cambios en la función renal inducidos por productos químicos, pueden no ser detectados hasta que el número de nefronas afectadas sea tan alto que se sobrepase la capacidad de los mecanismos compensatorios. Esto representa un grave problema, ya que cuando el riñón lanza la señal de alerta los efectos tóxicos pueden ser ya muy graves. De ahí la importancia de encontrar biomarcadores tempranos, que puedan avisar de la afección renal.

Además de estos mecanismos compensatorios, el riñón dispone de una serie de respuestas moleculares, y celulares, frente a la agresión de algunos compuestos químicos, que previenen del daño celular. Así por ejemplo, en la intoxicación renal por el cadmio se produce una inducción de la metalotioneína, o bien frente a la acción tóxica de la gentamicina se induce la síntesis de proteínas Hsp, que tienen una función protectora de las células renales.

Efectos de los principales xenobióticos nefrotóxicos

Entre los numerosos xenobióticos que se pueden comportar como agentes nefrotóxicos destacan algunos por los efectos nocivos que pueden provocar. De todos ellos merece que se indiquen los siguientes:

Analgésicos no narcóticos

Cuando se toman, de modo continuado y durante un largo periodo de tiempo, grandes dosis de analgésicos se desarrollan graves lesiones renales. Desde un punto de vista histológico, se observan pérdidas de la papila renal, inflamación del tejido intersticial, fibrosis y destrucción de la forma externa de la nefrona. Sin embargo, estos cambios detectados en los seres humanos no han resultado fáciles de inducir, de modo experimental, en animales. Como un ejemplo interesante se tiene el comportamiento del analgésico y antipirético acetoaminofenol (paracetamol), cuya ingestión a grandes dosis se suele asociar a ciertos daños hepáticos y renales, observados en animales y seres humanos.

Esta nefrotoxicidad se caracteriza por necrosis del túbulo proximal, con todas sus consecuencias de tipo bioquímico: incremento en la excreción de agua, sodio, potasio, glucosa y proteínas, así como un aumento de los niveles de creatinina en el plasma sanguíneo. Según parece, el mecanismo responsable presenta diferencias de acuerdo con la especie animal sobre la que actúa este producto. Es posible que el compuesto experimente una activación en el riñón, dando lugar a una estructura intermediaria, capaz de formar enlaces covalentes con las macromoléculas renales. No obstante, es importante señalar que la actividad nefrotóxica de este compuesto es más elevada en aquellos pacientes que sufren de una insuficiencia hepática porque bajo condiciones normales casi todo el producto ingerido se destoxifica en el hígado y, en estas circunstancias, el riñón queda expuesto solamente a muy bajas concentraciones del producto.

Antiinflamatorios no esteroideos

La aspirina y la indometacina, compuestos que se usan de modo extensivo como agentes antiinflamatorios no esteroideos, ejercen entre sus efectos fisiológicos una inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Con el empleo de estos medicamentos se han asociado, al menos, tres procesos nefrotóxicos diferentes:

- Un *fallo renal agudo*, que se produce a las pocas horas de ingerir grandes dosis del antiinflamatorio, pero que se hace reversible cuando se elimina el medicamento.
- Una *nefropatía analgésica*, que se trata de una forma irreversible de nefrotoxicidad provocada por el consumo durante tres años de estos

antiinflamatorios. Se sabe que su lesión primaria es una necrosis papilar con una nefritis intersticial crónica, pero se ignora qué mecanismo es el responsable de esta lesión, aunque es posible que se deba a la formación de un intermediario reactivo a través de un proceso oxidativo. Su incidencia en el mundo occidental es muy variable.

- Una *nefritis intersticial*, caracterizada por un edema difuso con infiltración de células inflamatorias. Normalmente, los pacientes presentan proteinuria, además de una elevada concentración de creatinina en suero. La función renal se puede recuperar en el plazo de 1-3 meses, si se interrumpe la administración del antiinflamatorio. Esta nefrotoxicidad asociada al consumo de estos medicamentos suele ser bastante rara.

Antibióticos

Los agentes antibióticos corresponden a grupos muy variados de familias químicas y el empleo de algunas de ellas ha presentado problemas nefrotóxicos, destacando las cefalosporinas y los antibióticos con estructuras aminoglucósidas.

Entre los antibióticos del grupo cefalosporinas merece ser subrayada la cefaloridina (Fig. 10.1), cuyas dosis agudas causan necrosis del túbulo proximal, lesionando selectivamente el segmento S2; se acumula en el riñón, sobre todo en la corteza más que en otros órganos. Según parece alcanza concentraciones elevadas en las células de los túbulos proximales, porque utiliza los sistemas de transporte específicos de los iones orgánicos. En este sentido, las ratas jóvenes, que todavía carecen de los sistemas especializados de transporte, no presentan daño tóxico ante la administración de esta sustancia.

No se conoce en profundidad su mecanismo de toxicidad, aunque parece estar implicado el sistema citocromo P₄₅₀, porque la toxicidad de la cefaloridina se reduce en ratas y ratones cuando este sistema está inhibido; en cambio, como se ha visto en experiencias con conejos, la estimulación de este sistema por tratamiento previo con fenobarbital incrementa la toxicidad del antibiótico. No obstante, también estos tratamientos afectan a la concentración renal de cefaloridina. Incluso, es probable que la formación de radicales, y el proceso oxidativo resul-

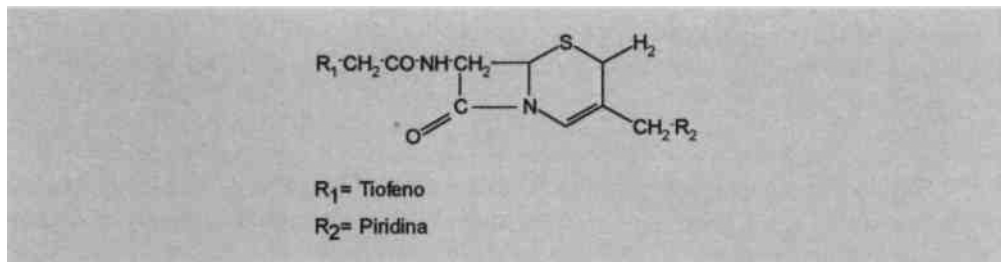


Figura 10.1. *Estructura de la cefaloridina.*

tante, desempeñen un cierto papel en dicha nefrotoxicidad, puesto que la presencia de glutatión reducido protege a las células frente a estos efectos perniciosos.

Otro grupo de antibióticos nefrotóxicos lo forman aquellos que en sus estructuras tienen dos, o más, aminoazúcares unidos por enlace glucosídico a un núcleo central de hexosa. Aunque suelen tener una gran eficacia frente a las bacterias Gram negativas, sin embargo su aplicación se encuentra limitada precisamente por su nefrotoxicidad, que conduce a fallos renales con incremento de la creatinina en sangre. Aunque por su naturaleza química son cationes polares, que pueden ser filtrados por los glomerulos, sin embargo tienen la capacidad de enlazarse a moléculas de fosfolípidos aniónicos con posibilidad de ser reabsorbidos en el túbulo proximal. Bajo esta forma se almacenan en los lisosomas, que incrementan su tamaño y número. Parece existir una correlación entre el número de grupos amino ionizables y la nefrotoxicidad.

Uno de estos antibióticos es la gentamicina (Fig. 10.2), que en la práctica clínica presenta efectos nefrotóxicos colaterales. Por su enlace a fosfolípidos y posterior almacenamiento en los lisosomas, da lugar a cambios bastante numerosos: modificaciones en la permeabilidad de las membranas, en la actividad ATP-asa- Na^+ , K^+ , en el transporte de cationes, etc.

Agentes antineoplásicos

Durante algunos años se ha usado con frecuencia el cisplatino como agente antineoplásico para el tratamiento de algunos tumores cancerígenos, como los de útero y testículos. Se trata del compuesto cis-diamino-dicloro-platino(II), una molécula con estructura planar que posee un ion platino central, que tiene enlazado en posición cis a dos átomos de cloro y dos grupos aminos. Sin embargo, sus aplicaciones clínicas se han visto bastante limitadas por su nefrotoxicidad, debido no sólo a que se elimina en su mayor parte por el riñón, sino también a que este órgano es una zona primaria para su acumulación. Sus efec-

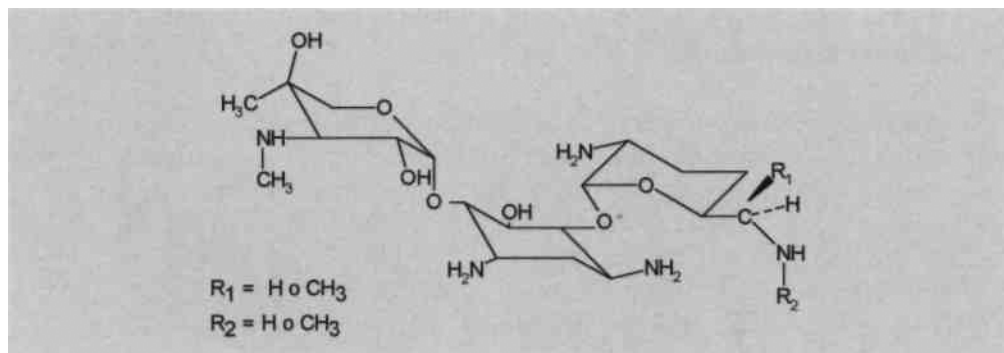


Figura 10.2. *Estructura de la gentamicina.*

tos tóxicos se traducen en una excreción urinaria de proteínas y una reducción del transporte de iones orgánicos, que son alteraciones típicas de la necrosis tubular.

Se conocen ocho diferentes componentes de bajo peso molecular con los que el cisplatino se puede enlazar en la sangre. Sin embargo, se desconoce la forma bajo la cual se introduce en las células y tampoco existe mucha información acerca del mecanismo exacto por el que ejerce su actividad tóxica. Parece que el responsable de la misma es un metabolito, aunque no hay que ignorar la afinidad que el platino tiene por los grupos tioles, al igual que el mercurio.

Bien sea el cisplatino, bien sea su metabolito, se ha comprobado desde un punto de vista histopatológico que producen daño de modo principal en las células de los túbulos distales y proximales. Las lesiones corresponden de modo fundamental a las regiones de la corteza y de la médula, donde la concentración resulta más elevada, con una toxicidad que depende de la dosis. En la actualidad, se reduce su efecto nefrotóxico sometiendo a los pacientes a una hidratación con suero salino, que de modo considerable reduce la concentración renal de cisplatino. La ausencia de toxicidad que tiene su isómero trans ofrece cierto interés, porque hace pensar en una toxicidad vinculada a la geometría espacial de la estructura, más que a la naturaleza del propio átomo de platino.

Agentes de radiocontraste

Para visualizar las imágenes de los tejidos en los estudios radiológicos se usan medios yodados como elementos de contraste radiológico. Se trata de compuestos que apenas se enlazan a proteínas y que se ionizan a pH fisiológico, por lo que se eliminan bastante bien por el riñón. Sin embargo, al ser potencialmente nefrotóxicos, se suelen sustituir por otros no iónicos menos tóxicos. Su nefrotoxicidad se debe tanto a perturbaciones hemodinámicas como a daños tubulares, y pueden producir necrosis en el túbulo proximal y también una descamación que destruye a los túbulos.

Agentes inmunosupresores

La actividad inmunosupresora de la ciclosporina, es decir, su acción sobre el sistema inmune ha permitido llevar a cabo el transplante de órganos con cierto éxito, porque previene el rechazo del órgano transplantado. Se trata de un polipéptido cíclico de origen fúngico, que actúa de modo selectivo inhibiendo la activación de las células T. Sin embargo, su nefrotoxicidad es un efecto secundario sobre el sistema renal: disfunción renal aguda reversible, vasculopatía aguda o nefropatía crónica con fibrosis intersticial. Según parece, la causa de tales efectos tóxicos radica en la reducción provocada en el suministro de sangre al riñón y en los cambios endoteliales que origina.

Hidrocarburos halogenados

Estos contaminantes ambientales responden a una familia de compuestos orgánicos de muy diversas estructuras y aplicaciones: disolventes, pesticidas, etc. Se han descrito numerosos efectos tóxicos asociados a exposiciones del organismo vivo, tanto agudas como crónicas, entre los que destaca la nefrotoxicidad.

Así por ejemplo, el cloroformo resulta nefrotóxico para una cierta variedad de especies animales, unas más sensibles que otras. El objetivo diana primario suele ser el túbulo proximal, sin afectar ni a los glomérulos, ni al túbulo distal. Su toxicidad se vincula a su metabolización por el citocromo P₄₅₀ renal, que da lugar a un metabolito capaz de enlazar de modo covalente con los grupos nucleofílicos presentes en las macromoléculas celulares. La biotransformación le convierte en triclorometanol que, dada su inestabilidad, se rompe en ácido clorhídrico y en fosgeno tóxicamente activo (Fig. 10.3). Las diferencias observadas, relacionadas con el sexo, parecen depender de las discrepancias aportadas por los precursores de los distintos isoenzimas del citocromo P₄₅₀.

Metales pesados

Varios metales pesados que pueden encontrarse en el medio ambiente, entre los que se incluyen cadmio, cromo, mercurio, platino, plomo y uranio, han demostrado ser nefrotóxicos, aunque la naturaleza y magnitud de sus activida-

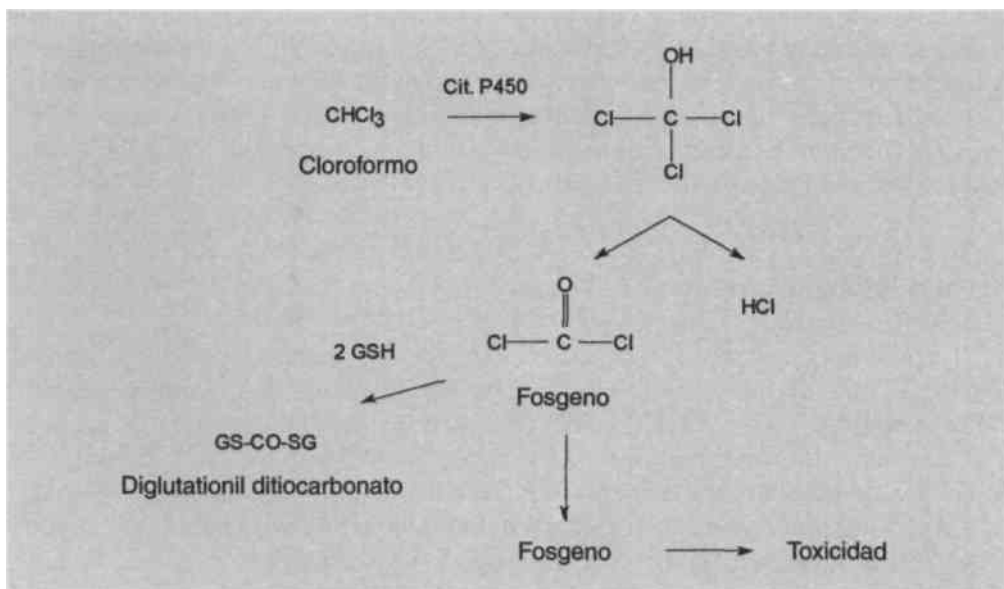


Figura 10.3. *Activación metabólica del cloroformo.*

des tóxicas varían de acuerdo con las formas químicas bajo las que se encuentran. Sus toxicidades suelen tener como base la capacidad de enlazarse a los grupos sulfhidrilos presentes en muchas proteínas esenciales para las células, por lo que se inhiben sus funciones normales.

Entre ellos, cabe destacar al *mercurio*, que se puede encontrar en el medio ambiente bajo dos formas diferentes:

- a) Una forma inorgánica, como puede ser el cloruro mercuríco (Cl_2Hg).
- b) Una forma orgánica, como el dimetilmercurio, que como contaminante ambiental se encuentra incorporado a los tejidos corporales de pájaros y peces.

Su presencia afecta a muchas enzimas celulares con grupos tioles, como las ATPasas enlazadas a las membranas. La forma orgánica resulta más tóxica que la inorgánica, debido a su carácter lipofílico que le capacita para atravesar sin dificultad las membranas biológicas. Se ignora el modo cómo el Cl_2Hg entra en las células, aunque se sabe que por la sangre circula enlazado a macromoléculas; es posible que penetre por endocitosis del complejo mercurial, o bien por una simple difusión proporcional al área superficial disponible por cada célula.

Los riñones son los órganos dianas primarios para la acumulación del mercurio inorgánico e inicia su daño tóxico en el segmento S_3 del túbulo proximal; los casos de toxicidad aguda se caracterizan por una necrosis del túbulo proximal. Bajo la forma órganomercurial se puede usar como agente diurético, pero cuando se usa durante un tiempo prolongado, tiende a provocar una glomérulo nefropatía, que cursa con proteinuria.

También el *cadmio* causa daño de modo primario en los túbulos renales. Al riñón suele llegar el cadmio ingerido, una vez que ha sido transformado por el hígado en un complejo proteico con la metalotioneína, que modula la capacidad tóxica del metal. Incluso este complejo proteico puede ser formado en el mismo riñón, posiblemente como una forma de protección, porque bajo esta forma el cadmio resulta incapaz de ejercer su acción tóxica. Con una vida media en los seres humanos superior a los diez años, el cadmio perturba las funciones del túbulo proximal y su daño tóxico se caracteriza por un incremento en la excreción de glucosa, aminoácidos, calcio y enzimas celulares, daño que cuando se hace crónico puede acabar en una nefritis intersticial crónica.

Micotoxinas

Al organismo humano pueden llegar alimentos que están contaminados por micotoxinas sintetizadas por algunos hongos, de las cuales dos de ellas son bien conocidas por su nefrotoxicidad: ocratoxina A y citrinina.

La primera (Fig. 10.4) ocasiona una disfunción renal que desde el punto de vista bioquímico se caracteriza por glucosuria, cetonuria, proteinuria y poliuria. En cambio, la segunda puede dar lugar a dos tipos de fallos renales: un fallo

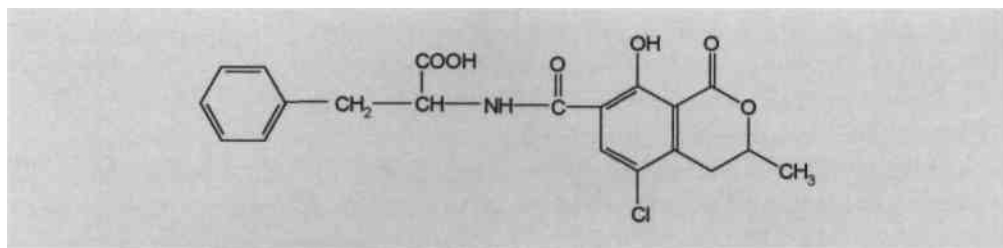


Figura 10.4. *Estructura de la ocratoxina A.*

anúrico, que conduce a la muerte y otro fallo no anúrico, que resulta reversible en el plazo de unos ocho días.

También ha sido señalada como nefrotóxica otra micotoxina, la fumonisina, que parece afectar a las membranas y da lugar a hinchazón en las mitocondrias, con numerosas vacuolas y células con citoplasmas opacos. Parece que su toxicidad se debe a su participación en la regulación de los niveles de los complejos esfingolípidos.

Evaluación de la nefrotoxicidad

Existen diversos procedimientos para evaluar el daño renal, que van desde algunos sencillos tests cualitativos y ensayos bioquímicos hasta estudios anátomo-patológicos más complejos.

En primer lugar, la determinación del volumen urinario y la osmolalidad de la orina pueden proporcionar información sobre la existencia de algún problema renal. Un aumento del volumen urinario (poliuria), junto con una disminución de la osmolalidad son indicativos de una alteración en la concentración urinaria, que puede ser debida a un defecto en la síntesis, liberación o acción de la hormona antidiurética. Así mismo, una disminución del volumen urinario (oliguria) es un signo indicativo de algún problema renal importante que convendrá estudiar con mayor profundidad.

La lesión renal puede ser detectada también mediante la evaluación de una serie de compuestos presentes en la orina, como proteínas, glucosa y electrolitos. Aunque *proteínas de bajo peso molecular* (50-100 mg/día) forman parte de la composición normal de la orina, sin embargo valores de 200-300 mg/día y una alta concentración de β -2-microglobulina suelen ser indicativos de un posible problema a nivel de los túbulos, mientras que valores muy superiores a los normales (1-2 g/día) y una alta concentración de albúmina son indicativos de un problema a nivel de los glomerulos.

Una elevada concentración de *glucosa* en orina (glucosuria), en tanto que su concentración plasmática es normal se considera indicativa de un posible problema en la reabsorción de azúcares. Así mismo, la presencia de enzimas en

orina (enzimuria) es un signo indicativo de un posible efecto tóxico: un alto contenido *enfosfatasa alcalina* puede tener su origen en un posible problema específico de las células con borde en cepillo situadas en el túbulo proximal, ya que esta enzima es especialmente abundante en dichas células; en cambio, un alto contenido en *lactato deshidrogenasa* puede ser indicativo de un problema más generalizado de citotoxicidad. La lesión de células tubulares puede dar lugar también a la liberación de otras enzimas como *y-glutamyl transferasa* o *N-acetil glucosaminidasa*. De todas formas, la enzimuria es con frecuencia un fenómeno transitorio, ya que el daño celular producido por un producto químico puede originar la pérdida de enzimas, aunque exclusivamente al principio.

El análisis del sedimento urinario también proporciona una cierta información: la presencia de células epiteliales indica lesión tóxica, mientras que la presencia de células sanguíneas es indicativa de una posible infección.

Tanto la *urea* como la *creatinina* son filtradas por el glomérulo, por lo que un aumento de su concentración en sangre sugiere una disminución de la tasa de filtración glomerular. No obstante, la medida de estos parámetros en plasma constituye un índice bastante insensible de alteración renal: debe ocurrir una disminución del 50-70 % en la tasa de filtración glomerular para que se detecte un aumento de creatinina y urea en sangre. Además, hay que tener en cuenta que la creatinemia y uremia pueden ser consecuencia de otro tipo de problemas extra-renales, tales como deshidratación, hipovolemia y/o catabolismo de proteínas. La medida más habitual es la determinación del nitrógeno ureico en sangre.

Por último, el estudio histopatológico de cortes renales mediante microscopía óptica y electrónica, es crucial para identificar el sitio, la naturaleza y la severidad de la lesión renal, pero requiere el sacrificio de los animales o la realización de biopsias renales.

La respuesta tóxica del tejido sanguíneo

- Bases morfológicas
- Lesiones tóxicas sobre la hematopoyesis
- Lesiones tóxicas sobre los eritrocitos
- Lesiones tóxicas sobre los leucocitos
- Lesiones tóxicas sobre las plaquetas

Bases morfológicas

En la actualidad, se dispone de una amplia información morfológica que permite considerar al tejido sanguíneo como un órgano bastante complejo, con una masa total equivalente a la masa del hígado. En este conjunto hay que incluir tanto los elementos celulares integrantes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), como los sistemas fisiológicos que se relacionan con su formación y función (médula ósea, bazo, nodulos linfáticos y retículo endotelial). En cierto modo, cualquiera de estos elementos y sistemas pueden resultar afectados por la actividad tóxica de algunos xenobióticos.

Las células que integran el tejido sanguíneo suelen tener una vida media más corta que la mayoría de las células de los demás tejidos corporales y, por consiguiente, para abordar el estudio de las respuestas tóxicas del tejido sanguíneo, no solo se tiene que hacer referencia a los efectos tóxicos sobre el metabolismo y la función de las células sanguíneas maduras, sino también sobre el proceso de la hematopoyesis. Por lo general, la respuesta tóxica de la sangre se manifiesta por una reducción del número de células sanguíneas circulantes y por anomalías estructurales y funcionales, así como por cambios morfológicos en una menor extensión.

Antes del nacimiento, la producción de las células sanguíneas en el feto implica la participación de varios órganos: hígado, bazo y médula ósea; pero a

partir del momento del parto, solamente la médula ósea participa en la producción de las mismas. Después del nacimiento, la eritropoyesis tiene lugar a una velocidad que está controlada por una hormona sintetizada en el riñón, la eritropoyetina; en el crecimiento celular interviene también el estímulo de la interleuquina 3. Los eritrocitos, al igual que otras células sanguíneas, pasan por las fases de división celular, diferenciación y maduración.

La sangre circulante se compone de plasma en un 50 % y de células en el otro 50 %, diferenciadas según tres tipos:

1. *Eritrocitos* o glóbulos rojos, cuya función principal es la de transportar el oxígeno llegado a los pulmones hacia todos los puntos corporales, una vez enlazado a la molécula de hemoglobina. Son células sin núcleo, incapaces de sintetizar proteínas, y también carentes de mitocondrias, por lo que no disponen de la fosforilación oxidativa, y el suministro de energía depende totalmente del sistema glucolítico, controlado por enzimas que convierten a la glucosa en ácido láctico.
2. *Leucocitos* o glóbulos blancos, que desempeñan un papel defensivo frente a las infecciones y en los que cabe distinguir tres tipos:
 - a) *Linfocitos*: capaces de reaccionar de modo específico con antígenos.
 - b) *Monocitos*: fagocitos con una permanencia en la sangre de sólo unas horas, que emigran hacia los tejidos donde maduran a macrófagos y gozan de una vida media de meses o incluso de años.
 - c) *Granulocitos*: desempeñan un importante papel en los procesos defensivos contra las infecciones provocadas por microorganismos patógenos, en cuyas superficies celulares existen receptores específicos capaces de enlazar a estos tipos de células. Pueden ser neutrófilos, basófilos y eosinófilos.
3. *Plaquetas*, con funciones en los procesos de coagulación.

La exposición de los elementos sanguíneos a la actividad nociva de xenobióticos puede tener una etiología muy variada: compuestos aportados por el medio ambiente, tanto en los lugares de trabajo profesional como en los propios hogares donde se vive; sustancias aplicadas como agentes terapéuticos; etc. Además, las exposiciones a los xenobióticos pueden corresponder a dos formas diferentes, agudas o crónicas, aunque a veces intoxicaciones de tipo agudo pueden inducir nuevas anormalidades, después de transcurrido algún tiempo.

Lesiones tóxicas sobre la hematopoyesis

Como consecuencia de la elevada regeneración que presentan las células sanguíneas, la médula ósea lleva a cabo una intensiva producción de células y, por ello, manifiesta una elevada sensibilidad frente a los factores que puedan

afectar a la multiplicación celular: deficiencias nutricionales, causas inmunológicas y xenobióticos. Unas veces, sólo se afectan algunas de las líneas celulares, mientras que en otras ocasiones quedan involucradas todas ellas.

Como respuesta de la médula ósea a la actividad tóxica de algún xenobiótico en la producción de sangre, pueden manifestarse cuatro tipos de perturbaciones: *a)* inhibición de la hematopoyesis; *b)* cambios megaloblásticos; *c)* anemia sideroblástica; *d)* inducción de enfermedades malignas sanguíneas.

Inhibición de la hematopoyesis

La magnitud de la gravedad del daño inducido sobre la producción de sangre por la exposición de la médula ósea a un xenobiótico depende de tres factores: el tipo de célula afectada; el tipo de inhibición, que puede ser hipoplasia o aplasia; la persistencia de la inhibición, que resulta reversible o irreversible.

En consecuencia, pueden resultar cuatro tipos diferentes de lesiones:

1. *Anemia aplásica o pancitopenia*, que afecta a todas las líneas celulares. Varios son los xenobióticos asociados a este tipo de lesión, sobre todo cuando la exposición es lo suficientemente intensa: el disolvente benceno, los plaguicidas lindano y clordano, el antibiótico cloranfenicol, el antirreumático fenilbutazona, los derivados arsenicales algunos citostáticos utilizados para la terapia anticancerosa, etc.
2. *Aplasia eritrocítica pura*, que solo concierne a los eritrocitos. La anemia, o reducción del número de glóbulos rojos, puede ser inducida por aquellos xenobióticos que provocan una hemólisis directa aguda, tales como saponina, fenilhidrazina, arsina, naftaleno, acetanilida, etc.
3. *Leucopenia*, que hace referencia a la reducción en el número de leucocitos, suele ser inducida por xenobióticos como clorpromazina, el tiouracilo y las sulfonamidas. Las lesiones inducidas en la médula ósea por sustancias químicas suelen responder con mayor frecuencia a granulocitopenia, pero casi nunca afectan de modo específico a los monocitos. Las alteraciones en el número de linfocitos dan lugar a perturbaciones en el sistema inmune.
4. *Trombocitopenia*, que altera a las plaquetas, reduciendo su número desde 50.000/ml propio de una hemostasis normal hasta valores inferiores a 20.000/ml. Los agentes que pueden causarla pueden ser los fármacos anticancerosos mielosupresores y el antiarrítmico quinidina.

Cambios megaloblásticos

La inhibición de la síntesis de ADN conduce a cambios megaloblásticos en todas las líneas celulares; es decir, en todos los casos se produce un aumento del tamaño celular que, debido a la amplitud de sus tamaños, tiene como consecuencia una disminución en el número de células circulantes.

Cualquier xenobiótico que dé lugar a una carencia de folatos o de cianocobalamina (B_{12}), induce perturbaciones en la división celular con cambios morfológicos megaloblásticos, porque esas dos vitaminas actúan de cofactores en la síntesis del ADN; así mismo, dan lugar a este tipo de lesión la 5-fluor-2'-desoxiuridina y la 6-azaridina, que inhiben la síntesis de los pirimidín-nucleótidos.

Anemia sideroblástica

Resulta como una consecuencia de interrupciones, a distintos niveles, en la síntesis del grupo hemo, esencial para la formación de la hemoglobina contenida en los eritrocitos. Así por ejemplo, el medicamento antituberculoso isoniazida, impide que la piridoxina actúe como cofactor en la formación de ácido d-amino-levulínico, primera etapa de la síntesis hemo; también se produce esta lesión en las intoxicaciones por el plomo. Como resultado de esta perturbación, se forma un anillo de hierro alrededor del núcleo en los eritroblastos de la médula ósea.

Inducción de enfermedades malignas hematológicas

Se trata de la inducción de leucemias y linfomas, que pueden tener diversas variantes. En las *leucemias agudas* se produce una acumulación de células jóvenes en la médula ósea, que a veces también ocurre en la propia sangre. Esta proliferación de células leucémicas en la médula ósea tiene un efecto represivo sobre el proceso normal de la hematopoyesis, que se pone de manifiesto bajo los síntomas de anemia e incremento de la sensibilidad frente a las infecciones. El único compuesto que ha sido asociado con la leucemia aguda en el ser humano ha sido el benceno.

Las *leucemias crónicas* cursan con un desarrollo más suave; incluso en las linfáticas crónicas, que suelen aparecer en edad avanzada, puede que el paciente sobreviva diez años sin recibir terapia alguna. Sin embargo, también la leucemia mieloide crónica puede ser fatal, aunque su desarrollo sea lento, porque con el tiempo las formas crónicas pasan a formas agudas.

En los *linfomas malignos* existe una proliferación de células linfáticas, tanto en los nodulos linfáticos como en los tejidos extranodales (como el intestino). Estas células, que proliferan de modo patológico, presentan en diversas etapas de su desarrollo las características de los linfocitos T y B. Puede ocurrir como consecuencia de los efectos tóxicos de algunos xenobióticos: benceno, asbesto, óxido de etileno, metales pesados, pentaclorofenol, cloruro de vinilo y poliestireno. Incluso, algunos citostáticos aplicados a pacientes cancerosos pueden inducir, como un efecto secundario, leucemias agudas bastante resistentes a las terapias correspondientes.

Lesiones tóxicas sobre los eritrocitos

Los eritrocitos, que circulan con la sangre por todo el organismo, están expuestos a las actividades tóxicas, directas o indirectas, de algunos xenobióticos. Como resultado de dichas acciones, se puede acelerar la degradación de estas células sanguíneas, dando lugar a diversas perturbaciones con mayor o menor gravedad: hemólisis, incidencia negativa sobre el metabolismo, alteración de la molécula de la hemoglobina con pérdida de su función principal (transporte de oxígeno a todos los órganos y tejidos corporales con la correspondiente hipoxia de origen tóxico).

- La *hemólisis* es un proceso que resulta de la degradación acelerada de los eritrocitos, con una reducción de su vida media, y puede tener una etiología tanto inmunológica como oxidativa. Por lo general, las hemólisis inducidas por xenobióticos suelen ser reversibles y benignas.

Las causas inmunológicas de la hemólisis eritrocítica suelen responder a dos tipos de mecanismos, aunque el segundo de ellos puede presentar dos variedades:

- Por autoinmunidad: relacionado con la formación de haptenos. Por lo general, los xenobióticos corresponden a estructuras de bajo peso molecular y por sí mismos no son inmunogénicos; por tanto, necesitan de la conjugación con un portador proteico para estimular la formación de anticuerpos. Un ejemplo de este primer mecanismo se tiene en la actividad tóxica de la metildopa, un agente hipotensivo, que es el responsable del desarrollo de una anemia hemolítica autoinmune en aproximadamente el 10 % de los pacientes tratados con este medicamento. Se ha observado cómo los anticuerpos, casi siempre del tipo IgG, reconocen los determinantes Rh de la membrana eritrocitaria. Se supone que la metildopa interacciona con los linfocitos T, lo que ocasiona la pérdida de sus funciones supresoras y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B.
- Por formación de inmunocomplejos: relacionado con él están los casos inducidos por los antibióticos de bajo molecular, al actuar como haptenos que se unen a proteínas de la membrana eritrocitaria. Así, en el caso de la penicilina, se ocasiona una inmunohemólisis como consecuencia de la formación de un enlace covalente entre el antibiótico y una proteína localizada sobre la superficie del eritrocito. Aunque se ha comprobado que la mayoría de los pacientes tratados con elevadas dosis de penicilina desarrollan anticuerpos IgM, sin embargo se sabe que los anticuerpos responsables de las hemólisis corresponden a la clase IgG, mucho menos frecuente. Los eritrocitos cubiertos de penicilina y sus correspondientes IgG antipenicilina son destruidos en el bazo. También, las cefalosporinas y las tetraciclinas son grupos de antibióticos que pueden ocasionar idénticas formas de inmunohemólisis.

- Este segundo mecanismo ofrece otra variedad caracterizada porque la estructura del xenobiótico implicado presenta escasa afinidad por los eritrocitos. Además, a diferencia del caso anterior, se necesitan dosis muy pequeñas para que se inicie la hemólisis y el daño celular tiene lugar principalmente a través de las proteínas del complemento, como ocurre con la quinina y la quinidina. Estos dos agentes terapéuticos se enlazan a unos anticuerpos y circulan por la sangre formando unos complejos inmunes, que se unen de manera reversible a los eritrocitos; a continuación se produce la activación de las proteínas del complemento y su unión a la membrana celular eritrocitaria, lo que lleva a la destrucción de la célula, una vez que se ha completado el ciclo del complemento. Los complejos inmunes por su parte pueden emigrar de unas células a otras.
- También pueden ocurrir *cambios estructurales en la hemoglobina*, que conducen a una desnaturalización con precipitación de la molécula proteica. Precisamente estos precipitados, conocidos como cuerpos de Heinz, pueden formar enlaces con la membrana celular y alterar su permeabilidad, provocando así la lisis celular. Por lo general, responden a situaciones oxidantes severas que afectan a los eritrocitos, porque estas células resultan muy sensibles a las reacciones de peroxidación. El daño oxidativo puede tener lugar de modo directo sobre la propia membrana celular, debido a una peroxidación de sus compuestos lipídicos o a una modificación en sus proteínas, o bien sobre la molécula de la hemoglobina contenida en su interior. Bajo condiciones normales, tanto la membrana celular como la hemoglobina se encuentran bien protegidas de los efectos nocivos del oxígeno, metales de transición y ácidos grasos insaturados, por la presencia de catalasas y de glutatión; sin embargo, esta situación puede ser perturbada por la exposición a xenobióticos poseedores de estructuras químicas orgánicas portadoras de grupos hidroxilos, aminos o nitros. Así, son agentes productores de los cuerpos de Heinz, la anilina, el nitrobenzeno y compuestos homólogos relacionados, los fenoles, el propilenglicol, el ácido ascórbico, la hidroxilamina, el dimetil sulfuro, etc., aunque sus consecuencias tóxicas pueden variar con la especie animal sobre las que actúen. Parece que los eritrocitos de los seres humanos, perros, gatos y ratones son más susceptibles para formar cuerpos de Heinz que los de conejos, monos, pollos y cobayas.
 - La *hipoxia* hace referencia a cualquier condición que dé lugar a una disminución en el suministro de oxígeno a los tejidos periféricos. De acuerdo con la causa que la produce se distinguen tres tipos de hipoxia: la anóxica o arterial, la hipocinética y la anémica. Solo esta última interesa desde un punto de vista toxicológico. La *hipoxia anémica* se caracteriza por una capacidad de oxigenación reducida por parte de la sangre circulante, a pesar de que la presión arterial y la velocidad del flujo sanguíneo sean

normales o incluso elevadas. Normalmente, puede ser una consecuencia de la actividad tóxica de algún xenobiótico capaz de provocar una disminución en los niveles de eritrocitos en sangre, o una baja concentración de hemoglobina funcional e incluso una alteración química de esta molécula. Suele ser el efecto consecuente de toda intoxicación que implique las formaciones químicas de carboxihemoglobina, de metahemoglobina o de sulfohemoglobina.

- La intoxicación por monóxido de carbono da lugar a la formación de *carboxihemoglobina*: los lugares de unión de los átomos de oxígeno de la hemoglobina están ocupados por CO, el cual tiene una mayor afinidad por los grupos hemo que el oxígeno, por lo que la presencia de carboxihemoglobina en sangre supone una menor oxigenación de la misma.
- La *sulfohemoglobina* es un pigmento no muy bien caracterizado, que puede surgir como consecuencia de exposición a algunos xenobióticos oxidantes como sulfonamidas, fenacetina y acetanilida. Al revés que en el caso anterior, la sulfohemoglobina no puede revertir a hemoglobina, por lo que una vez formada, su presencia en los eritrocitos es permanente.
- Otra posible causa de hipoxia anémica se relaciona con la oxidación química a Fe(III) del átomo de Fe(II) integrado en el grupo hemo. Con ello, la molécula de hemoglobina se convierte en *metahemoglobina* y este pigmento carece de la capacidad de enlazar el O₂, por lo que su presencia en los eritrocitos hace que se disminuya el oxígeno aportado por la sangre a los tejidos periféricos. Este proceso oxidativo puede tener lugar de un modo espontáneo bajo condiciones normales (nunca superior al 2 %), o bien puede ser inducida por algunos xenobióticos, que en la práctica pueden corresponder a tres grupos (Fig. 11.1):
 - a) los que forman metahemoglobina tanto *in vivo* como *in vitro*: nitrito sódico, hidroxilamina y fenilhidroxilamina.
 - b) los que solamente actúan *in vivo*, posiblemente porque necesitan de algún tipo de bioactivación metabólica: anilina, nitrobenceno y para-amino-propil-fenona.
 - c) los que solamente son activos en Usados y apenas lo son con células intactas, tal vez por no poder penetrar en ellas: ferricianuro potásico.

Así como la reversibilidad de la carboxihemoglobina es espontánea y pasiva, sin gasto de energía y dependiendo de la presión parcial de oxígeno, la reversibilidad de la metahemoglobina es enzimática y necesita de un aporte de energía.

También tiene interés toxicológico la denominada *hipoxia histotóxica*, que corresponde a una lesión eritrocítica por la que a pesar de ser normal la presión parcial de oxígeno en los tejidos periféricos, existe una incapacidad para que las células puedan hacer uso del oxígeno a nivel molecular. Este tipo de lesión

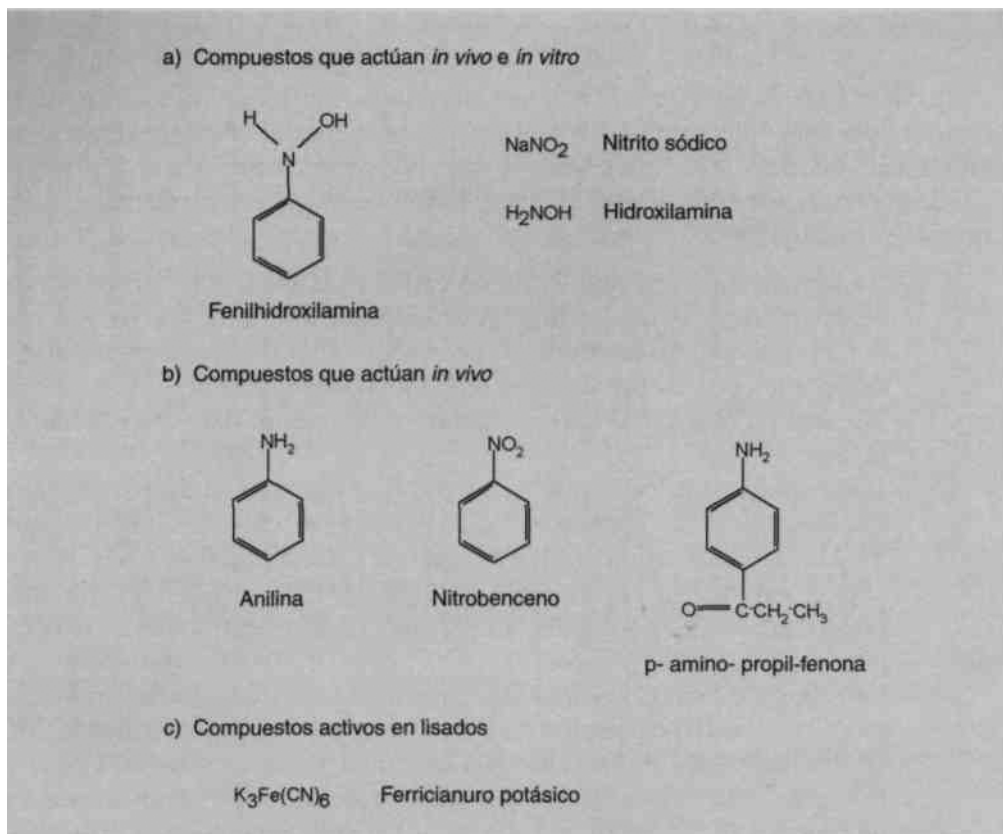


Figura 11.1. *Compuestos productores de metahemoglobina.*

suele ser provocada por las sales solubles de sulfuros y cianuros, o las formas libres de sus ácidos débiles. Aunque todavía no se conocen con exactitud los detalles químicos del proceso, se supone que las formas no disociadas de los anteriores compuestos bloquean la transferencia de electrones en el complejo citocromo aa₃. En consecuencia, se reduce la utilización del oxígeno y, por consiguiente, decae el metabolismo oxidativo hasta el punto de no poder cubrir las demandas metabólicas, dando lugar a que se use la vía alternativa de la glucólisis anaeróbica, con la consecuente acidemia profunda producida por la elevada formación de ácido láctico. Cianuros y sulfuras estimulan de modo directo los quimiorreceptores de los cuerpos aórticos y carótidos para producir un corto período de hiperapnea; a menudo se observan irregularidades cardíacas, alteraciones cerebrales y anomalías en los centros respiratorios con paradas respiratorias. La muerte puede ocurrir a los pocos minutos de haber inhalado elevadas concentraciones de H_2S o de HCN , aunque en el caso de sus sales solubles puede tardar en producirse una hora por ser sustancias con una absorción más lenta.

Lesiones tóxicas sobre los leucocitos

En principio, los procesos que conducen a una hemólisis también pueden ocasionar degradaciones en los leucocitos. Así por ejemplo, los tratamientos con aminopirina originan una *neutropenia* o *agranulocitosis*, causada por la formación de haptenos. En este caso, el antígeno lo forman el agente terapéutico y una proteína situada en los leucocitos; de este modo, se induce la formación de anticuerpos, capaces de provocar una aglutinación masiva de los glóbulos blancos. Para compensar este proceso, se induce en la médula ósea una hiperplasia del sistema mieloide. En los casos donde la exposición a la aminopirina resulta continuada, la médula puede llegar a una situación de agotamiento, aunque pueda proseguir con normalidad la función de producir otras líneas celulares. La elevada destrucción de granulocitos en la circulación sanguínea provoca un proceso febricular alto.

La histamina, los dextranos, los glucocorticoides y el hierro inorgánico son compuestos químicos que pueden ocasionar una *pseudoneutropenia*, al inducir la adhesión de los granulocitos al endotelio de las paredes vasculares. Por todo ello, se pueden afectar cualquiera de las fases de las funciones biológicas de los leucocitos.

Lesiones tóxicas sobre las plaquetas

El enlace de las plaquetas sanguíneas a varias de las moléculas empleadas como agentes terapéuticos, tales como rifampicina, clorotiazida y los derivados azufrados, puede dar lugar a la formación de haptenos en las membranas de los trombocitos. En este caso, el subsiguiente enlace con anticuerpos ocasionará una rápida degradación celular. Cuando se interrumpe la exposición al agente terapéutico, el número de trombocitos puede ser recuperado en el plazo de siete días.

Sin embargo, si el xenobiótico responsable fuera la difenilhidantoína o el tiomalato de oro (sustancia empleada por los pacientes reumáticos), la normalización al interrumpir el tratamiento resulta mucho más lenta, porque estas sustancias son eliminadas del organismo con bastante más lentitud.

Existen numerosas sustancias capaces de ejercer un efecto adverso sobre el funcionamiento de las plaquetas sanguíneas circulantes. Cabe citar varios ejemplos: el dipiridamol inhibe la adhesión entre ellas; el antibiótico carbenicillina interfiere con el proceso de agregación; la aspirina causa una acetilación irreversible con la ciclooxygenasa plaquetaria e interfiere con la síntesis de endoperóxidos cíclicos y de tromboxano A₂, un potente agregador de plaquetas y vasoconstrictor.

La respuesta tóxica del tejido inmune

- Elementos del sistema inmune
- Mecanismos de los efectos tóxicos inmunológicos
- Principales xenobióticos inmunomoduladores
- Evaluación de la inmunotoxicidad

Elementos del sistema inmune

La inmunidad es considerada, por definición, como «aquella condición homeostática mediante la cual el organismo mantiene su protección frente a las enfermedades infecciosas». Viene a ser un conjunto de mecanismos fisiológicos delicadamente equilibrados, multicelulares y bastante complejos, mediante los cuales el organismo es capaz de distinguir sus propios componentes de aquellos otros que le son extraños, con el fin de proceder a su extinción o a su neutralización. Está integrado por una gran variedad de efectores, altamente especializados dentro de un amplio espectro de especificidad, y dispone de unos complicados mecanismos reguladores, con capacidad para desplazarse a través de todo el cuerpo.

El sistema inmune suministra los medios apropiados para que el organismo pueda responder de un modo inmediato y altamente específico a la invasión de innumerables microorganismos potencialmente patógenos; además, proporciona también protección frente al desarrollo de algunos tumores. Se puede considerar, por lo tanto, que la finalidad de la existencia de este sistema inmunológico es proteger al organismo frente a posibles infecciones o al desarrollo de algunos tumores.

La inmunidad de los mamíferos puede ser clasificada en dos categorías, según el tipo de defensa proporcionado frente a los agentes extraños al organismo: innata y adquirida.

La *innata* actúa como una primera línea defensiva frente a los agentes infecciosos con la finalidad de eliminar aquellos que son potencialmente patógenos,

antes de que se produzca una infección significativa. Se caracteriza por ser inespecífica y disponer de barreras tanto físicas como bioquímicas, junto a células no propiamente inmunes porque carecen de la capacidad de reconocer antígenos, pero con una gran variedad de funciones de amplificación, efectoras o iniciadoras, imprescindibles para los llamados mecanismos de defensa no específicos.

La *adquirida* se desarrolla cuando fallan las defensas de la anterior. Entonces se activa el sistema inmune con el objetivo de producir una respuesta ya específica para cada tipo de agente infeccioso, al que no solo va a poder eliminar impidiendo la infección, sino que también proporciona al organismo un medio de protección para futuras agresiones.

Para su funcionamiento, el sistema inmune requiere dos tipos distintos de elementos:

- De una parte, numerosas poblaciones de *células* diferentes, que desempeñan una gran variedad de funciones. Entre éstas destacan los linfocitos maduros T y B, con capacidad para reconocer anticuerpos y desempeñan funciones específicas: los linfocitos T son responsables de la inmunidad celular y los linfocitos B responden de la inmunidad humoral, que es la que da lugar a la síntesis de anticuerpos. Junto a estos dos tipos celulares, intervienen otros como son los leucocitos neutrófilos, basófilos y eosinófilos de la sangre, los macrófagos, las células cebadas, que liberan histamina, o las células NK («natural killer»), con funciones inespecíficas, pero que actúan como verdaderos complementos del sistema inmune frente a las infecciones y tumores.
- De otra, dos tipos de *órganos linfoides*: 1). *Primarios*: médula ósea y timo; 2). *Secundarios*: bazo y nodulos linfáticos; tejidos linfoides asociados a la piel, a las mucosas, a los intestinos, al tracto respiratorio y al tracto genitourinario. También la sangre se puede incluir dentro de ésta categoría.

En los tejidos primarios se produce la proliferación de los linfocitos, antes de tener contacto con los antígenos. En el timo se produce una maduración de los linfocitos T, que da lugar a células funcionales responsables de la inmunidad celular, además de regular la inmunidad humoral de algunos antígenos denominados T-dependientes.

En los tejidos secundarios tiene lugar la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B, una vez que se ha producido el contacto con el antígeno. Los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral, maduran hacia células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Los linfocitos T se diferencian en una gran variedad de subpoblaciones con el cometido de distintas funciones: los «T helper» regulan la síntesis de anticuerpos por parte de las células plasmáticas; los «T citotóxicos» son capaces de destruir células; algunos linfocitos T producen citoquinas que regulan la función de las células no específicas como los macrófagos; los «T supresores» pueden suprimir la actividad de otros linfocitos.

A través de la sangre y de la linfa, las células linfoides se distribuyen desde los órganos linfoides a prácticamente todo el cuerpo humano, e incluso pueden abandonar los vasos sanguíneos y linfáticos y pasar al espacio extravascular, al igual que los anticuerpos y las citoquinas, producidos respectivamente por los linfocitos B y T.

Se pueden señalar dos características del sistema inmune que lo diferencian de otros sistemas corporales, y que determinan la dificultad de detectar los efectos perjudiciales de los xenobióticos sobre el mismo:

- por un lado, el sistema inmune tiene la propiedad de no estar confinado en una zona determinada dentro del organismo, sino que se encuentra distribuido y disperso prácticamente en todos los tejidos;
- por otro lado, el sistema inmune solamente entra en acción cuando ha de intervenir frente al peligro de una infección, a diferencia de otros órganos, tales como el riñón o los pulmones, donde las funciones propias del sistema se desarrollan de un modo permanente y continuo.

La resistencia frente a las diversas infecciones, o a los desórdenes neoplásicos, que pueden afectar a un organismo requiere la contribución activa de células inmunocompetentes desde un punto de vista funcional. Son células que deben proliferar y diferenciarse cuando se produce la agresión de un agente extraño, dentro de un mecanismo complejo, que condiciona la actividad de todas ellas en la defensa de la integridad fisiológica corporal. Pero cuando un xenobiótico es capaz de interferir en algún punto de este sistema regulador complejo, puede aparecer una alteración del sistema inmune, unas veces como una *inmunostimulación* capaz de ocasionar una autoinmunidad o una hipersensibilidad, otras veces como una *inmunodepresión* que probablemente provoca deficiencias en la resistencia del organismo.

En el último cuarto del siglo xx se ha puesto de manifiesto cómo la exposición del organismo humano a ciertas estructuras químicas procedentes de la medicación, o del medio ambiente, daban lugar a una inhibición del sistema inmune con el correspondiente incremento de la incidencia de infecciones, e incluso de ciertos trastornos neoplásicos. En el caso de los medicamentos, se ha comprobado en los pacientes que han recibido un trasplante, y que durante largo tiempo reciben un tratamiento con inmunosupresores, como azatioprina, muestran una mayor facilidad para contraer infecciones y al cabo de un cierto tiempo presentan un aumento en la incidencia de tumores. En el caso de compuestos químicos medio ambientales, se han detectado efectos inmunotóxicos en algunos al experimentar con modelos animales, si bien la evidencia epidemiológica humana es muy escasa y poco concluyente. Entre estas estructuras se pueden citar las siguientes: los compuestos bifenilos policlorados y polibromados, el 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD), el ozono, el dióxido de nitrógeno, el benceno, el tolueno, el dietilestilbestrol y los asbestos.

Mecanismos de los efectos tóxicos inmunológicos

Los efectos tóxicos causados por los xenobióticos sobre el sistema inmune pueden producirse por dos tipos de mecanismos:

- a) Como consecuencia de una interacción directa y/o indirecta del xenobiótico, o de algún metabolito, con algún elemento del sistema inmune;
- b) Como consecuencia de una respuesta inmunológica por parte del organismo bien frente al xenobiótico o a sus metabolitos, bien frente a los propios antígenos del organismo, que han sido modificados por el xenobiótico o sus metabolitos.

Dichos efectos se pueden presentar bajo diferente signos, de acuerdo con lo observado en las experiencias con animales:

- Cambios en el peso y en la histología de los órganos linfoides.
- Cambios cualitativos y cuantitativos en la población celular de los órganos linfoides.
- Alteraciones de las funciones inmunológicas.
- Alteración de la resistencia a las infecciones inducidas de modo experimental o a los tumores transplantables.

Por desgracia, se dispone de escasa información experimental acerca de los mecanismos exactos que se pueden considerar implicados en los efectos tóxicos inmunológicos, tal vez porque todavía no se domina el propio funcionamiento fisiológico del sistema inmune. Sin duda, esta circunstancia dificulta muchísimo el estudio de las sustancias inmunotóxicas.

Teóricamente, un xenobiótico podría ejercer su actividad tóxica sobre zonas diversas dentro del sistema inmune, porque en la práctica son variados los componentes de este sistema que se presentan como particularmente sensibles a los efectos de los xenobióticos.

Para una mejor comprensión habría que considerar las diversas fases que constituyen el proceso de la toxicidad inmunológica:

- a) La primera fase, denominada *fase de reconocimiento*, está formada por el primer contacto del xenobiótico con el antígeno.
- b) Le sigue una *fase adaptativa*, en la que tienen lugar la proliferación y la diferenciación de los linfocitos.
- c) Se continúa con la fase de *replicación clonal*.
- d) En la fase final se pone de manifiesto la reactividad inmune: las células B producen las inmunoglobulinas o proteínas anticuerpos, las células T sintetizan citoquinas y los macrófagos producen enzimas proteolíticas.

En algunas de estas fases resulta muy elevada la actividad mitótica y, precisamente, en ellas se da una mayor sensibilidad de la respuesta inmune frente a la actividad de sustancias que son citotóxicas, como los agentes alquilantes y los antimetabolitos de purinas y pirimidinas.

Presumiblemente, el efecto inmunodepresor de algunos xenobióticos se pueda deber a su actividad antiproliferativa. No obstante, aparte de esta especial sensibilidad del sistema inmune a las perturbaciones sobre la proliferación celular, también es probable que la capacidad destoxicadora de xenobióticos de los linfocitos sea menor que la de otras células.

Algunos xenobióticos presentan efectos indirectos a través del sistema endocrino, así por ejemplo la segregación de glucocorticoides puede conducir a un efecto inmunosupresor. También algunas deficiencias nutricionales pueden producir efectos tóxicos, como por ejemplo las deficiencias en zinc o en vitamina B₆, que pueden ser causa de la supresión de la inmunidad celular.

Además de las sustancias que causan inmunodepresión, existen varios xenobióticos que dan lugar a inmunoestimulación, que en algunos individuos conducen a desórdenes alérgicos sistémicos o enfermedades autoinmunes. El mecanismo por el cual se llega a estos efectos tóxicos corresponde al comportamiento del xenobiótico como un hapteno, capaz de unirse a un componente endógeno, como puede ser una proteína, de tal manera que el sistema inmune estima extraño a dicho componente y reacciona produciendo anticuerpos, dentro de un proceso que se conoce con el nombre de hapténización. Es el caso del antibiótico penicilina.

En otros casos, sustancias como la α -metildopa son capaces de modificar la molécula endógena sin unirse a ella, de tal modo que también ahora el organismo la juzga como un componente extraño.

En resumen, los agentes tóxicos pueden actuar sobre los puntos siguientes del sistema inmune:

- Desarrollo de células primarias en la médula ósea.
- Interacción de los macrófagos, células T y células B con los antígenos.
- Diferenciación y proliferación de las células T y B.
- Sistema del complemento.
- Fagocitosis y citotoxicidad.

Principales xenobióticos inmunomoduladores

Numerosos son los grupos químicos de xenobióticos de los que se han descritos efectos inmunomoduladores: hidrocarburos aromáticos halogenados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, algunos metales contaminantes, pesticidas, disolventes orgánicos, algunas drogas de abuso, siliconas, etc. De todos ellos, sólo se reseñarán datos de los más relevantes.

Hidrocarburos aromáticos halogenados

Se trata de una familia de xenobióticos (Fig. 12.1) muy estudiados en lo que respecta a su actividad tóxica sobre el sistema inmune. Mediante expe-

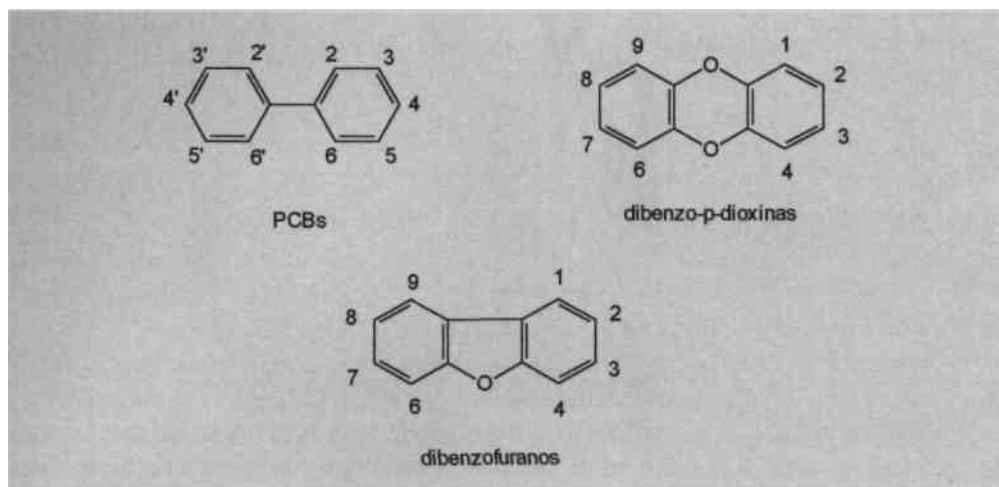


Figura 12.1. *Estructura química general de los bifenilos policlorados, dibenzo-p-dioxinas y dibenzofuranos. Los números indican las posiciones que pueden estar ocupadas por átomos de Cl.*

riendas con animales, de modo particular con roedores, se ha comprobado que tales compuestos dan lugar a una atrofia del timo, linfocitopenia e inmunosupresión, tanto en lo que respecta a la respuesta inmune celular como humoral. Aunque algunos estudios epidemiológicos también les relacionan con inmunotoxicidad en seres humanos, sin embargo no existe una evidencia concluyente acerca de una actividad inmunodepresora significativa. Un accidente ocurrido en 1979 en Taiwan con arroz contaminado con hidrocarburos aromáticos halogenados, reveló que las personas afectadas presentaban alteraciones en la función inmune: una reducción en el número de linfocitos T helper circulantes y una disminución de las respuestas de hipersensibilidad retardada, entre otras.

De toda esta familia de xenobióticos destacan cuatro: bifenilos policlorados, bifenilos polibromados, policloruros-dibenzo-furanos y 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD). Los dos primeros tienen aplicaciones industriales de acuerdo con sus peculiares propiedades, tanto químicas como físicas. El tercero no se produce comercialmente, pero sí representa un auténtico contaminante ambiental por su asociación con la producción de otros compuestos orgánicos (pentaclorofenol, mezclas de bifenilos polibromados, etc.). También el cuarto constituye un contaminante ambiental, que se forma primariamente como subproducto en las manufacturas que emplea fenoles clorados y durante la combustión de materiales clorados. Quizás sea el más potente de todos ellos en cuanto agente inmunotóxico.

Todos muestran efectos inmunotóxicos muy semejantes, debido posiblemente a la similitud de sus estructuras químicas, que les permite enlazarse al Ha-

mado receptor Ah (o receptor de hidrocarburos aromáticos), que es un complejo heterodimérico intracelular citosólico presente en varias células de mamíferos, de manera especial en el timo. Estudios recientes demuestran que la sensibilidad a la toxicidad de la dioxina tiene una base genética y que se hereda junto con el gen Ah, que codifica tanto al receptor citosólico como al TCDD. Es decir, ambos genes estarían situados en el mismo cromosoma o incluso pudiera ser que fuesen idénticos. Según parece, el xenobiótico se enlaza al receptor Ah en las células epiteliales del timo, lo que les induciría a diferenciarse más rápidamente. Como consecuencia de ello, se vería alterada su función de servir de soporte en el proceso de maduración de los timocitos a células T adultas. Por esta razón, este tipo de compuestos ejercen un efecto máximo cuando la exposición tiene lugar en el periodo en el que el tejido epitelial es más activo, es decir en el periodo perinatal.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Responden a un tipo de contaminantes ambientales muy ubicuos, porque llegan al medio ambiente a través de muchas rutas, que incluyen la combustión de los combustibles fósiles y los fuegos forestales. Además de ser mutagénicos y cancerígenos, también han demostrado ser agentes tóxicos inmunosupresores, sobre todo en lo que respecta a la inmunidad humoral y a la resistencia del organismo frente a las infecciones. El más destacado de todos ellos en ámbito de la actividad tóxica inmunológica es el benzo(a)pireno.

Metales

Los metales han demostrado tener actividades tóxicas sobre los más diversos sistemas corporales, tales como enzimáticos, membranas, orgánulos celulares, etc. Con respecto al sistema inmune se ha podido observar que, a muy bajas concentraciones, actúan como enaltecadores de la inmunidad, mientras que a niveles elevados resultan inmunosupresores. Los mejores estudiados son plomo, arsénico, mercurio, cadmio y los derivados del estaño (agentes catalíticos y agentes biocidas). Respecto de su inmunotoxicidad se ha observado que estos metales incrementan la susceptibilidad frente a las infecciones. Así por ejemplo, el plomo reduce la resistencia frente a las bacterias patógenas (*S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*). La actividad tóxica en el caso del arsénico se halla muy vinculada a la forma química bajo la cual se encuentra el xenobiótico. En cambio, el mercurio ha resultado inmunotóxico tanto en sus formas orgánicas como inorgánicas. El cadmio incrementa la susceptibilidad a los efectos nocivos de bacterias patógenas y virus, pero enaltece la resistencia al desarrollo de tumores.

Pesticidas

En esta amplia familia de xenobióticos se distinguen varias clases en función de su estructura química, entre las que destacan los órganoclorados, los órganofosforados, los organoestánnicos y los carbamatos. Todos ellos han resultado inmunotóxicos en experiencias con animales, pero no se dispone de datos concluyentes en lo que respecta a los seres humanos.

Sustancias inhaladas y disolventes orgánicos

Las defensas pulmonares frente a sustancias inhaladas, como humo de tabaco, asbesto, formaldehído, gases oxidantes, tetracloruro de carbono, etc., dependen de los mecanismos físicos e inmunológicos vinculados a la inhalación de estos compuestos.

Evaluación de la inmunotoxicidad

Como consecuencia de la investigación inmunológica se han desarrollado un gran número de ensayos diversos, cuya relevancia para la determinación de la inmunotoxicidad ha sido establecida en algunos casos: de modo particular para los modelos que utilizan ratones y con menor validez para los modelos con ratas.

La evaluación de los efectos de los compuestos químicos sobre el sistema inmune se puede realizar en dos fases. Una primera fase de estudio general de inmunotoxicidad, que se puede realizar formando parte de los ensayos convencionales de toxicidad de 28 y 90 días, siempre y cuando se incluya en dichos estudios el análisis de parámetros de inmunotoxicidad. En este tipo de ensayos, los animales no están expuestos a antígenos ni se infectan con bacterias o parásitos para ver cómo funciona su sistema inmune; es decir no se realizan tests funcionales. La ventaja de esta aproximación es que se puede incluir en los tests generales de toxicidad crónica y de esta manera, cualquier hallazgo inmunológico puede ser interpretado de acuerdo con los efectos observados en otros órganos diana; la desventaja es que probablemente no se detecten todas las sustancias con efectos inmunotóxicos, y pueden darse falsos negativos. En una segunda fase y dependiendo de los resultados obtenidos en la primera, se realizarían un conjunto de ensayos sobre la función inmune, es decir utilizando estímulos inmunogénicos frente a los cuales se supone que responde el sistema inmune. Se trata por tanto de ensayos propiamente funcionales de inmunotoxicidad, que pueden ser totalmente *in vivo*, totalmente *in vitro*, o bien *ex vivo*, es decir con una fase *in vivo*, generalmente el estímulo con el antígeno y una fase *in vitro*, que suele ser la evaluación de la función inmune.

Formando parte de los estudios generales de toxicidad, para detectar posibles efectos sobre el sistema inmune, se pueden realizar las siguientes determinaciones:

- Estudio hematológico junto con el recuento celular.
- Medida de los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA.
- Peso y estudio histológico de los órganos linfoides: timo, bazo, nodulos linfáticos, etc.

Los nodulos linfáticos y bazo se dividen morfológicamente en áreas timo-dependientes y timo-independientes. Por consiguiente, esta división puede proporcionar información respecto de los efectos relativos sobre los compartimentos celulares T y B de las sustancias en estudio.

Asimismo, dependiendo de la vía de exposición, puede ser relevante el estudio del tejido linfoide asociado a los bronquios o al intestino; por ejemplo, puede ser un método muy útil cuantificar y caracterizar las células obtenidas del lavado broncoalveolar después de la exposición a sustancias tóxicas por inhalación.

- Estudios de las células de la médula ósea. El examen morfológico de la médula ósea resulta esencial para establecer una posible inmunotoxicidad. El análisis microscópico se puede realizar utilizando secciones, pero también frotis o preparaciones citocentrifugadas de células obtenidas de la médula ósea.
- Estudios de inmunocitoquímica y citometría de flujo de los órganos linfoides para detectar posibles variaciones en las subpoblaciones celulares o la presencia de determinados componentes plasmáticos, como inmunoglobulinas en las células plasmáticas.

Existe una gran variedad de ensayos funcionales tanto para evaluar la inmunidad celular como la inmunidad humoral, cuya descripción excedería las pretensiones de este texto.

La respuesta tóxica del sistema nervioso

- Introducción
- Breve descripción anatómico-funcional del sistema nervioso
- Alteraciones funcionales del sistema nervioso
- Clasificación de los efectos neurotóxicos y principales xenobióticos que los inducen

Introducción

El sistema nervioso es único por la gran complejidad de reacciones de control que ha de llevar a cabo sobre la mayoría de las funciones del organismo. Procedentes de los diferentes órganos sensoriales recibe innumerables estímulos, a los que integra y ofrece de ellos una respuesta. La mayor parte de las actividades del sistema nervioso nacen de las informaciones enviadas por los sentidos (experiencia sensorial), que provocan una respuesta nerviosa, unas veces inmediata y otras veces retardada. De este modo, al controlar las actividades corporales ejerce su influencia sobre la contracción muscular esquelética, la contracción de las fibras lisas de los órganos internos y la secreción de las glándulas endocrinas y exocrinas. Para que su trabajo resulte eficaz, el sistema nervioso necesita eliminar aquellas informaciones que considera sin importancia, con el fin de elaborar unas respuestas que sean adecuadas, a partir de todas las experiencias que le llegan.

La estructura del sistema nervioso resulta bastante compleja y ha podido ser conocida gracias a los estudios que ha sido necesario llevar a cabo para aclarar los efectos nocivos provocados por numerosas sustancias a las que están expuestos los seres vivos. Cada día se incrementa el número de lesiones nerviosas detectadas que tienen como origen la exposición a xenobióticos, unos procedentes del medio ambiente o de la alimentación, otros ingeridos como medicamentos.

Precisamente, la investigación realizada para aclarar la naturaleza neurotóxica de algunos sucesos catastróficos provocados por una imprevista exposición medioambiental a determinados xenobióticos, ha proporcionado una información muy útil sobre la organización y función del sistema nervioso. En este sentido, las reacciones de los compuestos exógenos con las membranas de las células nerviosas han suministrado los datos para precisar la naturaleza de los receptores específicos dentro del cerebro. Así mismo, la selectividad de ciertos agentes tóxicos, que dañan solamente determinadas clases de células, ha dado lugar al esclarecimiento de los papeles desempeñados por los diferentes tipos de células en las funciones del sistema nervioso.

La aprobación de nuevos medicamentos necesita de estudios toxicológicos previos, y la realización de tales investigaciones ha permitido explicar algunos de los síntomas neurotóxicos inducidos bajo condiciones controladas. Sin embargo, no ocurre lo mismo con las sustancias empleadas en los medios industriales, o en los hogares, como disolventes orgánicos: hidrocarburos alifáticos (n-hexano), hidrocarburos aromáticos (tolueno), alcoholes (metanol), etc.

Por todo ello, el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad resulta todavía incompleto, posiblemente porque esta patología del sistema nervioso inducida por muchos xenobióticos se caracteriza por la gran multiplicidad tanto de sus objetivos dianas como de sus síntomas. A menudo, existe una gran diferencia entre los síntomas correspondientes a una neurotoxicidad aguda y los presentados por otra de tipo crónico, casi siempre difusos y manifestados de un modo paulatino y gradual.

No obstante, el sistema nervioso presenta unas características muy particulares que han ayudado a comprender los tipos de acciones ejercidas por los agentes neurotóxicos, y que pueden ser resumidas en los siguientes principios generales:

- El sistema nervioso posee una organización privilegiada, que le permite disponer de una barrera protectora entre el sistema sanguíneo y el cerebro.
- Para el buen funcionamiento del sistema nervioso son esenciales los requerimientos energéticos del cerebro.
- Dentro del organismo, el sistema nervioso presenta una distribución espacial y sus células poseen una geometría compleja.
- Los elementos del sistema nervioso están inmersos en un medio que posee una gran riqueza lipídica.
- La transmisión de información se lleva a cabo a través del espacio extracelular.

Breve descripción anatómico-funcional del sistema nervioso

Para mejor comprender los posibles efectos neurotóxicos de los productos químicos conviene describir, al menos de un modo somero, las características anatómicas y funcionales del sistema nervioso (SN).

Desde un punto de vista anatómico, se suelen distinguir dos tipos de sistemas nerviosos:

- a) El *sistema nervioso central* (SNC), que comprende el cerebro, el tallo cerebral con el bulbo y la médula espinal.
- b) El *sistema nervioso periférico* (SNP), que está integrado por dos variedades de fibras nerviosas: las aferentes que trasladan los estímulos sensoriales y las eferentes que transmiten los impulsos motores.

Además de esta división anatómica también puede hacerse otra fundamentada en los aspectos funcionales:

1. Sistema nervioso *somático*, que corresponde a la parte del SN cuyas funciones son controladas de modo consciente. En él cabe hacer distinción del SN somasensorial, con fibras aferentes que conducen los estímulos desde los sentidos hasta el SNC, y el SN somamotor, con fibras eferentes que transmiten los impulsos desde el SNC a los músculos estriados responsables del movimiento.
2. Sistema nervioso *vegetativo o autonómico*, que controla el funcionamiento de los órganos internos y del que en su mayor parte no somos conscientes. También se distinguen dos componentes diversos: el *simpático*, constituido por neuronas procedentes de las zonas dorsal y lumbar de la médula espinal; y el *parasimpático*, constituido por neuronas procedentes del cerebro y la zona sacra de la médula espinal.

Cada nervio está formado por un haz de neuronas, vasos sanguíneos y tejido de sostén. Sin embargo, la unidad funcional del sistema nervioso es la *neurona*, compuesta de cuerpo celular o soma, de unas proyecciones delgadas hacia las zonas vecinas denominadas *dendritas* y del *axón*, que se prolonga siguiendo el nervio para terminar en los *botones sinápticos*, que integran las vesículas sinápticas secretoras de sustancias neurotransmisoras y las mitocondrias suministradoras del ATP necesario para la síntesis de tales sustancias.

Tanto el cuerpo neuronal como los botones sinápticos son las zonas donde tienen lugar, de modo fundamental, los procesos metabólicos que sintetizan compuestos y los que producen energía. Los productos metabólicos originados se desplazan a lo largo del axón a través de *microtúbulos* y *microfilamentos* constituidos por polímeros proteicos de tubulina. Todas las células del tejido nervioso necesitan de un aporte de energía bastante intenso, que siempre depende de modo exclusivo de la glucosa y del oxígeno. Por ello, los xenobióticos que interfieren con los aportes de estos dos compuestos pueden ocasionar trastornos neurotóxicos.

Lo normal es que una misma neurona solo tenga capacidad para sintetizar un tipo único de neurotransmisor, que se acumula en las vejigas sinápticas. Cuando se recibe un estímulo, la vesícula vierte estas sustancias en la *hendidura* o *espacio sináptico*, que transmite el impulso activador a la neurona adyacente, dentro de un efecto que puede ser excitador o inhibidor. De aquí que, según los

casos, las neuronas anteriores reciban el nombre de *neurona excitadora* o *inhibidora*.

En mayor número existen otras células *giales*, que se diferencian de las células nerviosas por su incapacidad para conducir los impulsos nerviosos, pero que de modo específico pueden realizar algunas de las funciones siguientes:

- Establecer el contacto entre las neuronas y el sistema circulatorio, con la finalidad de regular el microambiente que le rodea y de mantener la concentración extracelular de cationes K^+ .
- Rodear los axones de una vaina de mielina, un material rico en lípidos, tales como colesterol, fosfolípidos, y cerebrósidos, que desempeñan una función electroaislante.
- Actuar de macrófagos para destruir algún agente perturbador cuando sea necesario.

El axón de una neurona se encuentra separado de la adyacente por el espacio sináptico, que ha de ser atravesado por las sustancias químicas que difunden el impulso nervioso, es decir, los neurotransmisores. Entre la treintena de sustancias que pueden desempeñar esta función destacan sólo unas pocas: acetilcolina, noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, etc.

La transmisión de un impulso nervioso desde una neurona a otra adyacente tiene lugar a través de una sinapsis. En realidad, se conoce como sinapsis el punto de unión de una neurona (presináptica) con la adyacente (postsináptica) y, por tanto, es el lugar a través del cual se transmite la señal del impulso nervioso, en cuanto respuesta procesada de la información recibida. En el proceso sináptico intervienen los canales iónicos, constituidos por proteínas portadoras de grupos químicos con cargas eléctricas en la superficie estructural, que se desplazan con los cambios conformacionales para permitir el paso de algunos iones específicos: Na^+ , K^+ o Ca^{2+} . La apertura de tales canales tiene lugar con motivo de la llegada del impulso eléctrico, aunque en las membranas postsinápticas exigen la presencia de una sustancia neurotransmisora. Son los axones quienes las proporcionan, sustancias que actúan como un *primer mensajero*.

La despolarización de la membrana presináptica provoca la apertura de los canales de calcio y permite la emigración del neurotransmisor hacia la membrana postsináptica. Una vez alcanzada esta membrana, se unen a las proteínas de los canales de sodio y de potasio permitiendo, así, el intercambio de iones, con la aparición de un nuevo impulso nervioso. En este proceso interviene el denominado *segundo transmisor*, representado por la enzima adenilciclina que sintetiza el AMP-cíclico.

El desarrollo global del fenómeno sináptico implica la participación de tres factores: la secreción de una sustancia neurotransmisora, una despolarización de las membranas y una modificación de su permeabilidad. En el mismo, pueden intervenir varios tipos de receptores, que difieren unos de otros en la especificidad por el neurotransmisor y en su localización dentro del conjunto neuronal; según la naturaleza del fenómeno, la neurona puede recibir una excitación o una

inhibición. No obstante, el mecanismo de la transmisión sináptica viene a ser idéntico cualquiera que sea la naturaleza de la sustancia neurotransmisora, porque en la práctica tales sustancias se limitan a condicionar la apertura de los canales. Una vez que han cumplido sus funciones, las sustancias neurotransmisoras han de ser destruidas por enzimas específicas: monoaminoxidasas (MAO) para aquellas que son compuestos amínicos; esterasas, como la acetilcolinesterasa, para las de tipo éster; la fosfodiesterasa, que degrada el AMP-c. Precisamente, los objetivos dianas de la toxicidad de muchos xenobióticos suelen ser tanto los puntos de síntesis de estas enzimas, como las rutas a través de las cuales son degradadas estas sustancias transmisoras. Cuando se inhiben las enzimas degradadores, se acumula el neurotransmisor y su exceso produce trastornos en los mecanismos de la conducción.

Alteraciones funcionales del sistema nervioso

La función esencial del sistema nervioso es conducir y procesar las informaciones que recibe, actividad que tiene lugar principalmente por medio de fenómenos eléctricos. Numerosos xenobióticos neurotóxicos, con estructuras químicas muy diversas, perturban esos fenómenos eléctricos y alteran por consiguiente la función del sistema nervioso. Los resultados de esta neurotoxicidad pueden ser bastante variados, de acuerdo con los modos específicos de actuación de cada compuesto, que pueden afectar a un amplio rango de las funciones de las neuronas.

Las alteraciones funcionales del sistema nervioso se pueden producir como consecuencia de:

- *Efectos directos* sobre los canales de iones, que son fundamentales para el impulso nervioso. En este sentido, los canales de Na^+ , de K^+ y de Ca^{2+} , cada uno con sus funciones específicas, pueden ser perturbados por la actividad tóxica de algunos xenobióticos.
- *Efectos indirectos*, como resultado de cambios estructurales inducidos por los agentes neurotóxicos, que pueden afectar a los axones, a los cuerpos neuronales, a la vaina de mielina, o bien a los mecanismos de transporte celular de sustancias.
- *Efectos sobre la sinapsis*, cuando el xenobiótico produce alguna perturbación en el proceso de la sinapsis sin afectar ninguna estructura celular; generalmente, son alteraciones sobre la síntesis, degradación, transporte, etc., de los neurotransmisores.

Para interpretar de modo adecuado las observaciones obtenidas en los estudios neurotóxicos es importante considerar la localización propia de cada elemento del sistema nervioso y el medio que le rodea. Así, por ejemplo, las partes periféricas ofrecen una mayor exposición a los xenobióticos que las partes centrales, mas protegidas por la barrera que las separa de la circulación sanguínea.

Clasificación de los efectos neurotóxicos y principales xenobióticos que los inducen

Los efectos neurotóxicos provocados en los organismos vivos por la actividad tóxica de algunos xenobióticos pueden estar localizados a diferentes niveles del sistema nervioso: central, periférico, bien solos o bien acompañados de alteraciones en otros órganos y sistemas. No obstante, un mismo xenobiótico puede originar varios efectos neurotóxicos, que a su vez dependen de las dosis, de las rutas de exposición y de la especie animal sobre la que actúa.

De todos modos, los efectos neurotóxicos se pueden clasificar atendiendo a su localización del modo siguiente:

1. *Neuronopatías* (sensoriales o motoras), que hacen referencia a daños en el cuerpo celular de las neuronas.
2. *Axonopatías* (proximales o distales, centrales o periféricas), cuando los afectados son los axones.
3. *Sinaptopatías* (presinápticas o postsinápticas), cuando la perturbación tiene lugar en el proceso de la sinapsis.
4. *Mielinopatías*, cuando se lesiona la vaina de mielina que recubre los axones.

Neuronopatías

Es importante señalar que esta denominación no debe ser confundida con el término *neuropatía* usado desde hace tiempo para indicar, de un modo general, las lesiones provocadas sobre los nervios periféricos. En cambio, ciertos agentes tóxicos son específicos del cuerpo celular de las neuronas, o al menos de un grupo particular de ellas, a las que ocasionan daños más o menos severos, que pueden ocasionar la muerte cuando la intoxicación resulta intensa.

Aunque en algunos aspectos las neuronas son semejantes a otros tipos de células, sin embargo resultan únicas en otros aspectos, por lo que la actividad sobre ellas de los agentes tóxicos conlleva un grave riesgo. Se conocen numerosos xenobióticos caracterizados por su toxicidad sobre las neuronas, aunque cada uno puede tener comportamientos específicos: aluminio, 6-amino-nicotinamida, arsénico, bismuto, cloranfenicol, estreptomycin, manganeso, mercurio, monóxido de carbono, plomo, talio, tetracloruro de carbono, etc.

Aunque las neuronopatías hacen referencia a lesiones sobre el cuerpo celular de la neurona, los efectos observados suelen ser bastante difusos, a pesar de la especificidad que presentan los agentes tóxicos por determinados tipos de neuronas. Normalmente se advierte una encefalopatía difusa con disfunciones globales, aunque su sintomatología refleja la existencia de una lesión cerebral. Al daño inicial producido sobre la célula nerviosa, le puede seguir una necrosis que desemboca en una destrucción total. Por lo general, la pérdida de una neuro-

na suele ser un fenómeno irreversible, que incluye una degeneración de todo el conjunto: citoplasma, dendritas, axones y mielina. Sin embargo, el sistema nervioso tiene tan gran cantidad de neuronas que, al cabo de cierto tiempo, ha podido recuperar la función perdida, porque otras neuronas adquieren dicha capacidad funcional.

Como el metabolismo de las neuronas depende por completo del suministro de glucosa y oxígeno, tales células resultan muy sensibles a cualquier condición de anoxia e hipoglucemia que pueda provocar algún xenobiótico, de los que se pueden citar varios ejemplos:

- a) Los *barbitúricos* inducen anoxia en el cerebro y de modo particular en algunas áreas de la corteza cerebral, tales como el hipocampo y el cerebelo. A pesar de ello, los daños permanentes producidos por los barbitúricos sobre el sistema nervioso central suelen ser bastante raros.
- b) Los *cianuros* y las *azidas* inhiben el sistema enzimático citocromo-oxidasa y, por tanto, son causas de anoxias citotóxicas.
- c) La exposición crónica al *monóxido de carbono*, en cuanto bloquea el transporte de oxígeno por la hemoglobina de los eritrocitos, puede ocasionar un daño duradero en el cerebro como consecuencia de una esclerosis en el tejido nervioso blanco, denominada por ello leucoencefalopatía.

Otros xenobióticos, en cuyas estructuras químicas intervienen alguno de los metales pesados, actúan de modo directo sobre el cuerpo celular de la neurona debido a su capacidad para reaccionar con los grupos sulfhidrilos. En este sentido, destacan los compuestos organometálicos, tales como *metilmercurio* y *trietilestano*, cuyo carácter lipófilico les facilita su penetración en la barrera cerebral.

El *metilmercurio* puede, inicialmente, ocasionar una pérdida local de ribosomas, para conducir después a una desintegración de los cuerpos de Nisse; incluso puede llegar a la destrucción total de la neurona. La toxicidad neuronal de este compuesto se puso de manifiesto de modo trágico en las graves intoxicaciones ocurridas en Japón, como consecuencia de la ingestión de pescados, contaminados por los efluentes industriales; así como en el Irak, por el consumo de granos de cereales que habían sido tratados con dicho compuesto al ser considerado como un pesticida económico. En ambos casos, los cuadros clínicos observados variaban no sólo con la severidad de la exposición, sino también con la edad de los individuos afectados en el momento de la exposición. Así, las zonas dañadas de modo más dramático en las personas adultas eran las neuronas de la corteza visual y los granulos internos pequeños de la corteza del cerebelo, cuya degeneración masiva daba lugar a una ataxia muy marcada. En cambio, la exposición en la etapa fetal presentaba pérdidas muy extendidas de neuronas, que cuando eran muy intensas se traducían en un retraso mental profundo después del nacimiento, e incluso fueron observados algunos casos de parálisis.

Aunque su mecanismo de acción ha sido estudiado de modo intenso, todavía se desconoce si el verdadero agente tóxico responsable de las lesiones es el

compuesto órganomercurial o el ion mercúrico liberado. Desde luego, esta catión tiene la capacidad de enlazarse fuertemente a los grupos sulfhidrilos de muchas proteínas biológicas, mientras que el derivado orgánico no lo hace. Como consecuencia de esta actividad tóxica han sido observadas una gran variedad de aberraciones en las funciones de las neuronas, sobre todo desfases en el conjunto de las reacciones implicadas en diversos procesos bioquímicos, tales como glucolisis, síntesis de los ácidos nucleicos, respiración aeróbica, síntesis proteica, etc.

Según parece, la toxicidad de este compuesto está modulada por numerosas reacciones, sin que se haya podido identificar ninguna de ellas como objetivo diana crítico. Además, se piensa que su relativa especificidad por determinados tipos de neuronas no se debe a que el producto presente una peculiar distribución tisular, sino más bien a la particular vulnerabilidad de tales neuronas.

El *trimetilestaño*, suele ser usado por la industria como agente plastificante, mientras que en el ámbito agropecuario se emplea como agente antifúngico y como pesticida. Las intoxicaciones provocadas por este compuesto se relacionan con un síndrome cerebelo-límbico, que ha sido descrito en seres humanos. Según parece, una vez que el compuesto accede al sistema nervioso provoca un daño neuronal difuso por un mecanismo no definido. Algunas experiencias han establecido la posible participación de una proteína, denominada estannina, que se encuentra presente de modo particular en aquellas neuronas sensibles a este compuesto. También se ha sugerido que estos efectos neurotóxicos se deben a interferencias con la producción de energía.

Así mismo, los metales bajo su forma inorgánica pueden alcanzar el tejido cerebral y provocar daños neurotóxicos. Tal es el caso del *plomo*, que ha ocasionado problemas neurotóxicos desde su empleo en baterías eléctricas, esmaltes, hojalata, etc., y sobre todo desde su adición a las gasolinas como alquil-plomo, en cuanto representa una importante vía primaria de emisión al medio ambiente, al que llega bajo la forma de óxidos o de cloruros. Los niños suelen ser especialmente sensibles a los efectos neurotóxicos del plomo y pueden manifestar síntomas, tales como hiperquinesia, dificultades en el aprendizaje e incluso retraso mental.

Igualmente, la exposición al *aluminio* puede repercutir en daños tóxicos al inducir una desgranulación de las neurofibrillas, lesión que para algunos investigadores podría ser el origen de la demencia senil o enfermedad de Alzheimer.

Todavía cabe citar otros xenobióticos que actúan sobre las neuronas a través de otros mecanismos: el *glutamato*, un neurotransmisor que estimula las dendritas en el soma de ciertas células nerviosas, cuya ingestión masiva y frecuente puede causar, en un principio, una despolarización crónica de las membranas somáticas y conducir, después a una perturbación de la homeostasis iónica. La *adriamicina*, un medicamento a base de *doxorubicina*, que tiene limitada su aplicación en la quimioterapia del cáncer, no solo por su toxicidad cardíaca sino también porque puede producir lesiones en las neuronas del sistema nervioso periférico. Precisamente, sus propiedades antineoplásicas provienen de su capa-

cidad para intercalarse en la doble hélice molecular del ADN e interferir con el proceso de la transcripción. Como todas las neuronas necesitan de este proceso también puede ocasionar una neurotoxicidad.

Muchas *catecolaminas*, entre las que destaca la *dopamina* al presentar una actividad citotóxica más acentuada, debido a su mayor facilidad para sufrir auto-oxidación y pasar a un derivado ortoquinónico muy reactivo. En la actualidad se piensa que la pérdida progresiva de neuronas catecolaminérgicas vinculadas al incremento de la edad, deriva en gran parte de la toxicidad de los productos de oxidación de las catecolaminas. En el organismo, la enzima monoaminooxidasa (MAO) puede realizar esta actividad oxidante con la producción de H_2O_2 , un conocido metabolito citotóxico. También la autooxidación de las catecolaminas, y de modo particular la *dopamina*, puede ser catalizada por los iones metálicos, con la formación de tres estructuras reactivas: un derivado quinónico, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y dos especies radicalarias de oxígeno ($O_2^\pm$ y $OH^\bullet$). No obstante, se debe indicar que todas ellas suelen estar biológicamente muy bien controladas: a) El glutatión celular protege del flujo de quinonas, b) la glutatión-peroxidasa y la catalasa actúan sobre el peróxido de hidrógeno, c) la superóxido-dismutasa neutraliza los iones (V).

Un análogo de la dopamina, la *6-hidroxi-dopamina*, resulta un agente neurotóxico de gran potencia, al sufrir un proceso de oxidación semejante al de la dopamina, y provocar una destrucción selectiva de las neuronas del sistema nervioso simpático; con ello se produce una descompensación en el tono parasimpático, para dar lugar a una hipermotilidad del sistema gastrointestinal. Precisamente, la propiedad tóxica de este compuesto suele ser utilizada por los neurobiólogos para destruir, de modo experimental, las neuronas catecolaminérgicas.

Por último, el *l-metil-4-fenil-l,2,3,6-tetrahidro-piridina* (MPTP) resulta responsable de un síndrome irreversible, bastante parecido al de la enfermedad de Parkinson. Se trata de un compuesto conocido de modo erróneo como «heroína sintética», que no se disocia en la sangre a la que puede llegar por inyección corporal voluntaria. Bajo estas condiciones, atraviesa con facilidad la barrera cerebral y se difunde hacia todas sus células. Sorprende que pueda ser sustrato de la isoenzima B de la monoaminooxidasa celular, que le facilita dos electrones para su oxidación y origina un ion piridinio, capaz de penetrar en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra a las que degenera y destruye.

Axonopatías

Suelen ser las formas más comunes de lesiones inducidas por los agentes neurotóxicos, porque los axones son la primera zona afectada del conjunto celular nervioso. Aunque el cuerpo celular pueda permanecer intacto, cualquier lesión en el axón conduce a una degeneración, que de modo secundario puede afectar a la mielina que le recubre. Se ha observado una mayor frecuencia de lesiones en los axones largos que en los de longitud reducida, así como impor-

tantes diferencias entre los daños ocasionados en los axones del sistema nervioso central y en los del sistema periférico.

Aunque suelen ser bastante numerosos los xenobióticos capaces de dañar a los axones, sin embargo solo un grupo de ellos pueden dar lugar a pérdidas con significación patológica, entre los cuales destacan la *y*-dicetona, el sulfuro de carbono, los derivados nitrílicos, la acrilamida, los ésteres órganofosforados, la metil-*n*-butil-cetona, etc. Hasta el momento presente, todavía no se conoce el mecanismo bioquímico a través del cual se origina la toxicidad axónica de estas sustancias. No obstante, su efecto último equivale a la producción de un corte o sección en el axón, que provoca una degeneración a uno y otro lado del mismo.

La respuesta neuronal a este tipo de lesiones se caracteriza por el intento de reparar el daño mediante una regeneración, que se traduce en un movimiento de los núcleos de las células hacia las membranas y en un incremento de la actividad de biosíntesis de compuestos, dentro de un proceso conocido con el nombre de cromatolisis, que debe ser tomado como un índice de la síntesis de un nuevo axoplasma. Los nuevos elementos sintetizados son transportados a lo largo del axón para ser acumulados en la parte lesionada.

Las lesiones en los axones de los nervios periféricos se manifiestan unas veces como simple mononeuritis y otras como polineuritis, que representan las de mayor frecuencia y responden a una afectación de un mismo nervio en ambos brazos o piernas, con alteraciones sensitivas, motoras y vegetativas. La causa de este tipo de neurotoxicidad suele ser el desajuste en las reacciones de producción de energía. Un buen ejemplo de esta anomalía se tiene con el *arsénico*, que se enlaza con el ácido lipoico y perturba la función de la enzima cocarboxilasa, circunstancia que también ocurre con la deficiencia de tiamina y, por ello, uno de los síntomas que caracteriza al *beri-beri* es precisamente la presencia de polineuropatías. El *talio* origina una hinchazón mitocondrial y degeneración.

Las axonopatías distales inducidas por algunas sustancias químicas pueden corresponder a dos tipos con manifestaciones diferentes:

- La causada por el *tri-orto-cresil-fosfato*, con una típica acumulación focal, o multifocal, de retículo endoplásmico liso delante de los axones distales degenerados.
- La provocada por diversos disolventes orgánicos, tales como el *n*-hexano, las *y*-dicetonas o el *sulfuro de carbono*, y por sustancias como la *acrilamida*, responsables de neuropatías distales caracterizadas por una hinchazón de los axones debida a la acumulación de microfilamentos.

Durante la década de los años sesenta fue detectado el desarrollo progresivo de una axonopatía distal sensoriomotora en personas sometidas a exposiciones de elevadas concentraciones del disolvente orgánico *n*-hexano, con síntomas semejantes a los presentados por algunos profesionales de la industria impresora intoxicados con el compuesto metil-*n*-butil-cetona (2-hexanona). El estudio de la causa de esta coincidencia permitió aclarar el metabolismo de estas dos estructuras de seis átomos de carbono: la oxidación en el carbono co-1 de la

cadena carbonada conducía a la formación de una γ -dicetona, la 2,5-hexanodiona, un metabolito común a estos dos compuestos que presenta actividad tóxica (Fig. 13.1). La confirmación de este dato se obtuvo al encontrarse que otras γ -dicetonas, o bien sus compuestos precursores, presentaban una neurotoxicidad similar, mientras que no se producían dichos efectos neurotóxicos con las formas alfa y beta de las mismas dicetonas.

Según parece, las γ -dicetonas reaccionan con los grupos aminos de los axones para dar lugar a estructura de pirróles, cuya formación ha sido considerada como una etapa en la patogénesis de estas axonopatías, al haberse puesto de manifiesto dos observaciones importantes:

- La 3,3-dimetil-2,5-hexanodiona, que en su metabolismo no se convierte en estructura pirrólica, no resulta neurotóxica.
- Los diastereómeros *d,l* del compuesto 3,4-dimetil-2,5-hexanodiona resultan mucho más neurotóxicos en cada una de sus dos formas que bajo la forma *meso*, porque son transformados en pirróles con mayor rapidez.

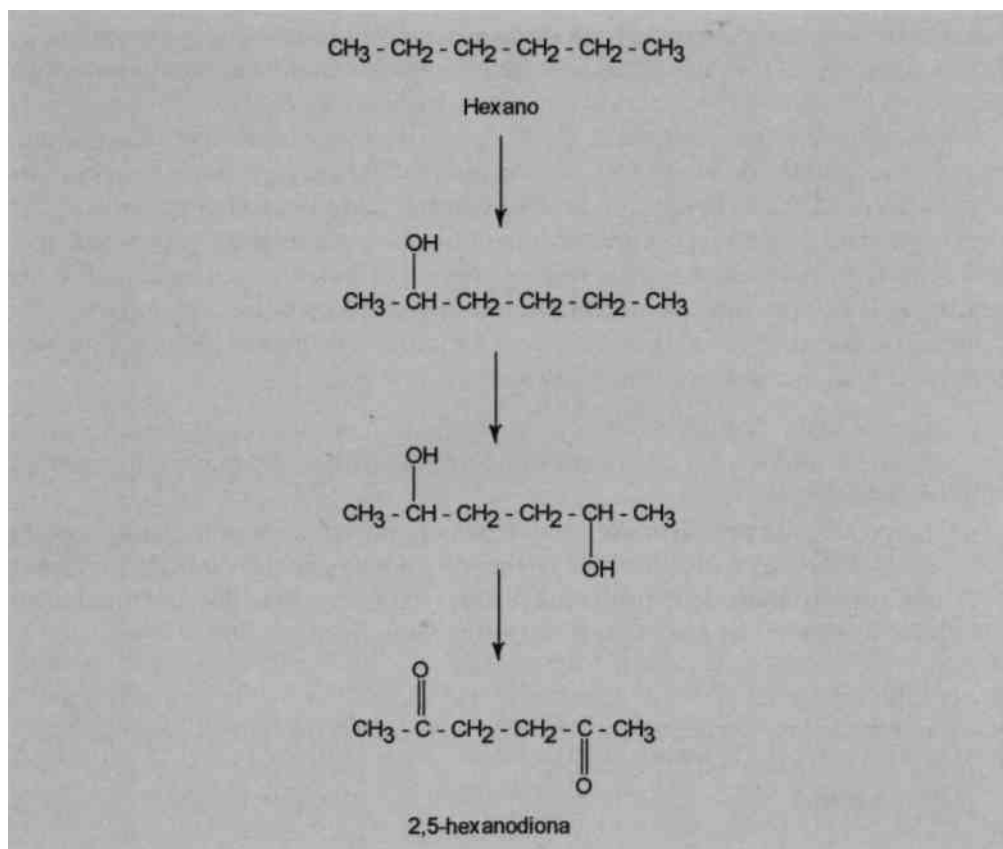


Figura 13.1. *Oxidación del hexano.*

La neuropatía ocasionada por el n-hexano ha sido una de las más estudiadas con la finalidad de resolver la controversia planteada sobre si verdaderamente el daño provocado se debía a las estructuras pirróles formadas o a los productos resultantes de sus oxidaciones. Las experiencias realizadas han puesto de manifiesto la necesidad de una oxidación de la estructura pirrol seguida por un ataque nucleofílico a los neurofilamentos, para dar lugar a enlaces cruzados.

También el *sulfuro de carbono*, utilizado por las industrias de plásticos, ha sido reconocido como un xenobiótico que puede ser la causa de una axonopatía distal, con una patología semejante a la de las intoxicaciones con n-hexano. Este dato apoya el supuesto de la formación de neurofilamentos con enlaces covalentes cruzados. La diferencia que el sulfuro de carbono presenta frente al n-hexano es la de no necesitar de una biotransformación para manifestar su actividad tóxica, porque el agente tóxico es su estructura primaria, capaz de formar aductos en forma de ditiocarbamatos con los grupos aminos epsilon de los restos de Usina integrados en las proteínas.

El gran problema presentado por las investigaciones toxicológicas acerca de los efectos de las exposiciones a los disolventes orgánicos ha sido el poder reproducir, de modo experimental con animales, la acción combinada de diversos disolventes, o su acción conjunta con otros xenobióticos.

Asimismo, la *acrilamida*, un monómero vinílico usado en la industria papera, tiene la capacidad de inducir una axonopatía distal tóxica.

Por último, la *piridienotiona de zinc*, usada en la elaboración de champús para el tratamiento de la seborrea, ha resultado ser neurotóxica en experiencias con roedores. Aunque el zinc del producto que se haya podido ingerir se elimina con las heces, sin embargo el resto de la molécula se absorbe y presenta actividad tóxica. Al parecer, los quelatos que forma la piridienotiona con el sodio se oxidan a disulfuros, que después reaccionan con las proteínas. No obstante, se ignora la naturaleza de la reacción auténticamente responsable del mecanismo a través del cual ejerce su neurotoxicidad.

Sinaptopatías

La neurotransmisión del impulso nervioso puede ser alterada por la actividad tóxica de algunos xenobióticos, que interfieren con la sinapsis sin que se vea amenazada la integridad celular. Son varios los procesos sinápticos que se pueden ver afectados por esta forma de neurotoxicidad: la biosíntesis y el metabolismo del neurotransmisor; el transporte axonal y la liberación de las sustancias neurotransmisoras; la comunicación señal —receptor; la captación y la interacción del neurotransmisor con el receptor; etc.

De estos tipos de xenobióticos se pueden citar varios ejemplos:

- La *toxina botulínica*, que causa parálisis muscular al inhibir la liberación de acetilcolina en las terminaciones de los nervios motores.

- La *6-hidroxi-dopamina*, que captada por las terminaciones de los axones dopaminérgicos y noradrenérgicos puede dar lugar a especies radicalarias de oxígeno, a través de un ciclo redox. Suele ser usada como sustancia modelo en neurotoxicología experimental.
- Los *insecticidas organofosforados*, que suelen inhibir la enzima acetilcolinesterasa, dando lugar a una despolarización, seguida de una hiperpolarización, con perturbaciones en las transmisiones colinérgicas de los nervios motores. En el caso del paratión, se necesita una biotransformación a paraoxón para que aparezca una actividad tóxica. Precisamente, las diferencias que existen en los procesos de biotransformación de cada especie hace que el malatión sea más tóxico para los insectos que para los mamíferos.

Otras sustancias tóxicas que afectan a la neurotransmisión son:

- El *hidruro de boro*, que reduce la secreción de norepinefrina y serotonina.
- El *sulfuro de carbono*, que reduce la norepinefrina e incrementa la dopamina.
- El *DDT* y el *dieldrín*, que reducen la acetilcolina y la norepinefrina.
- El *manganeso*, que reduce las serotonina, norepinefrina y dopamina.

En realidad, como las perturbaciones que se ocasionan en las sinaptopatías no significan cambios estructurales irreversibles, o no conducen a respuestas tóxicas, su estudio corresponde más propiamente al ámbito de la farmacología.

Mielinopatías

La capa de mielina que recubre a los axones suministra un aislamiento eléctrico del proceso neuronal y su ausencia provoca una aberración, o una lentitud, en la conducción de los impulsos entre dos neuronas adyacentes. La pérdida de esta capa protectora de mielina, dentro de un proceso conocido como desmielinación, puede resultar de una acción tóxica directa sobre su propia estructura como consecuencia de alteraciones a nivel de transcripción del ARN-m.

También se conocen otros tipos de alteraciones capaces de ocasionar una desmielinación, entre las que cabe destacar dos:

- Inhibición de las actividades de la anhidrasa carbónica y de otras enzimas implicadas en el transporte de agua y de iones.
- Inhibición de las actividades de las enzimas involucrados en el proceso de la fosforilación oxidativa, que tiene como consecuencia negativa una reducción de los niveles de las moléculas de ATP, tan necesarias para muchas funciones de transporte y de quelación de metales.

Se pueden citar ejemplos de algunos agentes tóxicos que, además de los efectos ya citados, también presentan este efecto directo sobre la vaina de mielina. Así, el *trietilestaño*, descubierto como contaminante de un medicamento a base de dietilestaño, aplicado contra el acné; el *hexaclorofeno*, sustancia desinfectante que, según se descubrió en 1972, ocasionó en Francia la intoxicación de muchos bebés por ser tratados con polvos de talco que incorporaban este producto a niveles del 6 % en lugar del 3 % aprobado. Su toxicidad se debe al desacoplamiento que provoca en las reacciones de la fosforilación oxidativa. Igualmente, los estudios llevados a cabo con animales de experimentación para observar los efectos tóxicos del *plomo*, pusieron de manifiesto una neuropatía periférica, caracterizada por una intensa desmielinación. Sin embargo, las observaciones realizadas en los seres humanos han señalado la aparición de síntomas neurotóxicos muy variables.

PARTE IV

PREVENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD



Dalechamps, Lacques (1513-1588). «*Historiageneralisplantarum....*»
Editado por Gulielmum Rovillium, 1587.

La terapéutica antitóxica

- Consideraciones generales
- Conceptos de antagonista y de antídoto
- Fundamentos de la terapéutica antitóxica
- Terapéutica antitóxica basada en interferencias con la absorción del tóxico
- Terapéutica antitóxica basada en el incremento de la velocidad de eliminación del tóxico
- Terapéutica antitóxica basada en una elevación del umbral de toxicidad
- La terapéutica antitóxica y el diagnóstico de intoxicaciones

Consideraciones generales

La Toxicología tiene como preocupación primordial resolver aquellas situaciones en las que se pone en peligro la vida de un ser vivo, como consecuencia del efecto nocivo que ha resultado de la actividad perniciosa de una estructura química determinada. Y para ello, estudia cómo se consigue la neutralización de ese daño e, incluso, cuáles han de ser las medidas más adecuadas para prevenirlo.

Algunas veces, el efecto nocivo puede ocasionar la muerte de las células del tejido vivo, que para funcionar con normalidad debe regenerar de nuevo esas células; en el caso de no poder hacerlo, dicho efecto tóxico será irreversible y mortal. Pero, la mayoría de las veces, el daño más o menos intenso consiste en una alteración de la función biológica, que bajo ciertos tipos de condiciones puede llegar a ser reversible.

Sin duda, existen una serie de procesos terapéuticos que se aplican con este objetivo y, por ello, han de ser considerados no sólo como verdaderamente importantes, sino también de gran transcendencia, porque están orientados a defender la salud y la vida del ser vivo. Al conjunto de todos los procesos encaminados a conseguir la reversibilidad de un daño tóxico se le conoce con el nombre de *terapéutica antitóxica*.

En la práctica, la base de cualquier proceso antitóxico debe estar fundamentada sobre tres principios, estrechamente relacionados con todos los que rigen el desarrollo de los mecanismos implicados en el fenómeno tóxico. Es decir, las enunciaciones de tales principios están reguladas por los tres factores que son importantes en el desarrollo del hecho toxicológico, puesto que determinan la concentración del tóxico en la sangre: dosis, vía de administración y tiempo de actuación.

Por consiguiente, todo proceso antitóxico ha de estar cimentado en los tres principios siguientes:

1. La intensidad de cualquier reacción químico-biológica se encuentra relacionada con la dosis alcanzada por la sustancia química en el punto del sistema biológico donde se encuentra su receptor. Cuando el efecto tóxico es reversible, el organismo vivo se va recuperando a medida que disminuye esta concentración del tóxico. En el caso de un efecto irreversible, el daño tóxico permanecerá aun cuando el agente desaparezca de su punto de acción.
2. El efecto tóxico de una sustancia química depende de modo importante de la vía de administración, puesto que ella influye en la posibilidad de penetrar en el organismo y en la velocidad para su distribución por el mismo. Por consiguiente, una vez administrado un tóxico, su concentración a nivel tisular va a depender de sus propiedades fisicoquímicas, que serán las determinantes de su capacidad para superar las barreras fisiológicas que se le oponen para su distribución, así como de sus posibilidades de fijación, metabolización y eliminación.
3. Se puede afirmar que la intensidad de toda reacción químico-biológica debe ser considerada como una función del tiempo, puesto que de este factor depende en gran medida la distribución y permanencia de la sustancia química dentro del organismo vivo. De acuerdo con ello, también el daño tóxico será más o menos intenso según el tiempo que el receptor haya podido quedar expuesto a los niveles de concentración tóxica. De aquí, que el tiempo sea un factor tan esencial en la terapéutica antitóxica, cuya incidencia nunca debe ser ignorada.

Conceptos de antagonista y antídoto

Todo agente tóxico es una estructura química determinada, que tiene afinidad de reacción por algún receptor específico localizado en el organismo vivo, y ejerce su acción tóxica, porque modifica la función normal de ese sistema biológico.

Sin embargo, desde el punto de vista de la terapéutica antitóxica existe un hecho que resulta primordial: existen algunas estructuras químicas que son capaces de oponerse a la acción del tóxico a través de los más diversos mecanis-

mos. De acuerdo con su modo de actuación, tales sustancias reciben el nombre de antagonistas o de antidotos.

Se denominan *antagonistas* aquellas sustancias que se oponen a la acción del tóxico a nivel de receptor. Esta actividad antagonista puede ser realizada a través de dos mecanismos diferentes:

- a) Compitiendo con las estructuras tóxicas por sus receptores específicos: cloropromazina, contra las anfetaminas; la nalorfina o N-alil-morfina, contra la morfina; el oxígeno, contra el monóxido de carbono, etc.
- b) Estimulando una actividad orgánica que sea contraria a la inducida por el tóxico sobre el receptor y que tiene la finalidad de superar, o incluso anular, el defecto funcional provocado: atropina, contra los inhibidores de la acetilcolinesterasa y contra las drogas colinérgicas; la vitamina K, contra las cumarinas; el azul de metileno, contra la metahemoglobina; la procainamida, contra la digital; etc.

Por consiguiente, en la práctica existen dos tipos distintos de antagonistas:

- Antagonistas específicos, que actúan directamente sobre el mismo receptor sobre el que actúa el tóxico: unas veces, ejercen un bloqueo del receptor antes de que el tóxico pueda llegar hasta él; otras veces, desplazan al tóxico de su unión con el receptor, interrumpiendo de este modo su acción.
- Antagonistas inespecíficos, que actuando sobre puntos diferentes al receptor, provocan sin embargo una acción que se opone a la que el tóxico suscita sobre su receptor.

Reciben el nombre de *antidotos* aquellas sustancias que ejercen su acción de modo directo sobre la estructura química del tóxico, y nunca sobre el receptor. Son agentes químicos que pueden inactivar al tóxico, o al menos impedir su acción, a través de diversos tipos de mecanismos:

- a) Por destrucción de la estructura tóxica:
 - Neutralización: de ácidos, con bicarbonato sódico, hidróxidos de calcio, magnesio o aluminio, jabones; de bases, con ácidos cítrico o acético, o bien limón o vinagre.
 - Oxidación: empleo de solución de permanganato potásico para destruir las estructuras de alcaloides y cianuros.
- b) Por bloqueo del tóxico:
 - Adsorción del tóxico con carbón activado, como en el caso de alcaloides.
 - Absorción con agua albuminosa de clara de huevo, eficaz en el caso de metales.
 - Insolubilización, unas veces con sulfato sódico para el Ba, otras con formaldehído-sulfóxido sódico (Rongalita) para Hg y Bi, oxálico para las sales de Ca, etc.
 - Quelación, fundamentalmente con dimercaptopropanol para metales pesados.

c) Por transformación de su estructura química en otra menos tóxica.

— Los cianuros se tratan con tiosulfato sódico para convertirlos en aniones sulfocianuros, mucho menos tóxicos.

Como no se disponen de antagonistas y antidotos que puedan tener carácter universal, es decir, que sirvan para todos los casos, conviene que en su defecto se aplique la metodología y el agente químico más apropiado para cada caso particular.

Fundamentos de la terapéutica antitóxica

Como es bien conocido, todo efecto tóxico depende de dos factores importantes:

a) De la concentración que alcance el tóxico en el lugar de su receptor, teniendo en cuenta que existe una *concentración umbral* por encima de la cual puede aparecer el daño tóxico. Se ha comprobado que la concentración a nivel de receptor está regulada a su vez por otros dos factores:

— La velocidad de llegada del tóxico al sistema biológico donde se encuentra su receptor.

— La velocidad de eliminación, o de inactivación, del tóxico.

b) Del tiempo de contacto del tóxico con su receptor a niveles superiores a la concentración *umbral*.

Cuando se representa de modo gráfico la concentración del tóxico a nivel de receptor frente al tiempo de actuación, la zona tóxica queda simbolizada por el área delimitada por la curva y la línea paralela al eje de abscisa que corresponde al nivel *umbral* (Fig. 14.1).

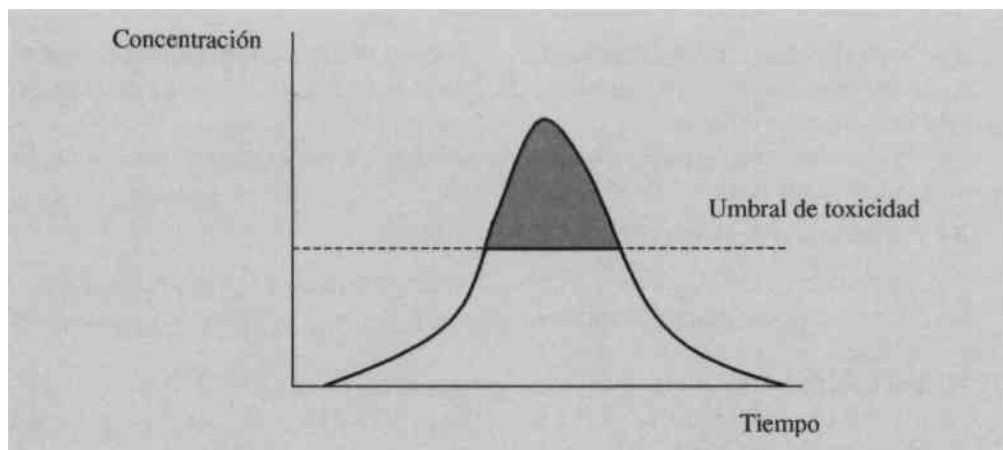


Figura 14.1. *Variación de la concentración de xenobiótico con el tiempo a nivel de receptor. El área sombreada indica la zona en que se producen efectos tóxicos.*

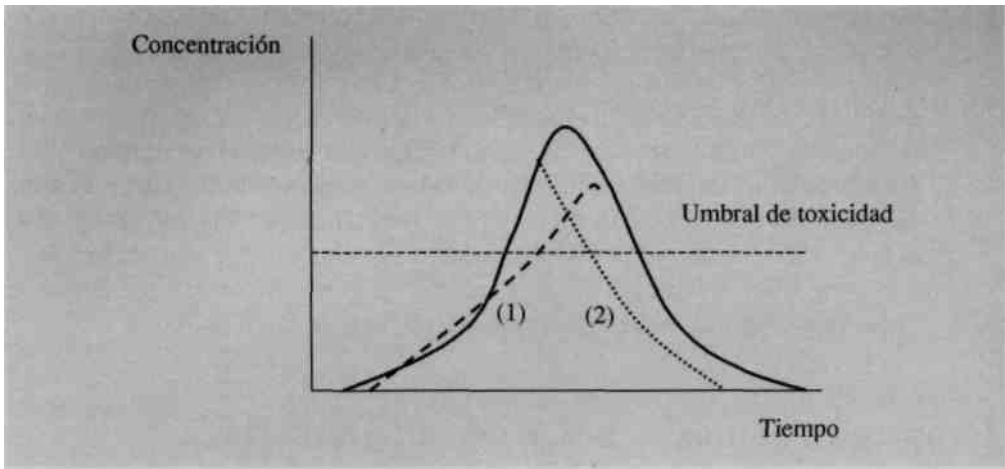


Figura 14.2. *Reducción de la zona de daño tóxico por modificación de la velocidad de llegada del xenobiótico al receptor (1) o de eliminación del mismo (2).*

Los fundamentos teóricos sobre los que se basa cualquier sistema de terapéutica antitóxica se orientan hacia la reducción de esta área que marca la zona de efecto tóxico. Dentro de esta línea de actuación existen tres posibilidades que permiten reducir esta área tóxica (Figs. 14.2 y 14.3):

1. Reduciendo la velocidad de llegada del tóxico al receptor que, en la práctica, se consigue cuando es posible impedir con algún antídoto la absorción o penetración del tóxico. Como consecuencia de este retraso disminuye la pendiente de la curva ascendente (1), que en la Figura 14.2 representa el incremento de concentración del tóxico en el receptor, por lo que la zona tóxica resulta menor.

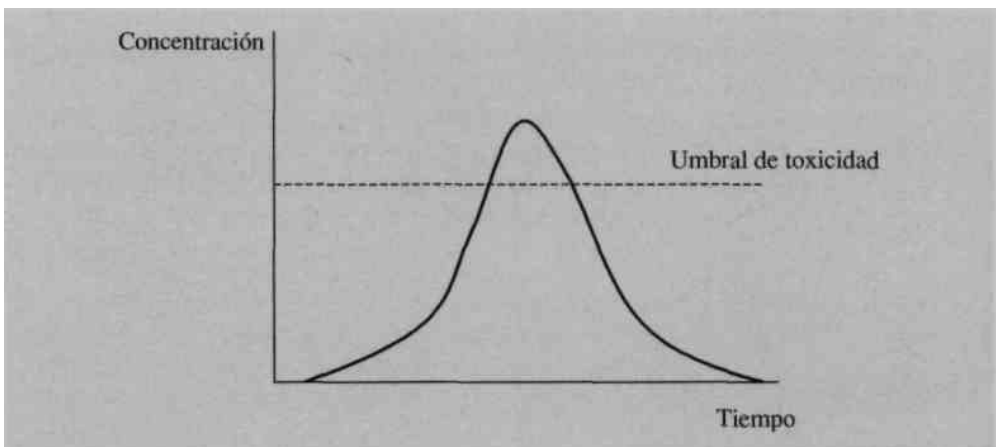


Figura 14.3. *Reducción de la zona de daño tóxico por incremento del umbral de toxicidad.*

2. Aumentando la degradación, el bloqueo o la velocidad de eliminación del tóxico. De este modo, se incrementa la pendiente de la curva de descenso (2), como se indica en la Figura 14.2, por lo que la zona tóxica también queda disminuida. Fundamentalmente, esta acción se puede conseguir por medio de aquellos antídotos capaces de actuar dentro del torrente circulatorio.
3. Elevando el umbral de toxicidad, de tal modo que una misma concentración de producto tóxico origina un efecto menor (Figura 14.3). Esta acción se consigue mediante el empleo de sustancias que son antagonistas a la actividad del tóxico porque, al elevar el nivel correspondiente a la *concentración umbral*, permite reducir el área de la zona tóxica.

Terapéutica antitóxica basada en interferencias con la absorción del tóxico

Corresponde al primer caso contemplado para la aplicación de una terapéutica antitóxica. Debe ser llevada a cabo de modos muy diferentes, según que el tóxico haya sido inhalado o ingerido.

Cuando el tóxico ha sido inhalado se puede hacer reversible su absorción cuando al paciente intoxicado se sitúa de modo inmediato en un ambiente de aire limpio, exento de sustancia tóxica.

En el caso de tóxicos que han sido ingeridos, las medidas antitóxicas deben ser tomadas cuando la propia estructura tóxica todavía se encuentra en el tracto gastrointestinal.

Bajo estas circunstancias, existen diversas posibilidades de actuación:

- Uso de sustancias que posean una gran capacidad de adsorción para fijar en su superficie la estructura tóxica. Se corresponden con antídotos que actúan mediante mecanismos físicos.
- Empleo de agentes que diluyan al tóxico, o bien formen con él compuestos poco solubles, o incluso le oxiden. En general, se trata de antídotos que actúan mediante mecanismos de tipo químico.
- Tratar de facilitar la evacuación del tóxico no absorbido, unas veces a través de las vías digestivas superiores y otras por la vía rectal. En el primer caso, se puede optar entre un lavado estomacal con sonda, ayudado por agentes adsorbentes, o por la acción de un agente emético o vomitivo; en el segundo caso, se puede acudir al uso de laxantes o a la aplicación de enemas o lavativas.

Adsorbentes

Cuando se sabe que el tóxico se encuentra en el estómago, se suele proceder a un vaciado del contenido estomacal mediante un *lavado gástrico* realizado a

través de una sonda. En estos casos, los efectos del lavado se pueden favorecer con la adición de sustancias adsorbentes sobre todo el carbón activado, una de las sustancias más empleadas y eficaces que se administra bajo la forma de suspensión acuosa. Desde luego, El lavado gástrico no está indicado en aquellas intoxicaciones provocadas por sustancias altamente corrosivas, porque existe el posible riesgo de provocar una perforación estomacal.

En ocasiones, el carbón activo se suele acompañar de óxido de magnesio (MgO) en la proporción 2:1, con el fin de neutralizar el contenido ácido del estómago y acentuar la eficacia del carbón activado. Un hecho a tener en cuenta es la influencia ejercida por el pH del medio en el proceso de absorción gastrointestinal del tóxico, al determinar su grado de ionización; en la magnitud de la retención del tóxico por el carbón activado, al acentuar la capacidad de adsorción superficial frente a las formas no ionizadas.

Cuando no es posible disponer de carbón activado», se puede aplicar como sucedáneo líquidos ricos en proteínas; como es el caso de la leche o de la clara de huevo, que pueden ejercer una doble acción: la de adsorbentes y la de neutralizantes.

Hace años se usaba un producto denominado *antídoto universal*, aunque su nomenclatura era claramente errónea, porque no se conoce ningún producto que presente dicha propiedad. Se trataba de una mezcla de óxido de magnesio, ácido tánico y carbón activado, en las proporciones respectivas de 1:1:2. Se solía aplicar para neutralizar la acción de los tóxicos a nivel estomacal: el MgO neutraliza los ácidos estomacales sin formación de gas, el ácido tánico forma sales insolubles con los alcaloides y algunos metales, el carbón activado adsorbe de modo potente muchas sustancias, tanto orgánicas como inorgánicas. Sin embargo, ha sido demostrado que la presencia de ácido tánico reduce la capacidad de adsorción del carbón activado sobre los xenobióticos, porque el mismo ácido ocupa los puntos superficiales activos. Además, en algunos casos el ácido tánico ha demostrado provocar lesiones hepáticas, por lo que no resulta recomendable su empleo.

En algunas ocasiones, puede tener cierto interés emplear agentes quelantes con el fin de evitar en gran parte la absorción de los tóxicos metálicos, aunque su eficacia no está muy clara. No obstante, es de uso frecuente para el caso de niños que han ingerido medicamentos que llevan hierro.

Un caso especial lo constituye el empleo de soluciones muy diluidas de permanganato potásico (KMnO₄) cuando hay que tratar intoxicaciones provocadas por una elevada cantidad de nicotina procedente del tabaco fumado en abundancia, para oxidarla y destruirla en el mismo estómago.

Eméticos

Existen casos en los que para vaciar el contenido estomacal está recomendado acudir a la provocación del vómito. Sin embargo, como criterio general, no es aconsejable el empleo de sustancias que ejerzan una acción emética, por sus

posibles efectos secundarios como depresores cardíacos. No obstante, no faltan los casos en los que se acude a ellas, aunque esta terapéutica sólo debe ser aplicada una vez que haya sido desechada la realización de un lavado gástrico, puesto que el vómito representa, en sí mismo, un efecto tóxico originado por la propia sustancia emética. Por tanto, podría significar un daño al paciente. Por otra parte, nunca se debe acudir a la administración de una sustancia emética después de una ingestión de carbón activado, porque sería fijado en la superficie activa del mismo y anulado sus efectos.

Entre los agentes eméticos más utilizados figura el jarabe de ipecacuana, que no provoca el vómito de inmediato, sino solamente entre los quince y treinta minutos después de su administración. Por consiguiente, ha sido posible que durante ese tiempo previo haya sido absorbida una cierta proporción de la sustancia tóxica. Por eso, lo más recomendable es la inyección hipodérmica de apomorfina (0,01 g/ml), que actúa con gran rapidez.

No deben ser tratados con eméticos los casos de intoxicaciones con sustancias muy corrosivas, por el riesgo de extender su acción local por toda la zona bucofaringea; ni tampoco con aquellos pacientes que se encuentren bajo un estado de semunconciencia, porque el riesgo de aspirar el emético por vía pulmonar es tan peligroso como la propia sustancia localizada en el estómago.

En consecuencia, la aplicación de agentes eméticos representa un tratamiento antitóxico de dudosa validez.

Laxantes

Cuando no resulta aconsejable la aplicación de los agentes eméticos por ineficacia o toxicidad, se recurre al empleo de sustancias de acción laxante para eliminar el tóxico por la vía anal. Suele ser una terapéutica muy recomendable para los tóxicos liposolubles, tales como fósforo, DDT, cantaridina, etc. En estos casos nunca deben ser utilizados el aceite de ricino, aunque sí de modo particular los purgantes de tipo salino, porque suelen ser agentes bastante eficaces para retrasar la absorción del tóxico. Sin embargo, no se debe hacer uso de este tipo de laxantes cuando se trata de problemas tóxicos vinculados a una sulfamida terapia, porque con ello se favorece la formación de sulfohemoglobina.

A diferencia de las sustancias eméticas, que limitan sus efectos al contenido gástrico, los laxantes salinos actúan sobre todo el tracto gastrointestinal, con un efecto adicional de dilución del tóxico, como una consecuencia del efecto osmótico suscitado que implica una abundante secreción de agua al lumen intestinal, donde permanece. Se suelen usar los sulfates sódico o magnésicos por carecer de efectos nocivos secundarios.

Los laxantes resultan poco eficaces cuando se administran bastante tiempo después de la ingestión del tóxico, porque en esas condiciones gran parte del tóxico ha podido quedar fuera de sus acciones en el caso de haber superado la barrera de la mucosa intestinal.

Antídotos de acción química

Se trata de compuestos orientados hacia la destrucción del tóxico y que pueden actuar a través de los más diversos tipos de mecanismos químicos:

- Por formación de compuestos poco solubles. Puede tratarse de compuestos de reacción química generalizada, como ocurre con el agua albuminosa (clara de huevo batido en agua destilada); o sustancias que ejercen una acción específica: sacarato calcico para destruir el ácido oxálico, fenol o hidróxido férrico para los compuestos arsenicales, etc.
- Por oxidación, como el empleo de permanganato potásico al uno por mil contra la morfina o el fósforo.
- Por combinación con el tóxico y precipitación del compuesto resultante, como ocurre con el empleo de rongalita, sustancia capaz de formar precipitado con los compuestos de mercurio o de bismuto.
- Por combinación con el tóxico, pero sin formar precipitado. Tales efectos se pueden conseguir mediante el uso de las más variadas sustancias: antiácidos, como leche y agua jabonosa; antialcalinos, como agua boricada, zumo de limón y vinagre diluido; bicarbonato amónico, para antídoto del formol; el tiosulfato sódico, para convertir en sulfocianuros las moléculas tóxicas de cianuros; el dimercapto-propanol (conocido con las siglas B.A.L. de British Anti Lewisite), que forma quelatos con el arsénico o con el mercurio.

Terapéutica antitóxica basada en el incremento de la velocidad de eliminación del tóxico

Una vez que el tóxico ha sido absorbido, se distribuye por los diversos tejidos de acuerdo con un cierto grado de equilibrio entre las diversas formas libres y combinadas. Se ha calculado que un tóxico en sangre puede alcanzar cualquier punto biológico dentro del organismo en veintitrés segundos.

Se sabe que el daño aparece cuando, a nivel de receptor, el tóxico alcanza la concentración mínima considerada como su concentración tóxica. Por consiguiente, la terapéutica antitóxica en esta fase del fenómeno tóxico debe ser encaminada de tal manera que favorezca del modo más rápido la eliminación de la estructura tóxica, objetivo que puede ser obtenido con la ayuda de los denominados antídotos de acción sistémica.

Estos planteamientos pueden tener una doble finalidad:

- Evitar que el contacto del tóxico con su receptor pueda tener lugar a niveles peligrosos, mediante dos tipos de acciones:
 - a) Un incremento en la velocidad de eliminación de la estructura tóxica.
 - b) Una destrucción de la estructura tóxica, o un bloqueo de la misma, de tal modo que se impida toda posibilidad de reacción con el receptor.

- Conseguir un desplazamiento de la estructura tóxica, una vez asociada con la correspondiente molécula del sistema biológico diana.

Incremento de la eliminación de la estructura tóxica

Aparte de los pulmones para las sustancias volátiles, la principal ruta de excreción de un tóxico situado dentro del organismo suele ser a través de la orina por la vía renal. Por consiguiente, para acelerar la eliminación de una estructura tóxica situada en sangre se puede acudir a diversas posibilidades, aunque de acuerdo con dos metodologías diferentes:

1. Una diuresis forzada, que favorece la cantidad de sustancia excretada por la orina.
2. Realizar una diálisis, que puede ser peritoneal o hemodiálisis.

Para aumentar la cantidad de un compuesto que pueda ser excretado por la orina se puede aplicar una *diuresis forzada*. Para ello se ajusta el pH urinario, siempre en el sentido de favorecer la ionización del compuesto. Puesto que las formas no ionizadas se reabsorben con facilidad en los túbulos renales, al ser más liposolubles, cuando se conoce el pKa de un compuesto se puede predecir el efecto de las modificaciones en el pH urinario sobre su eliminación por la vía renal. De este modo, una alcalinización del pH de la orina mediante administración de bicarbonato sódico (NaCO_3H) repercutirá en un incremento muy considerable de la excreción urinaria de los ácidos orgánicos. Por el contrario, una acidificación del pH urinario por la administración de cloruro amónico (NH_4Cl) favorecerá la ionización de las bases orgánicas débiles, que serán excretadas con una mayor facilidad. Para provocar una diuresis forzada se suele emplear de modo preferente diuréticos de acción osmótica, como manitol, urea, xantinas, tioazidas, etc. La eficacia de esta terapéutica antitóxica ha quedado bien confirmada para las intoxicaciones relacionadas con salicilatos y barbitúricos.

Además de la diuresis, muchos tóxicos también pueden ser separados de la sangre mediante aplicación de un sistema *dializante* mecánico-químico, que sustituye la función renal, o bien la suplementa. El proceso se basa en una ultrafiltración, o difusión pasiva del tóxico a través de membranas dializadoras, desde el plasma sanguíneo hacia un fluido dializante, cuya composición global debe ser muy parecida a la del plasma. Cuanto más baja sea la concentración del tóxico en el fluido tanto más eficaz será el resultado de la diálisis, debido al gradiente de concentración que se forma entre éste y el plasma. Por ello, se puede aumentar la magnitud de la diálisis si se adiciona al fluido algún compuesto adsorbente (carbón activado o albúmina de huevo), que reduzca la concentración del tóxico libre.

Normalmente, la diálisis sólo se aplica en la desintoxicación de casos graves y está especialmente aconsejada para aquellas intoxicaciones agudas provocadas

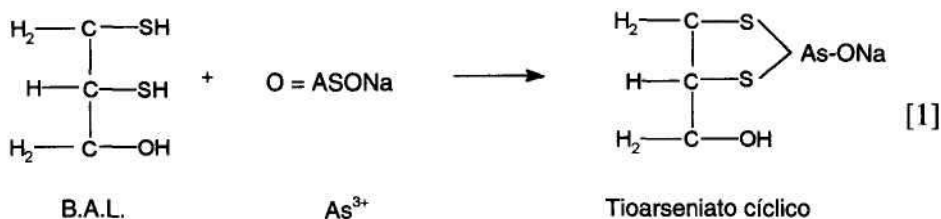
por los barbitúricos. Dentro de todas las metodologías posibles, las desintoxicaciones más enérgicas suelen ser conseguidas con los procesos de *diálisis peritoneal* y de *hemodiálisis*.

Destrucción de la estructura tóxica

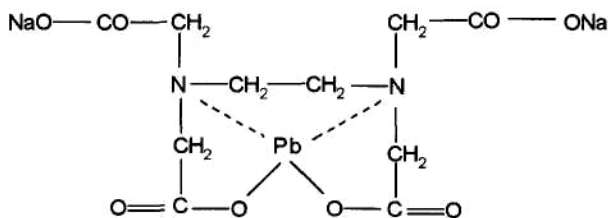
La terapia antitóxica más eficaz que se conoce no consiste en una eliminación del tóxico, sino en una inactivación química de su estructura, bien por destrucción, bien por bloqueo de la misma. En cualquiera de estos casos, no importa ya la rapidez con la que pueda ser eliminada del organismo, puesto que la acción química le impide conectar con su receptor a las concentraciones requeridas para provocar el daño tóxico.

Lo más frecuente es hacer uso de antídotos capaces de formar complejos con el tóxico y, de este modo reducir o anular su actividad tóxica. En este sentido, un procedimiento muy empleado se basa en utilizar agentes quelantes, cuyos quelatos con el tóxico resultan muy hidrosolubles y se eliminan por la orina con toda facilidad. Suelen ser muy eficaces aquellos agentes quelantes que en su estructura molecular poseen grupos ionizados, con preferencia carboxilos, que deben conservar después de formar el quelato con el fin de mantener su hidrosolubilidad y no puedan ser reabsorbidos en los túbulos renales. Para el tratamiento de intoxicaciones con metales pesados se suelen emplear dos: el ya citado B.A.L. (di-mercapto-propanol) y el EDTA (ácido etilen-diamino-tetracético). En cambio, para el caso de fosfatos orgánicos es mejor emplear las oximas.

Los metales pesados que tienen una mayor incidencia en la clínica toxicológica suelen ser mercurio, plomo y arsénico que, de modo primario, deben su toxicidad a su capacidad de reaccionar con aquellas enzimas que portan grupos SH, muy vinculados a la producción de energía celular, a los que inhiben en su actividad enzimática. Aunque el agente quelante más empleado sea el B.A.L. (1), sin embargo no es el más aconsejable porque los quelatos formados poseen una hidrosolubilidad muy escasa, aunque los de As y Hg son muy estables y poco tóxicos. En el caso del Hg se añade un segundo inconveniente muy importante: la liposolubilidad del quelato permite atravesar con cierta facilidad la barrera encefálica y puede incrementar los niveles de mercurio en el sistema nervioso central.



Para los casos de intoxicaciones con plomo se recomienda el tratamiento con el quelato EDTA- Ca^{2+} (2), que actúa de sustancia intercambiadora de los cationes Ca^{2+} por los de Pb^{2+} , por lo que el agente tóxico queda secuestrado molecularmente y no puede ejercer su toxicidad.



[2]

Ya ha sido indicado cómo la administración de EDTA suele favorecer la eliminación de diversos metales por la orina en forma de quelatos hidrosolubles no tóxicos.

Algunas estructuras tóxicas tienen la particularidad de una circulación gastroentérica, como consecuencia de ser excretadas de nuevo al tubo digestivo, después de haber sido absorbidas y alcanzado el hígado por la circulación portal, con posibilidad de una reabsorción. Para romper con este estado de intoxicación favorecido por el circuito cerrado que se ha formado, hay que conseguir la destrucción de la estructura tóxica cuando está localizada en el tracto gastrointestinal. Tal es el caso de la morfina, una base débil, que se segrega a nivel estomacal y vuelve a cerrar el circuito cuando se absorbe de nuevo en intestino. La situación se resuelve llevando a cabo periódicos lavados estomacales con soluciones muy diluidas de ácido clorhídrico.

Desplazamiento de la estructura tóxica

En algunas ocasiones se emplean compuestos químicos que son capaces de desplazar al tóxico de la estructura en la que se encuentra y facilitar así su eliminación. Ejemplos de estos agentes se tienen en el uso de oxígeno para desplazar gases tóxicos que circulan por la sangre; los aniones cloruros, capaces de desplazar a los bromuros; los cationes calcícos, que desplazan a los de estroncio, etc. En general, todo incremento en la excreción del tóxico favorece la ruptura de su asociación con el receptor, siempre que responda a un enlace de tipo reversible.

Terapéutica antitóxica basada en una elevación del umbral de toxicidad

Se trata de aumentar el umbral de toxicidad de una sustancia sin tener que modificar su concentración a nivel de receptor. De este modo, una misma canti-

dad de tóxico provocaría un daño menor al necesitar un mayor nivel para ejercer su toxicidad. En la práctica, este efecto antitóxico solo se puede conseguir mediante el empleo de *antagonistas*.

Las sustancias antagonicas que podamos aplicar pueden operar de tres modos diferentes:

1. Actuando de modo directo sobre el sistema antagonista, para enaltecer el sistema fisiológicamente opuesto.
2. Bloqueando la respuesta del receptor al actuar sobre el mismo mecanismo fisiológico que el tóxico.
3. Compitiendo con el metabolismo del xenobiótico, evitando que se formen metabolitos tóxicos.

Por lo general, el empleo de sustancias que afectan a los mecanismos fisiológicos antagonicos solo tienen un interés de tipo teórico y muy poca utilidad práctica, debido a que se hace muy difícil valorar unos efectos cuando a la vez se producen otros sobre los sistemas opuestos.

Así por ejemplo, en las intoxicaciones por ingestión de barbitúricos también se produce, o se induce, una depresión respiratoria severa, que se puede contrarrestar mediante la administración de picrotoxina o tetrazolpentileno. Sin embargo, bajo vigilancia clínica resulta mucho más eficaz el control mecánico de la respiración. También se produce una caída de la presión arterial, que se contrarresta de modo fácil con la administración de norepinefrina por vía endovenosa. Se puede apreciar que, aunque el tóxico siga ejerciendo su actividad nociva, sin embargo se ve contrarrestado en sus efectos por una actividad fisiológica del mecanismo antagonico.

En otras ocasiones, el antagonista bloquea la respuesta del tóxico porque actúa sobre el mismo mecanismo o sistema. Como ejemplo de ello puede ser citado el uso de la n-alil-morfina para contrarrestar los efectos sobre los centros respiratorios de la propia morfina. Este compuesto reacciona con sus receptores, los centros respiratorios cerebrales, y provoca una depresión respiratoria. Sin embargo, resulta desplazada de tales receptores por la mayor afinidad de la n-alil-morfina, cuya interacción con el receptor presenta un efecto secundario menor sobre la depresión respiratoria.

Otro ejemplo, dentro de este tipo de terapéutica antitóxica, se tiene en el empleo de la vitamina K como antagonista de los efectos anticoagulantes del dicumarol. En este caso, el receptor es un sistema enzimático hepático no identificado, cuyo sustrato normal es la propia vitamina K. La enzima y la vitamina K forman un complejo sustrato-enzima esencial para la síntesis de ciertas proteínas necesarias para la coagulación normal de la sangre, como puede ser la protrombina. El dicumarol reacciona con este sistema enzimático e impide la formación de tales proteínas dando lugar a hemorragias. Una cantidad suficiente de vitamina K sirve de antagonista a los efectos tóxicos del dicumarol.

Por último, cabe citar aquellos casos en los que resulta recomendable actuar mediante una competencia con las vías de biotransformación del xenobiótico,

porque con ello se impide que se produzca un fenómeno de bioactivación, que daría lugar a metabolitos más tóxicos que el propio xenobiótico. Entre sus ejemplos se pueden citar el uso de etanol para evitar la conversión del metanol en ácido fórmico y el empleo de acetato contra la bioactivación de los fluoracetatos.

La terapéutica antitóxica y el diagnóstico de intoxicaciones

Para aplicar la terapéutica tóxica adecuada resulta esencial que se diagnostique de modo correcto el tipo de intoxicación. Sin embargo, uno de los problemas que se pueden plantear en el ámbito de la clínica toxicológica es el diagnóstico de las intoxicaciones a partir de los síntomas observados, de tal modo que se pueda deducir la naturaleza del tóxico responsable y los mecanismos que ha seguido para provocar tales síntomas.

Algunos tóxicos se caracterizan por provocar siempre en todos los individuos afectados unos síntomas característicos, como suele ocurrir con la atropina o la estricnina; en estos casos, la identificación de tipo fisiológico resulta fácil. Sin embargo, existen tóxicos que no permiten esta facilidad, porque pueden dar lugar a las más diversas sintomatologías; es la pauta seguida por los derivados arsenicales.

Esto no quiere decir que los xenobióticos no sean específicos en sus actividades tóxicas, sino que además de sus acciones primarias pueden aparecer otras de tipo secundario, variables según las personas. En su rápida distribución por todo el organismo pueden ejercer efectos sobre los distintos tejidos corporales con los resultados más diversos; no obstante, suelen ser los exámenes de muestras de sangre y de orina los medios más utilizados para poner de manifiesto tales efectos.

Tejido sanguíneo

Dentro de este tejido, hay que distinguir diversos tipos de efectos que pueden tener lugar sobre tres elementos sanguíneos diferentes: los parámetros plasmáticos, los hematíes y los pigmentos.

En este sentido, puede observarse cómo la influencia de los anestésicos éter y cloroformo pone de manifiesto descensos tanto en el pH del plasma como en la reserva alcalina, pero en cambio origina un aumento del potasio en el plasma.

Así mismo, puede haber modificaciones en los sistemas de la coagulación sanguínea en función del tipo de xenobiótico; en las intoxicaciones con gases agresivos, como cloro o fosgeno, hay un incremento de la cantidad de hematíes; mientras que, se reduce cuando la intoxicación es provocada por plomo, fósforo, benceno y derivados aromáticos aminados o nitrados.

Algunos de ellos dan lugar a ciertas anomalías morfológicas en los hematíes: el plomo provoca granulaciones basófilas en estas células hematológicas; los

derivados aromáticos nitrados, caracterizados por su acción metahemoglobinizante, dan lugar a los llamados corpúsculos de Heinz; las acciones de saponinas o de arsenamina conduce a una hemólisis; etc.

Además, los xenobióticos que actúan sobre la hemoglobina se diferencian por seguir dos tipos de comportamientos:

- Los que se combinan con el pigmento, sin desnaturalizarlo.
- Los que oxidan el átomo de hierro, dando lugar a la formación de metahemoglobina.

También cabe señalar cómo, en algunos casos, puede variar el número total de leucocitos bajo la influencia de algunos xenobióticos: benceno, sulfamidas, mostazas nitrogenadas, piramidón, etc., suelen provocar una reducción o leucopenia. En cambio, la primera fase de la actividad del benceno se desarrolla con la aparición de una leucemia pasajera.

Tracto digestivo

En relación con el mismo, pueden aparecer vómitos y diarreas, que han de ser considerados como mecanismos defensivos que el organismo opone frente a los estímulos de las sustancias tóxicas. También, el plomo da lugar a dispepsia y el mercurio a estomatitis.

Tejido hepático

Pocos son los xenobióticos que no lesionan el hígado:

- Fósforo, arsénico y las toxinas de la *Amanita phalloides*, provocan una degeneración grasa.
- Los alcoholismos pueden cursar con cirrosis.
- La arsenamina provoca ictericias.
- Los colorantes de estructuras azoicas suelen dar lugar al desarrollo de tumores hepáticos cancerosos.

Corazón

Respecto de las actividades tóxicas sobre este órgano, los xenobióticos se pueden reunir en dos grandes grupos:

- Los que provocan la paralización del corazón en sístole, como algunos componentes de la digital, la escila, etc.
- Los que lo paralizan en diástole, como la nicotina o la muscarina.

Tejido renal

Muchos tóxicos inciden sobre la función de los filtros renales:

- Plomo, cadmio y uranio provocan con frecuencia uremia y albuminuria.
- Ácido oxálico y las cantáridas ejercen una acción traumatizante que se traduce en hematuria.
- El tetracloruro de carbono genera nefritis, al igual que de un modo indirecto ocurre con los compuestos hemolisantes (arsenamina) o metahemoglobinizantes (derivados nitrados y aminas aromáticas).

El análisis químico-toxicológico

- Consideraciones generales
- Características esenciales del procedimiento analítico
- Objetivos del análisis químico-toxicológico
- Significación de los resultados
- Las pruebas analíticas y la prevención del riesgo tóxico

Consideraciones generales

En Toxicología, el grado de nocividad o de seguridad de una sustancia química viene determinado por la dosis, es decir, por la cantidad de dicha sustancia que interrelaciona con su receptor específico. En consecuencia, el conocimiento preciso acerca del desarrollo de una intoxicación, así como de su importancia clínica, ha de estar fundamentado en la valoración de unos parámetros analíticos que permiten arrojar luz sobre su acción dentro del organismo. Por ello, adquiere especial relevancia en los estudios sobre las intoxicaciones los datos conseguidos mediante el análisis químico de esa sustancia, tanto en los medios biológicos que integran el organismo, como en los medios que contactan con él: ambiente, alimentos, bebidas, etc.

En este sentido, puede afirmarse que el principal objetivo de los métodos químico-analíticos, aplicados al ámbito toxicológico, es aportar los datos necesarios para poder alcanzar una información adecuada sobre la sintomatología tóxica y poder dictaminar acerca de su correspondiente diagnóstico clínico.

En la práctica, la base de todo diagnóstico toxicológico viene a ser doble:

- La observación de los síntomas puestos de manifiesto en cada caso de intoxicación.
- Las evaluaciones de unas funciones fisiológicas, conseguidas a través de experimentación con animales, ensayos inmunológicos y análisis químicos.

Muchas veces, el comportamiento de estas funciones suelen ser estimadas mediante la determinación de parámetros bioquímicos y químicos, de acuerdo con unas metodologías químico-analíticas aplicadas sobre los medios biológicos.

La necesidad actual de cuantificar en los medios biológicos cantidades vestigiales de xenobióticos, o de algunos de sus metabolitos, ha exigido que para el análisis toxicológico se acuda a los métodos instrumentales más perfectos y sofisticados, con los que se efectúan extracción y purificación de sustancias, identificación de estructuras, cuantificación de compuestos, valoraciones cinéticas, etc. Con ellos, se ha conseguido en los diferentes medios biológicos disponibles la identificación de muchas estructuras químicas involucradas en los procesos de intoxicación, tanto en su forma química primaria, como después de haber sufrido una biotransformación y convertirse en metabolitos.

En resumen, las necesidades analíticas planteadas en los numerosos y diferentes ámbitos de la Toxicología ha dado lugar a que se investiguen y pongan a punto nuevos métodos analíticos, o al menos se modifiquen los tradicionales, para mejorar los objetivos que se puedan alcanzar con ellos.

Características esenciales del procedimiento analítico

Sean cuales sean los tipos de métodos a emplear, siempre el procedimiento analítico se ha de desarrollar en cinco etapas esenciales:

- a) Toma y preparación de la muestra.
- b) Elección de la técnica analítica.
- c) Medidas para eliminar las posibles interferencias.
- d) Separación y purificación del analito problema.
- e) Identificación y valoración del analito.

La propia elección de la muestra para el análisis toxicológico está condicionada por varios factores, entre los que destacan las peculiaridades del método a emplear y su representatividad. No obstante, cuando se trata de muestras para un análisis toxicológico con interés judicial, será preciso ajustarse a las normas establecidas por la legislación oficial correspondiente.

Como en muchas ocasiones existe la necesidad de tener que valorar cantidades extraordinariamente pequeñas de sustancias, no sólo hay que combinar, o acoplar, varias de esas técnicas instrumentales sino también aumentar la sensibilidad de las mismas con el fin de incrementar el límite de detección.

En el ámbito del análisis químico se define como *límite de detección* a la cantidad más pequeña de un analito, expresada en unidades de concentración, que una técnica es capaz de valorar con una probabilidad del 95-99 %, y que a nivel estadístico puede ser distinguida de un blanco apropiado.

Siempre es muy recomendable aplicar aquellos métodos que tengan la consideración de *normalizados*, porque cumplan de modo adecuado con los numero-

Los factores de calidad que garantizan la Habilidad de sus resultados: especificidad, exactitud, límite de detección, precisión, repetitibilidad, reproducibilidad, seguridad y sensibilidad.

Cuando la cuantía del número de muestras a realizar lo precisa y las disponibilidades económicas lo permiten, es posible plantear una automatización del conjunto de análisis a efectuar. Precisamente, esta posibilidad práctica ha significado uno de los logros más relevantes dentro del análisis toxicológico conseguido en los últimos años.

Por otra parte, la dinámica propia de muchas intoxicaciones que aparecen en el ámbito clínico son, por lo general, de tipo agudo y exige actuar con una gran rapidez, tanto para efectuar un diagnóstico como para decidir acerca de la terapia antitóxica más adecuada que deba ser aplicada. Tales actuaciones de tipo práctico se han de fundamentar, en la mayoría de los casos, en los resultados de pruebas analíticas. Por tanto, resulta bastante imprescindible disponer de métodos analíticos caracterizados por dos propiedades importantes:

- La sencillez en el manejo de las muestras.
- La rapidez en aportar unas respuestas.

Objetivos del análisis químico-toxicológico

Desde un principio, el análisis químico-toxicológico tuvo una doble finalidad: *a)* la identificación del xenobiótico sospechoso de ocasionar el daño tóxico; *b)* la cuantificación del mismo.

Sin embargo, en los tiempos actuales, estos dos objetivos han sido ampliados de modo importante, al tener que resolver nuevas problemáticas:

- Detección y cuantificación de aquellos xenobióticos que se encuentran a niveles de vestigios o trazas.
- Caracterización de las formas químicas bajo las que se encuentra la estructura del xenobiótico.
- Reconocer aquellos metabolitos producidos en su biotransformación.
- Esclarecer la presencia de tóxicos ignorados.
- Etc.

Desde luego, el análisis de sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas puede verse dificultado por factores muy diversos, entre los que cabe destacar dos:

- La complejidad de la muestra, que requiere un tratamiento largo y complicado para la extracción y purificación de la sustancia, con riesgo de originar destrucción de los anabolitos. Por ello, resulta muy importante el poder desarrollar unos métodos analíticos que sean capaces de mejorar los límites de detección y de permitir simplificar los tratamientos de la

muestra, de tal manera que se eviten las pérdidas de anabolitos sin menoscabo de la rapidez.

- La presencia de sustancias, capaces de interferir con la reacción analítica, fundamento del método de identificación o valoración. En la muestra pueden existir otros compuestos que susciten la misma respuesta analítica que la estructura del tóxico o, al menos, la enmascaren.

Para soslayar en la medida de lo posible este inconveniente, se ha de buscar aquella sistemática que permita la destrucción, o el enmascaramiento, de las especies químicas responsables de las interferencias. A pesar de todo, siempre habrá que tener en cuenta la dificultad que existe para eliminar compuestos que sean isómeros del tóxico, o bien tengan estructuras muy similares, sin que también se afecte a la integridad del mismo.

Aparte de valorar el contenido total de una sustancia en una muestra, en Toxicología puede ser de extraordinaria significación conocer las distintas formas químicas bajo las que se encuentra, porque la incidencia de cada una de ellas en los procesos de absorción, distribución y excreción del tóxico en el organismo, determina la posibilidad de ejercer su actividad tóxica en el punto donde se encuentra su receptor.

La actividad nociva de un xenobiótico que ha penetrado en un organismo vivo suele ser una función de los procesos implicados en la cinética del fenómeno tóxico. Es decir, el conocimiento adecuado de su toxicocinética permite interpretar, de modo adecuado, el significado de los niveles a los que se encuentran las diferentes formas químicas derivadas de un xenobiótico. Con ello se pone de manifiesto la relevancia de llevar a cabo las determinaciones de aquellos metabolitos del xenobiótico que toman parte en el proceso, o incluso pueden ser los principales responsables del mismo. Por tanto, el objetivo primordial de cualquier tipo de planteamiento analítico ha de ser no sólo la investigación de la estructura primaria del tóxico, sino también el reconocimiento y valoración de los posibles derivados metabólicos.

Cuando se ignora la naturaleza del xenobiótico que parece ser el responsable de los síntomas propios de una intoxicación, el objetivo primordial del análisis químico-toxicológico se centra en el esclarecimiento de su identidad, antes que en el de su cuantificación. En estos casos, las decisiones a tomar desde un punto de vista analítico van a depender de las informaciones disponibles en torno a la intoxicación problema, y en función de las mismas, se aplicarán algunas de las marchas analíticas establecidas para estos efectos.

Cuando no existen datos que permitan una cierta restricción en la búsqueda del producto responsable, el análisis se habrá de plantear siguiendo sistemáticas analíticas de tipo general, que siempre implican varias etapas: extracción, purificación, identificación y, en su caso, evaluación.

Las dos primeras etapas suelen exigir caminos diferentes según se trate de compuestos volátiles o bien considerados como fijos, tanto inorgánicos como orgánicos. En la práctica, estas marchas analíticas de tipo general se dividen en

seis grupos, en función de las sistemáticas aplicadas para la extracción o la separación del tóxico:

1. Tóxicos separables en forma de vapor: puede ser por medio de un tratamiento con calor (hidrocarburos de bajo peso molecular, etc.), una acidificación (As, CN^- , CO, P, S^{2-} , etc.), una alcalinización (aminas, etc.) o una reducción (As^{5+} , P^{5+}).
2. Tóxicos separables mediante una mineralización de la muestra.
3. Tóxicos que pueden ser separados mediante la aplicación de procesos electrolíticos: As, Bi, Hg y Sb.
4. Tóxicos que, por ser elementos, pueden ser determinados de modo directo por espectrometría de absorción atómica o haciendo uso de electrodos específicos.
5. Tóxicos que pueden ser determinados de modo directo por la aplicación de técnicas inmunológicas.
6. Tóxicos extraíbles mediante disolventes orgánicos.

Como en todos los casos se requiere un cierto tiempo para alcanzar el resultado final, la demora más o menos prolongada puede significar un grave inconveniente, puesto que la vida de la persona intoxicada depende, la mayoría de las veces, del conocimiento rápido de la identidad del tóxico, con el fin de adoptar las medidas antitóxicas convenientes.

Para resolver estas situaciones del modo más favorable, han sido investigados protocolos analíticos rápidos y sencillos que, en poco tiempo, permiten confirmar la presencia, o la ausencia, de una determinada estructura tóxica. Esta situación adquiere una mayor urgencia para aquellos casos que pueden estar relacionados con la sospecha de tóxicos de la familia de los psicotropos. Con tal finalidad, han sido diseñados unos tests o sistemas de «screening», muchos de ellos fundamentados en la realización de técnicas enzimáticas de inmunoensayos.

Significación de los resultados

Un último punto de carácter general, a considerar con relación a los análisis químico-toxicológicos que se realizan, se centra precisamente en el valor que debe dársele a la significación de sus resultados y a la interpretación de los mismos.

Existen diversos factores que impiden la atribución de un carácter absoluto, o definitivo, a tales resultados:

- Unas veces, el tóxico no se detecta en la muestra, porque ya había sido eliminado por el organismo cuando ésta fue tomada.
- Otras veces, serán las deficiencias inherentes a la metodología analítica disponible la que puede dar lugar a la destrucción del tóxico.

- En ocasiones, la técnica carece de la suficiente sensibilidad para los escasos niveles a los que el tóxico se encuentra en los medios biológicos, que han servido para la toma de muestra.
- Incluso, hay que contar con las interferencias provocadas por otras sustancias presentes.

Por eso, para una correcta interpretación de los resultados de un análisis toxicológico han sido señalados cuatro aspectos esenciales a los que siempre hay que hacer referencia:

- Aspecto metodológico: comprende todo lo referente a los posibles inconvenientes de las técnicas empleadas, como pueden ser las imprecisiones, las interferencias, etc.
- Aspecto analítico: implica la existencia de una correlación significativa entre los datos numéricos y el fenómeno tóxico estudiado.
- Aspecto fisiológico: determina la existencia de una posible relación entre las alteraciones detectadas y alguna patología concreta.
- Aspecto clínico: permite corroborar un diagnóstico efectuado de modo previo.

Las pruebas analíticas y la prevención del riesgo tóxico

Sin duda, la mejor manera de evitar el riesgo tóxico será prevenirlo y, para ello, lo más eficaz sería impedir que cualquier tipo de sustancia, potencialmente tóxica, penetrara en el organismo. A pesar de todo, no siempre resulta factible minimizar la exposición del organismo a la gran variedad de sustancias en uso con el fin de soslayar sus potenciales efectos tóxicos.

En la sociedad actual, resulta bastante normal que el ser humano desarrolle su actividad profesional en ambientes donde deba tener un contacto permanente con sustancias químicas, capaces de provocar algún tipo de daño cuando dentro del organismo alcanzan ciertos niveles.

Ante la evidencia de los riesgos de intoxicaciones de tipo crónico que hoy día pueden afectar a ciertas partes de la población, la Toxicología actual se ocupa de resolver dos cuestiones importantes:

- De una parte, la salvaguarda de la salud pública.
- De otra, el estudio de las perturbaciones funcionales surgidas en un organismo, con la finalidad de que puedan ser detectadas mucho antes de que alcancen niveles de gravedad.

No cabe duda el gran interés que tiene el poder descubrir cualquier síntoma de intoxicación en los mismos comienzos del fenómeno tóxico. De ahí la importancia que han adquirido aquellas pruebas analíticas que permiten emitir un diagnóstico precoz de esos tipos de intoxicaciones profesionales. De este modo, se podrán prevenir efectos tóxicos antes de que lleguen a ser irreversibles y con-

trastornar a tiempo cualquier tipo de consecuencias fisiológicas, por lo general, perniciosas para la salud.

En este sentido, la investigación plantea la detección de posibles modificaciones y perturbaciones, tanto bioquímicas como celulares, mediante tests analíticos que permitan formular un diagnóstico y tengan utilidad clínica. La normalización de estos tipos de pruebas analíticas contribuirán también a la redacción de Normas Internacionales de Seguridad, que deberán ser recogidas en la legislación sanitaria de todos los países.

En la Figura 15.1 se pueden observar las diversas posibilidades de actuación que un xenobiótico puede exhibir, una vez que ha conseguido penetrar en el organismo vivo. La fracción de sustancia absorbida puede seguir dos vías diferentes, aunque a veces puedan estar relacionadas entre sí:

1. Puede pasar directamente a la sangre y ser distribuida por todos los tejidos, para ser finalmente eliminada intacta a través de la orina o del aire espirado.
2. Puede ser metabolizada, de tal modo que sus metabolitos se concentren en los tejidos, o sean eliminados por orina o por el aire espirado.

No obstante, en ambos casos las estructuras xenobióticas, primarias o secundarias, pueden ocasionar distintos tipos de interferencias metabólicas con perturbaciones funcionales, que son detectables mediante los correspondientes análisis de sangre y de orina.

En el esquema resulta obvio que la detección de un xenobiótico en el medio ambiente sólo permite conocer la fuente de un posible riesgo de intoxicación. Lo ideal para investigar un proceso de intoxicación, implicaría también el conocimiento de los niveles de concentración respectivos en los propios tejidos del organismo vivo, tanto del xenobiótico como de sus metabolitos. Por tanto, para conseguir un conocimiento adecuado de la concatenación de las relaciones causas-efectos, resulta indispensable la valoración del xenobiótico en los medios biológicos de análisis: sangre, orina y aire espirado. Como ejemplo cabe citar la investigación de la metabolización y eliminación del benceno, según el esquema indicado en la Figura 15.2.

No obstante, hay que hacer hincapié en los numerosos factores que obstaculizan la posibilidad de encontrar la causa, específica y concreta, responsable del efecto nocivo; o lo que es lo mismo, la posibilidad de establecer el nexo de causalidad del fenómeno tóxico.

En la práctica, algunos xenobióticos pueden circular a través del organismo sin modificar su estructura química primaria, y pueden ser detectados como tales. Otros en cambio, al ser biotransformados totalmente, solamente pueden ser puestos de manifiesto bajo la forma de sus metabolitos.

Además, siempre pueden ocurrir las incidencias más diversas sobre los sistemas celulares y aparecer perturbaciones metabólicas, que se reflejarán en los componentes esenciales de esas células tisulares, o al menos en sus sistemas enzimáticos.

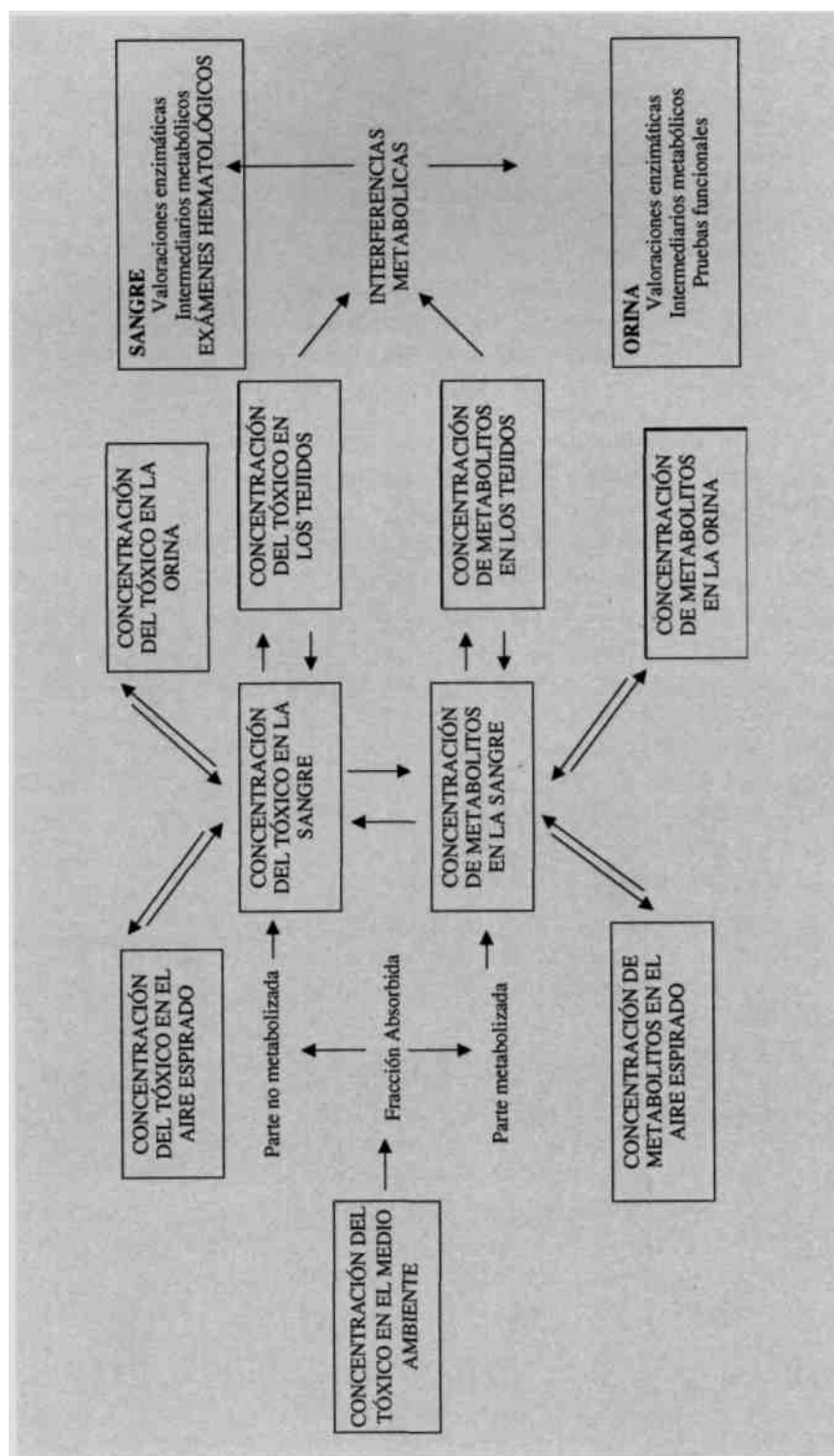


Figura 15.1. Esquema de las posibilidades de actuación de un xenobiótico ambiental, una vez que ha penetrado en el organismo vivo.

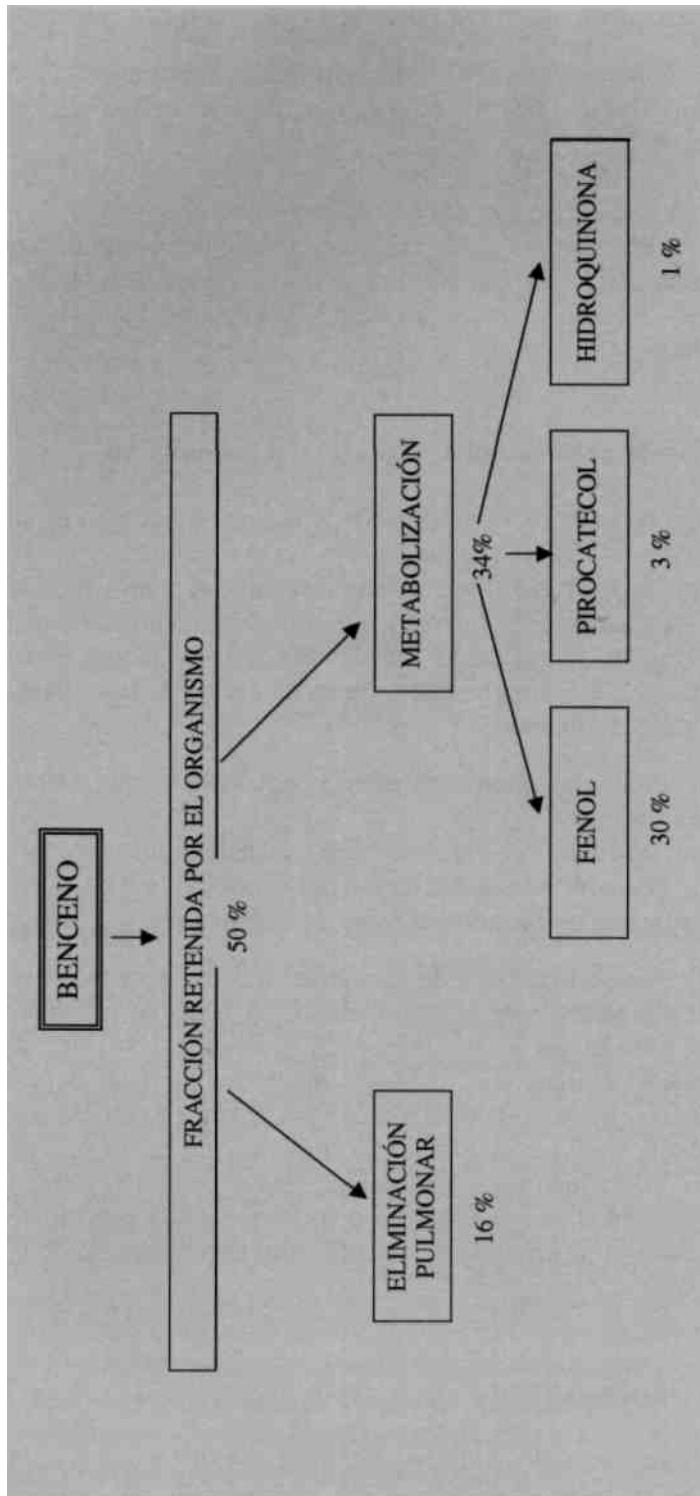


Figura 15.2. Esquema de la metabolización y eliminación del benceno.

De este modo queda abierta la posibilidad de una triple actuación analítica:

1. *Investigación y valoración* de la estructura primaria del xenobiótico en los medios ambientales y biológicos, para poner de manifiesto el posible agente causal.
2. *Investigación de los metabolitos* del xenobiótico en los medios biológicos, que rubrica la acción del organismo sobre el mismo.
3. *Caracterización de las perturbaciones* aparecidas como consecuencia de la actividad tóxica del xenobiótico, o de sus metabolitos, sobre el organismo y que sirven de información acerca de la existencia de ciertas lesiones bioquímicas.

La investigación de la estructura primaria del xenobiótico

La valoración de la estructura primaria de un xenobiótico ha de ser llevada a cabo tanto en el medio externo, capaz de someter al organismo vivo a una exposición tóxica, como en los medios internos, una vez que el xenobiótico ha conseguido penetrar en el organismo. Incluso hay que considerar la posibilidad de que haya sido biotransformado y/o excretado por algunas de las vías más convencionales.

Por consiguiente, los medios que habrán de servir de base para aplicar las técnicas analíticas serán cuatro:

- El medio ambiental externo (alimentos, aguas de bebidas, aire), en cuanto vías de exposición.
- La sangre, en cuanto vía de absorción y distribución del xenobiótico.
- La orina, en cuanto vía de excreción del xenobiótico o de sus metabolitos.
- El aire espirado, en cuando vehículo de eliminación.

No obstante, las evaluaciones de las estructuras primarias de los xenobióticos, en cuanto planteamiento analítico único, ha recibido algunas objeciones prácticas, sobre todo la que hace referencia a la dificultad de relacionar la magnitud de los efectos lesivos con los datos obtenidos para las concentraciones. Siempre queda en entredicho la relación que pueda existir entre la concentración del tóxico existente en el medio ambiente y las encontradas en sangre, en orina o en el aire espirado. Incluso otros factores pueden dificultar la correcta interpretación de los resultados encontrados: la posible retención por los diversos tejidos; las variaciones en la cinética de eliminación; la regularidad de las tomas de muestras; etc.

a) *Análisis del medio externo*

Desde el punto de vista analítico presenta las dificultades propias de las tomas de muestras, en función de tener que trabajar con aire, agua o alimentos.

Además, también cabe considerar el problema de la elección del método analítico más adecuado, de acuerdo con el tipo de muestra y la concentración posible del xenobiótico.

b) *Análisis de la sangre*

La sangre es un medio biológico interno, que desde el punto de vista analítico tiene una situación privilegiada: recoge al xenobiótico cuando penetra en el organismo, lo distribuye por todo el organismo y lo conduce, enmascarado o no, hasta las vías de excreción, sobre todo riñón y pulmones. Intermedio entre el medio externo e interno, puede ejercer a la vez una doble función de ser vehículo y tejido, que le proporciona un carácter excepcional.

Esta circunstancia obliga a que el análisis toxicológico en sangre deba ser considerado bajo un triple aspecto:

- La presencia del xenobiótico absorbido.
- La emigración de este xenobiótico hacia los distintos puntos corporales.
- La posible existencia de una falsa identidad de dicho xenobiótico.

Todo ello debe ser tenido en cuenta cuando se trata de interpretar los resultados analíticos por las consecuencias que cada uno de estos hechos puede tener sobre las concentraciones del xenobiótico en sangre. Como sirve de receptáculo durante la penetración del xenobiótico, de lugar de acogida del mismo o de sus metabolitos después de la absorción, y de vehículo para su excreción, por fuerza la sangre ha de reflejar a todo este conjunto de procesos con cierta fidelidad.

Para disponer de una imagen real de los datos, no hay que perder de vista el equilibrio que la mayoría de las veces se establece entre la distribución tisular y la eliminación del xenobiótico. En tal sentido, la fijación de la concentración límite de un xenobiótico, o de sus combinaciones, tropieza con numerosas dificultades, donde la primera, y no por ello menor, afecta a los tóxicos que también pueden ser componentes normales del organismo. En estos casos, se hace difícil poder establecer los denominados *valores normales*.

Así por ejemplo, numerosos tóxicos minerales pueden ser constituyentes normales de los tejidos y sus niveles en sangre, o en orina, dependen de varios factores: la dieta alimenticia, la incidencia del medio ambiente sobre el organismo, etc. Esta dependencia provoca tales oscilaciones en esos valores, que le despojan del carácter de fijeza característico de las llamadas *constantes biológicas*.

En la práctica, el análisis de las estructuras primarias en la sangre suele quedar bastante limitado al reconocimiento de aquellos pocos compuestos que pueden ser aislados con facilidad: los principales tóxicos minerales, una vez que ha sido destruida la materia orgánica; algunos compuestos orgánicos volátiles, que son adecuados para un análisis directo, después de separar su estructura de la ganga proteica que le acompaña; determinados disolventes orgánicos industriales, como alcoholes, nitrobenceno, benceno y derivados clorados. Incluso, el

empleo de la cromatografía líquida de alta resolución permite la detección de modo directo, y a veces la cuantificación, de algunas estructuras orgánicas.

De todos modos, cualquiera que sea el método analítico aplicado, los resultados obtenidos para las estructuras primarias simplemente, no permiten apreciar la intensidad de la intoxicación, ni tampoco la magnitud de una lesión eventual.

c) *Análisis de orina*

Resulta un medio biológico ideal para la investigación de metabolitos, pero no lo es tanto cuando se desea la valoración de la estructura xenobiótica primaria, excretada de forma intacta. Como bien se sabe, la excreción de una molécula por la orina está regulada por su mayor o menor hidrosolubilidad, vinculada muchas veces a la posibilidad de encontrarse en la forma molecular ionizada a nivel renal.

En principio, la investigación de la estructura primaria del xenobiótico en orina queda limitada a la valoración de los tóxicos minerales. Salvo en los casos de una intoxicación masiva, la excreción por la orina de un xenobiótico orgánico resulta demasiado insignificante para que pueda ofrecer un interés analítico. Así por ejemplo, la excreción urinaria del benceno representa solamente un 0,2 % de lo absorbido; del tolueno, un 0,06 %; del sulfuro de carbono, un 0,05 %; nula para los derivados halogenados. La escasa eliminación urinaria de estos compuestos se explica tanto por el carácter no polar de sus moléculas, como por los procesos de metabolización que suelen experimentar.

d) *Análisis del aire espirado*

La facilidad de su obtención y la inocuidad de su recogida confieren al aire espirado el carácter de medio biológico que goza de una ventaja incomparable sobre los dos anteriores. Sin embargo, su campo de acción solo se puede extender a unos pocos compuestos volátiles: aquellos en los que la presión parcial en sangre es bastante elevada en comparación con la presión parcial en el aire alveolar y, por tanto, queda expedita su salida por la vía pulmonar.

Valoración de metabolitos en los medios biológicos

Cuando la valoración de la estructura primaria del xenobiótico presenta sus limitaciones, cabe pensar en acudir a la investigación de sus metabolitos, sobre todo cuando se trata de compuestos orgánicos. La penetración en el organismo de este tipo de compuestos se acompaña, por regla general, de transformaciones más o menos intensas de sus estructuras químicas, dando lugar a la formación de *metabolitos*. Un ejemplo de ello se indica en la Figura 15.3 para el caso del tricloroetileno.

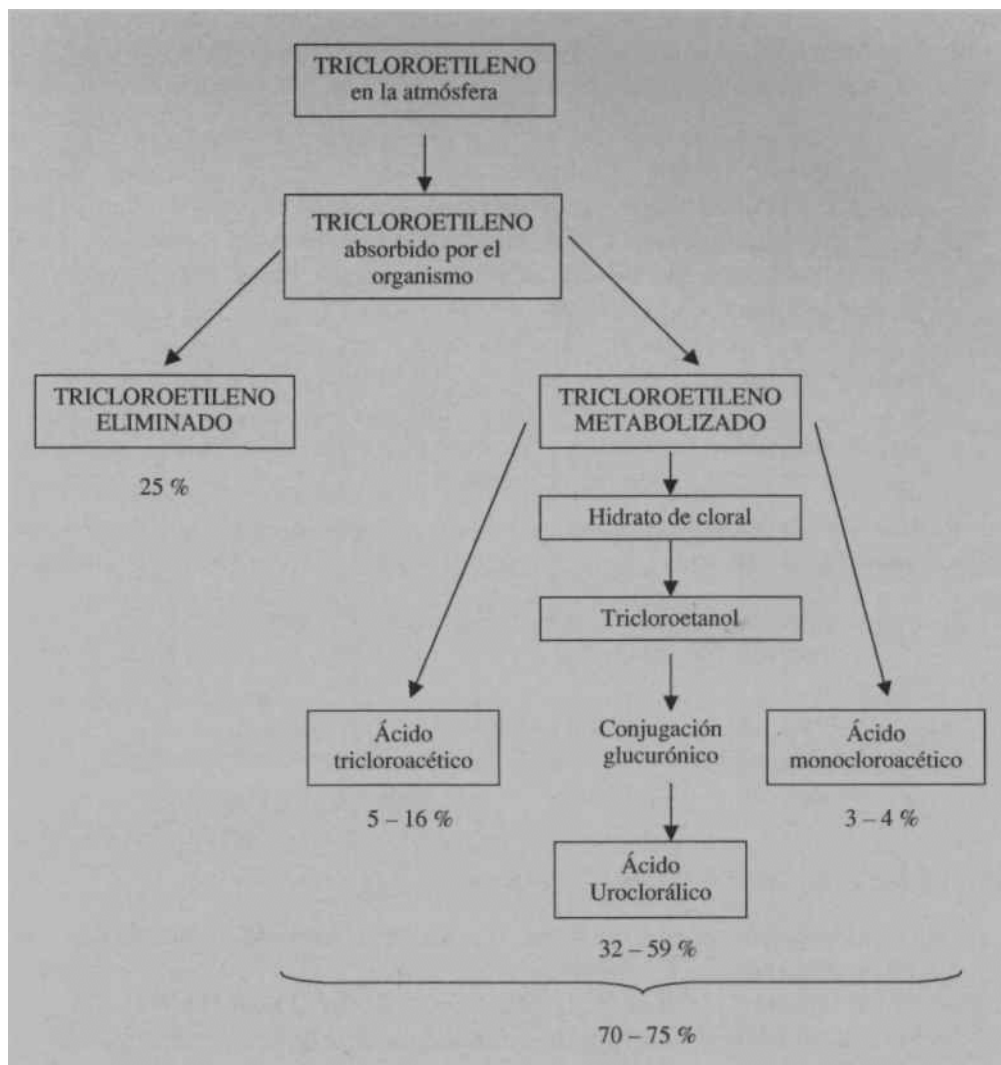


Figura 15.3. *Esquema del perfil metabólico del cloroetileno dentro del organismo humano.*

La valoración de tales metabolitos en los medios biológicos constituye una prueba analítica de la acción del organismo sobre el xenobiótico, a la vez que puede ser considerada como un *índice de exposición* de ese organismo a la acción del xenobiótico.

Hasta el momento, viene a resultar bastante limitado el número de análisis toxicológicos que permiten poner de manifiesto estas biotransformaciones. Fundamentalmente, se dispone de métodos para la identificación y cuantificación de metabolitos en orina, pero siempre hay que tener en cuenta que algunos de estos metabolitos pueden estar presentes en la orina en cuanto son el resultado del

metabolismo normal. En cambio, otros sólo aparecen como una consecuencia de la biotransformación de unos xenobióticos concretos y específicos.

De aquí arranca una diferenciación analítica que resulta esencial:

- La investigación de metabolitos, que suelen estar presente en la orina bajo condiciones fisiológicas normales, sólo tendrá significación toxicológica cuando sea cuantitativa y se haga referencia a los *valores normales*, previamente establecidos. Un incremento sobre el nivel normal de estos valores será un signo de exposición y la prueba de un posible riesgo de una intoxicación de tipo crónico.
- Cuando se trata de metabolitos específicos que resultan de la biotransformación de un xenobiótico concreto, la simple prueba cualitativa de su presencia ya representa por sí misma un *índice de exposición*. Sin embargo, su valoración cuantitativa presenta el interés de permitir además una apreciación del nivel de riesgo frente a una intoxicación.

Se conoce un buen número de metabolitos que pueden ser considerados como componentes fisiológicos normales de la orina:

- Fenoles procedentes de compuestos con anillos bencénicos.
- Compuestos sulfoconjugados derivados de compuestos con anillos bencénicos.
- Ácido hipúrico de la metabolización de tolueno.
- Tiocianatos, que proceden de la biotransformación de compuestos con grupos -CN, tanto orgánicos como minerales.

Otros metabolitos urinarios no son convencionales desde un punto de vista fisiológico y proceden de la metabolización de algún xenobiótico:

- Tricloroacético y tricloroetanol, ambos derivados de la metabolización del tricloroetileno.
- Ácido dicloro-difenil-acético (DDA), metabolito del DDT.
- Para-amino-fenoles, forma de eliminación de algunos insecticidas organofosforados, que incorporan grupos aminos en el anillo bencénico.
- Compuestos azufrados caracterizados por contener en sus estructuras grupos $C = S$ o $C - SH$, que proceden del metabolismo del sulfuro de carbono.

También las valoraciones de los metabolitos ofrecen el escollo de la significación de sus resultados, puesto que la fracción absorbida y retenida del xenobiótico varía ampliamente en función del tiempo de exposición, metabolización, etc. La interpretación de los resultados se basa siempre en dos criterios estrechamente relacionados:

1. Un perfecto conocimiento del proceso metabólico específico del xenobiótico.
2. El valor preciso de la relación entre la cuantía de los metabolitos excretados y la magnitud del riesgo de una intoxicación crónica.

Caracterización de las perturbaciones

Tienen como objetivo primordial investigar la acción de los xenobióticos sobre el organismo vivo al poner de manifiesto las perturbaciones provocadas a distintos niveles, mediante la realización de unas pruebas analíticas.

Como las anomalías que pueden derivar de la penetración de un xenobiótico en el organismo vienen a ser extraordinariamente variadas, quiere decir que las posibilidades analíticas que conducen a su detección también habrán de ser muy diversas, como quedan reflejadas en las Figuras 15.4 y 15.5, donde se recogen de modo respectivo las intoxicaciones provocadas por el plomo o por el cadmio.

A pesar de esta complejidad, los ensayos toxicológicos que se orientan hacia el estudio de las perturbaciones se pueden reunir en tres grupos diferentes:

1. Pruebas encaminadas al control de las alteraciones que han afectado a las denominadas *constantes biológicas*, que pueden ser citológicas, químicas y bioquímicas.
2. Pruebas orientadas a poner de manifiesto modificaciones en las actividades de algunos sistemas enzimáticos, bien por una inhibición de los mismos, bien por una exaltación de ellos.
3. Pruebas en torno al control de intermediarios metabólicos, que aparecen en los medios biológicos, de modo especial en la orina, como consecuencia de la interrupción de una cadena metabólica provocada por la acción del agente tóxico.

Un hecho ordinario en la actual patología clínica es acudir a la determinación en sangre y orina de las denominadas *constantes biológicas* de un modo arbitrario, en cuanto sistema eficaz para detectar anomalías en el funcionamiento de algún órgano vital, como hígado o riñón.

También en la Toxicología predictiva puede alcanzar un cierto interés este tipo de pruebas analíticas, siempre que se disponga de antemano de valores de referencia, con el fin de poder atribuir las variaciones observadas a la acción lesiva de un agente tóxico. En estos casos, la sangre y la orina representan dos medios biológicos adecuados para la valoración analítica de ciertos parámetros, que permitan un diagnóstico precoz de una intoxicación, al detectar a tiempo cualquier tipo de efecto tóxico, tanto en el caso de una persona aislada como de una colectividad.

No obstante, hay que hacer bastante hincapié en subrayar la falta de significación de una prueba aislada, por lo que siempre se debe determinar un conjunto de pruebas hematológicas y bioquímicas. Así por ejemplo, una simple alteración de la velocidad de sedimentación, o el dato aislado del nivel de glucosa en orina, no permite deducir la existencia de una intoxicación por cadmio; en cambio, podrá ser afirmado con certeza cuando lo confirman todo el conjunto de pruebas hematológicas y bioquímicas.

Algunos tóxicos como plomo, monóxido de carbono, tetracloruro de carbono, derivados nitrados, etc., ponen de manifiesto una mayor actividad de la enzi-

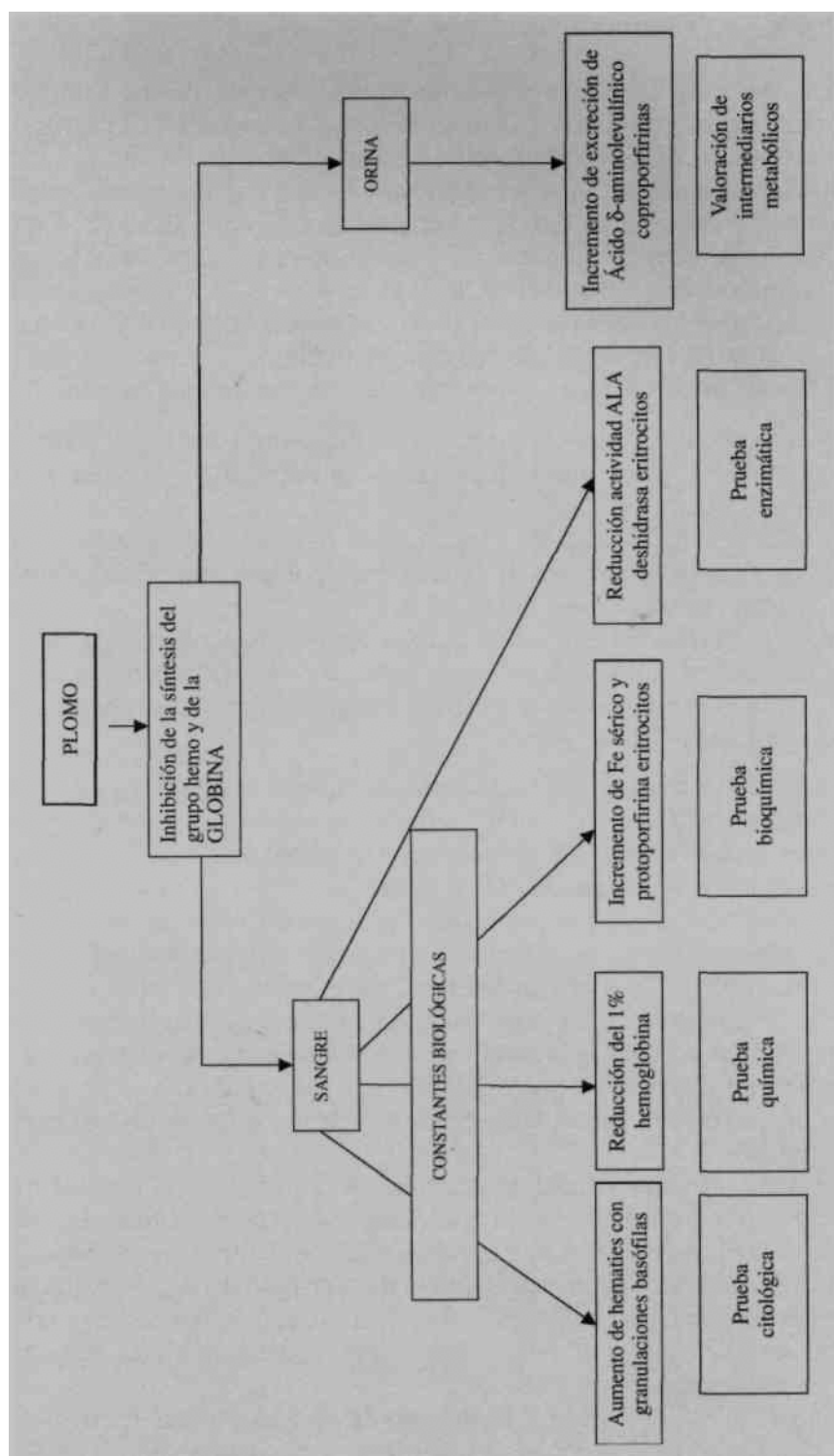


Figura 15.4. Esquema de las pruebas analíticas relacionadas con las perturbaciones provocadas por la acción tóxica del plomo.

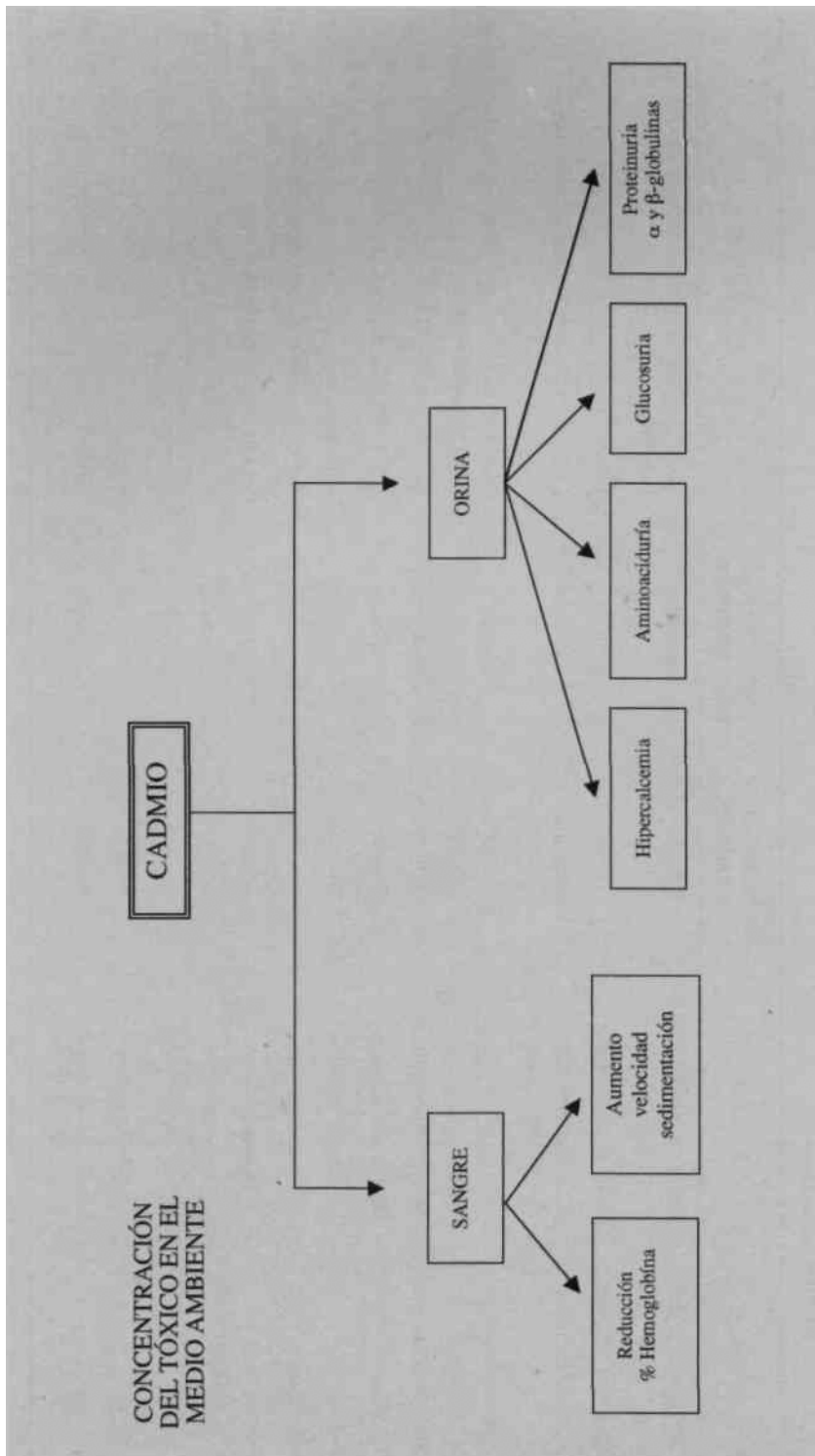


Figura 15.5. Esquema de las pruebas analíticas relacionadas con las perturbaciones provocadas por la acción tóxica del cadmio.

Tabla 15.1. Relación de las modificaciones experimentadas por los principales sistemas enzimáticos como consecuencia de la actividad de diversos tóxicos.

Grupo	Enzima	Medio biológico de análisis	Naturaleza de la perturbación	Tóxicos
Oxidorreductasas	Lactato deshidrogenasa	Sangre	Aumento	Pb, CO, Cl ₄ C, derivados nitros y amino del benceno
Oxidorreductasas	Lactato deshidrogenasa	Orina	Aumento	Cd
Oxidorreductasas	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Eritrocitos	Reducción	Pb, sustancias metaemoglobinizantes
Oxidorreductasas	Catalasas	Eritrocitos	Reducción	Mn, benceno, fenones, insecticidas clorados nitro y amino bencenos
Oxidorreductasas	Monoaminooxidasa	Sangre	Reducción	Hg, S ₂ C, (C ₂ H ₅) ₄ Pb
Hidrolasas	Fosfatasa alcalinas	Sangre	Aumento	Cd, F, Pb, insecticidas clorados
Hidrolasas	Fosfatasa alcalinas	Leucocitos	Reducción	Benceno
Hidrolasas	Colinesterasa	Eritrocitos	Reducción	Se, carbamatos, ésteres fosfóricos
Transferasas	Transaminasas	Sangre	Aumento TGP	Cl ₃ CH, S ₂ C, Pb, Hg, Cd, insecticidas clorados
Transferasas	Transaminasas	Sangre	Aumento TGO	Cl ₄ C, tricloroetileno
Liasas	Anhidrasa carbónica	Sangre	Reducción	Benceno
Liasas	ALA-desidrasa	Sangre	Reducción	Pb
Liasas	5-hidroxitriptófano-des-carboxilasa	Sangre	Reducción	Uranio

ma lactato deshidrogenasa en sangre; lo mismo que el cadmio, flúor, e insecticidas clorados lo hacen con la fosfatasa alcalina. Asimismo, en las intoxicaciones por plomo pueden ser apreciadas anomalías celulares, manifestadas de modo principal por la presencia de granulaciones basófilas en los hematíes y de los llamados cuerpos de Heinz en los eritrocitos. También se incrementa la actividad de las transaminasas por efecto de cloroformo, sulfuro de carbono, plomo, cadmio, mercurio, tetracloruro de carbono, etc. La Tabla 15.1 recoge una relación más completa.

Cuando se trata de la inactivación o reducción de la actividad enzimática, como le ocurre a la glucosa-6-P-deshidrogenasa por la acción del plomo y otras sustancias metahemoglobinizantes o a las colinesterasas por los carbamatos, la consecuencia es una acumulación de sustancias intermediarias metabólicas que no pueden ser utilizadas. De hecho, la detección de las mismas constituye una prueba indirecta de la acción inhibidora enzimática vinculada a la actividad tóxica del xenobiótico.

No obstante, hay que señalar la necesidad de llevar a cabo pruebas cuantitativas de este tipo de sustancias, porque muchos de estos metabolitos intermedios ya existen a ciertas concentraciones en sangre y orina bajo condiciones fisiológicas normales.

A la vista de los resultados de todas estas pruebas analíticas, se podrán tomar las medidas pertinentes para conseguir que una lesión tisular, detectada de modo precoz, no alcance un nivel de desarrollo capaz de ser grave o incluso irreversible.

Los métodos biológicos

- Consideraciones generales
- Influencia de factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico
- Influencia de factores relacionados con la relación dosis-respuesta
- Influencia de la especie animal en la relación entre la estructura química y la respuesta biológica
- Influencia de factores estructurales que inciden sobre la actividad tóxica
- Métodos experimentales de evaluación de la toxicidad
- Criterios generales sobre el diseño de la experimentación toxicológica
- Estudio de toxicidad aguda
- Estudios de toxicidad subcrónica o prolongada
- Estudios de toxicidad a largo plazo o crónica

Consideraciones generales

Entre las diferentes nociones acerca de la Toxicología que han sido dadas, cabe destacar aquella que la define como la Ciencia que estudia, entre otras cosas, los efectos nocivos provocados por los agentes químicos sobre los sistemas biológicos. Se sabe que el manejo, o consumo, de una sustancia puede ser más o menos peligroso en función de sus propiedades fisicoquímicas, de su potencialidad tóxica o de la probabilidad que tenga de penetrar en aquellos organismos sometidos a su exposición. Por ello, se admite que, bajo ciertas condiciones, cualquier estructura química tiene la capacidad de provocar algún tipo de efecto pernicioso sobre los sistemas biológicos.

Como es imprescindible que se procure minimizar el riesgo vinculado a dicha exposición, no puede extrañar que exista un gran interés por valorar la toxicidad consecuente a ella. En términos generales, con las pruebas toxicológicas se intenta investigar qué tipos de condiciones han de darse para que las células biológicas puedan verse afectadas por la actividad tóxica de una estructura química determinada.

Muchas veces, la evaluación tóxica de una sustancia se fundamenta en la observación de sus efectos nocivos sobre algún sistema biológico. Ahora bien, tales efectos llegarán a ser detectables solamente cuando dicho organismo se encuentre bajo unas condiciones de estrés. Por otra parte, también la alteración podría pasar inadvertida siempre que los efectos tuvieran tan escaso relieve, que el tejido siguiera desarrollando sus funciones bajo una aparente normalidad.

Unas veces, los efectos pueden ser una consecuencia de la acción inmediata de niveles elevados del agente químico; en cambio, otras veces se manifiestan como resultado de una acción ejercida durante un largo periodo de tiempo. Esta segunda modalidad es la más frecuente en los tiempos actuales, en los que el progreso económico de la sociedad implica de modo paralelo un riesgo para el ser humano, que se ve sometido a situaciones de exposición, intencionadas o accidentales, frente a un gran número de sustancias químicas. Entre esas situaciones destacan los ambientes industriales, el uso de aparatos domésticos, la alimentación que se recibe, la atmósfera que se respira, etc.

La mayor parte de los métodos biológicos desarrollados en Toxicología han sido el resultado de solucionar dos empeños importantes: a) la necesidad de obtener la mayor información posible acerca de los efectos nocivos de los agentes químicos empleados; b) conocer las consecuencias de un contacto continuado con ellos por parte de los seres vivos. En la práctica, resulta muy difícil demostrar la nocividad, o la inocuidad, de pequeñas cantidades de sustancias que actúan durante un cierto tiempo de modo continuado. En este sentido, no sólo es necesario saber la toxicidad inherente a la actividad de una sustancia química, sino también es importante tener garantía acerca de la inocuidad de cualquier exposición del organismo a esa sustancia.

De todos modos, se pueden señalar los cuatro tipos de objetivos implicados en los planteamientos generales, que son característicos de los estudios experimentales diseñados para estimar la toxicidad de una sustancia química:

- Definir su toxicidad intrínseca.
- Establecer el peligro que representa la exposición a esa sustancia, en cada una de sus formas agudas, subcrónica o prolongada, a largo plazo o crónica.
- Averiguar cuáles son sus órganos dianas o receptores.
- Conocer qué tipos de mecanismos están implicados en sus acciones fisiopatológicas.

Los métodos biológicos establecidos tienen como base de su experimentación el empleo de diversos animales vivos, siempre con la intención de extrapolar sus resultados, en la medida que sea factible, al ámbito del ser humano. Muchos de ellos emplean mamíferos, mientras que algunos otros utilizan los seres vivos más diversos: drosófilas, dafnias, peces, bacterias, etc., e incluso cultivos celulares. Las ventajas de algunos de estos métodos radican en su bajo costo a pesar de emplear un gran número de individuos, siempre necesario para fines estadísticos; mientras que otros, permiten estudiar en un plazo de tiempo

muy corto los efectos sobre la reproducción, los caracteres genéticos o los sistemas enzimáticos.

Sin embargo, los resultados de cualquiera de estas pruebas experimentales no pueden ser extrapolados, sin más, para conocer lo que pueda ocurrir con el ser humano, porque las diferencias existentes entre la especificidad de sus diversos sistemas enzimáticos, así como las barreras protectoras propias de cada especie, pueden modificar completamente el fenómeno tóxico.

Por otra parte, la concentración del agente tóxico en el lugar del receptor depende no sólo de la posibilidad de ser distribuido por todo el organismo, sino también del equilibrio existente entre dos parámetros: la velocidad de absorción y la velocidad de eliminación. Cuando predomina la primera sobre la segunda habrá acumulación del tóxico, equivalente a un incremento de la dosis, mientras que con una excreción fácil o intensa, el agente tóxico irá desapareciendo con una mayor o menor rapidez.

También, cuando las dosis se repiten con tal frecuencia que la cantidad de sustancia administrada excede a la velocidad de eliminación, existe la posibilidad de que la concentración interna aumente a medida que avanza el tiempo. Esto significa que la capacidad de acumulación de una sustancia química depende de la relación entre dos factores: las características aportadas por la vía de absorción y las velocidades de metabolización y de excreción. Los efectos tóxicos aparecerán cuando la acumulación de la sustancia permita alcanzar un cierto nivel.

El tiempo que dura la presencia de un agente tóxico en el interior de un organismo se suele conocer con el nombre de *vida biológica* del tóxico. La magnitud de la misma, no sólo depende de la especie, sino también puede variar con las particularidades propias de cada individuo, dentro de una misma especie. Desde luego, esta influencia es menos acusada cuando el agente tóxico es eliminado intacto, a través de la respiración o de la orina, que cuando experimenta algún tipo de biotransformación, puesto que las vías metabólicas a seguir pueden diferir de un individuo a otro, según las circunstancias más diversas.

La metodología toxicológica aplicada suele tener como fundamento una premisa plenamente admitida:

Todos los efectos de las sustancias químicas sobre la materia viviente son el resultado de una interacción entre la estructura química de la sustancia y algún componente del sistema biológico.

Es posible que la interacción causal pueda ser desconocida, pero sus consecuencias se suelen poner de manifiesto bajo la forma de una perturbación sobre alguna función biológica, aunque existen casos donde la alteración puede aparecer también sobre la estructura del sistema biológico.

Desde luego, los efectos sobre la función no tienen por qué ser acompañados necesariamente de cambios detectables en la estructura del sistema biológico, sino que sencillamente pueden responder a una simple lesión bioquímica. El

efecto tóxico se calificará de reversible cuando desaparece al cesar la acción continuada del agente tóxico; en caso contrario, el efecto resulta irreversible y, por lo general, ocasiona la muerte de la célula.

Precisamente, los estudios mediante métodos biológicos se centran en la detección y medida de la naturaleza del cambio inducido por el agente tóxico sobre las funciones y estructuras biológicas, así como en el significado de tales efectos sobre las demás células vivientes.

Puesto que no todos los efectos de las sustancias químicas sobre los sistemas biológicos han de ser forzosamente nocivos, los planteamientos toxicológicos han de estar orientados hacia el conocimiento de tres puntos importantes:

- Identificar con claridad cuáles son las estructuras químicas responsables de los efectos tóxicos.
- Conocer bajo qué condiciones los provocan.
- Aclarar los mecanismos de interacción de esas sustancias con los receptores.

Los resultados aportados por los estudios realizados con todas las metodologías toxicológicas disponibles han hecho posible establecer cuatro principios generales, en los que se apoyan la mayor parte de los tests toxicológicos implantados:

1. Para que un agente químico produzca un efecto biológico debe tomar contacto inmediato con los sistemas biológicos.
2. Los efectos observados dependen de la concentración del tóxico:
 - Existe un nivel por debajo del cual no es posible detectar el efecto provocado sobre el sistema biológico.
 - Existe un nivel por encima del cual aparecen efectos significativos sobre todos los sistemas biológicos.
 - Existen niveles intermedios capaces de provocar efectos característicos solamente sobre algún sistema biológico.
3. Aquellas células que presentan funciones y caminos metabólicos similares en diversas especies animales, serán afectadas de un modo análogo por el agente tóxico.
4. Pequeños cambios en la estructura de una sustancia química puede influir de modo notable en la actividad biológica de esa sustancia.

En relación con estos principios generales hay que señalar dos observaciones importantes acerca de dos elementos metodológicos que se manejan:

- Las pruebas de laboratorio: han de ser contempladas siempre desde un contexto cuantitativo, aún cuando en sí misma tengan un carácter cualitativo.
- La interpretación: por lo general, resulta bastante dificultosa como consecuencia del carácter pluridisciplinar de toda evaluación toxicológica, que necesita de análisis químicos y bioquímicos, pruebas hematológicas, examen anatomopatológico, síntomas clínicos, etc.

Influencia de factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico

Una consecuencia del primer principio es la necesidad del contacto entre el agente tóxico y su sistema biológico receptor. Por tanto, resulta evidente la importancia que adquieren todos aquellos factores vinculados a las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico. Tales factores son capaces de regular, o de modificar, la distribución del mismo, desde que es absorbido hasta que alcanza su receptor, localizado en cualquier parte del organismo.

De aquí que una evaluación de la actividad tóxica de un xenobiótico pueda exigir una administración a través de diversas rutas con el fin de obtener datos adecuados sobre su distribución por el organismo, modulada siempre por su solubilidad. De acuerdo con este primer principio, algunos compuestos químicos pueden ser considerados inertes desde el punto de vista biológico, aunque solamente lo sean bajo aquellas condiciones ordinarias en las que no tienen acceso al medio celular, por ser insolubles en los líquidos biológicos.

En la práctica, podrían hacer daño cuando sus concentraciones fueran extraordinariamente elevadas, pero entonces los efectos nocivos serían debidos a unas acciones mecánicas traumáticas. Tal es el caso de algunos metales y de los polímeros plásticos, que por las vías sistémicas son inertes, pero que provocan un daño cuando se implantan en un órgano o tejido en cuanto respuesta de las células ante un cuerpo extraño; ejemplo de ello se tiene en los implantes de siliconas aplicados para simular, o abultar, algunas partes anatómicas.

En realidad, las sustancias químicas que pueden tener un interés toxicológico son aquellas capaces de disolverse en los fluidos de los sistemas biológicos, bien de modo primario, bien mediante la correspondiente biotransformación por los sistemas enzimáticos metabólicos, quedando disponibles para las células.

Aunque la solubilidad de estos compuestos en el agua corporal es bastante pequeña, sin embargo los fluidos también contienen proteínas y lípidos que facilitan su transporte: las primeras pueden enlazar la molécula xenobiótica y los segundos actúan como disolventes para el transporte del complejo formado.

Con ello, queda patente que la distribución del xenobiótico es un proceso muy vinculado a su solubilidad molecular, o a las vías de metabolización que actúen sobre ella, fenómeno que debe ser tenido muy en cuenta en los estudios acerca de la toxicidad de una sustancia. No obstante, la incidencia de estas propiedades fisicoquímicas de las moléculas presenta una gran variabilidad en lo que respecta a la concentración alcanzada por el xenobiótico, o su molécula activada, a nivel de receptor. Así se explica que, bajo determinadas condiciones, cualquier célula del organismo pueda verse afectada por una estructura química con resultados muy diversos, según el nivel tóxico presente.

Influencia de factores relacionados con la relación dosis-respuesta

El segundo principio hace referencia tanto a la concentración que se administra de un xenobiótico, como a la relación que existe entre la dosis administrada y la respuesta recibida. En este caso, se pueden dar planteamientos diversos:

- a) Planificar el estudio toxicológico con la aplicación de una sola toma de xenobiótico a cada animal de una población correspondiente a una especie. Con este estudio, se pueden conseguir dos tipos de datos, que aportan informaciones bien diferentes; aunque para una correcta interpretación de los resultados hay que tener en cuenta siempre las posibles variaciones biológicas individuales:
 - Observar la mortalidad, es decir, conocer si el efecto es inocuo o mortal, porque los animales viven o mueren.
 - Realizar la medida de un hecho experimental concreto: reducción de los latidos del corazón, incidencia de fallo renal, etc.
- b) Proyectar pruebas toxicológicas con una población de una especie animal, cuyos individuos se someten a dosis repetidas durante un tiempo más o menos largo.

Lo normal es que en las experiencias toxicológicas cada animal reciba una dosis precisa; es decir, a cada individuo se administran cantidades bien precisas dentro de unos periodos concretos de tiempo. Estas dosis se expresan de modo diferente, en peso o en volumen, según se trate de sustancias sólidas o líquidas.

Si no hubieran membranas y barreras fisiológicas a superar, la concentración del xenobiótico en cualquier punto específico del sistema biológico coincidiría con la dosis administrada. Sin embargo, la realidad no es así porque existen diversos factores que influyen en la distribución del tóxico por el organismo y pueden hacer que la concentración sea inferior en aquellos lugares específicos donde se encuentran sus receptores.

Tales factores son cuatro:

- Membranas que impiden, o dificultan, la distribución.
- Retención selectiva, unas veces por la solubilidad en las grasas corporales, otras veces por enlaces con proteínas, etc.
- Inactivación metabólica.
- Excreción del xenobiótico.

Todos ellos se consideran responsables de las continuas variaciones observadas en la distribución del xenobiótico a través de los diversos compartimentos internos del organismo, hasta el punto que, para un tiempo determinado, pueden encontrarse notables diferencias de concentración de xenobiótico en los diversos órganos del cuerpo.

No obstante, a efectos experimentales se supone que cuando un xenobiótico se administra a varios individuos de la misma especie, todos estos factores actúan de un modo similar y, por tanto, la dosis administrada se distribuirá de la misma manera en todos ellos. De aquí que en las pruebas toxicológicas se dé por supuesta la existencia de una relación directa entre la dosis administrada y los efectos observados en los animales.

Como en la práctica no es posible conocer la concentración exacta que tendría el agente tóxico en el punto específico donde produce su efecto, lo que se valora y relaciona es la dosis administrada frente a la incidencia, o bien frente a la magnitud de la respuesta obtenida. Por esta razón, para poder sacar conclusiones acertadas, es preciso manejar siempre tratamientos estadísticos en la planificación de cualquier experiencia.

Conocer cuáles son los niveles de concentración de un tóxico por debajo de los cuáles no aparecen efectos nocivos puede tener un gran interés toxicológico, porque permite establecer los márgenes de seguridad más apropiados para el empleo de cada sustancia química. Ahora bien, su conocimiento exige llevar a cabo ensayos experimentales muy bien planteados, en los que se incorporen grupos controles de referencia, con el fin de poder relacionar de modo correcto los efectos anormales que aparezcan, tanto con la estructura química como con las dosis estudiadas.

Algunas sustancias, que tienen carácter de nutrientes para el organismo vivo, pueden provocar efectos nocivos cuando sus niveles de concentración superan ciertos límites. En este sentido, cabe citar cómo el selenio, esencial para el funcionamiento normal de un ser vivo, fue conocido primero por sus efectos tóxicos, porque la abundancia de selenio en el medio ambiente origina intoxicaciones en aquellos animales que son alimentados con los forrajes ricos en este elemento. Lo mismo ha ocurrido con otros metales.

Por lo general, la respuesta tóxica de una sustancia endógena se relaciona de modo directo con la concentración solamente cuando se alcanzan niveles superiores a los considerados normales, que son los niveles esenciales para la vida de las células, porque solamente entonces se produce el efecto tóxico.

Influencia de la especie animal en la relación entre la estructura química y la respuesta biológica

El tercer principio establece la existencia de reacciones biológicas similares frente a las acciones de estructuras químicas determinadas, cuando éstas afectan a células que tienen funciones y vías metabólicas idénticas.

El principio también resulta válido cuando las células a comparar corresponden a especies vivas diferentes. Así, una célula muscular puede tener un desigual tamaño en el ser humano o en el ratón, pero sus componentes estructurales, o funcionales, podrían muy bien ser análogos, de tal modo que una estructura quí-

mica que reaccione de una determinada manera con los receptores musculares de una especie, también lo hará del mismo modo en la otra.

Este principio es aplicable siempre que los efectos tóxicos del agente bajo estudio respondan a la actividad de la molécula primaria. En cambio, si la actividad depende de los procesos seguidos en su biotransformación, los efectos que aparecen dependerán del metabolismo peculiar de cada especie. Es decir, el principio no resulta válido cuando se trata de comparar dos especies diferentes, puesto que en alguna de las dos podría no darse las condiciones para que se manifieste el efecto tóxico.

De este modo, cuando dos o más especies de mamíferos poseen tipos de células con funciones idénticas y se exponen a la acción de un mismo agente químico, presentarán iguales tipos de efectos en función de los factores siguientes:

- Según que el receptor esté presente, o ausente, en cada especie comparada.
- Según que el compuesto sea, o no, activado en cada una de las especies.
- Según que el compuesto sea, o no, distribuido, en cada especie hasta el lugar donde se encuentra su receptor.
- Según que en algunas de las especies comparadas exista, o no, un mecanismo secundario, que afecte al receptor.

Como ejemplo de efectos similares en especies distintas cabe citar la acción anestésica de los barbitúricos sobre el sistema nervioso central, observado en perros, gatos, ratones, ratas y ser humano. También, el tetracloruro de carbono provoca un daño hepático en todas aquellas especies que disponga de este órgano.

Así mismo, pueden existir células que desempeñan funciones diferentes y sin embargo se ven afectadas del mismo modo por la acción de una estructura química determinada. Esto significa que ambas células han de tener un mecanismo celular común que resulta afectado por el tóxico.

Ejemplos de sistemas integrados en la función celular que pueden verse perturbados por sustancias xenobióticas, son los sistemas de transferencia de energía y los sistemas implicados en el mantenimiento de un gradiente de iones inorgánicos a través de las membranas celulares.

Para que una estructura química provoque un daño celular resultan necesarias dos cosas:

- a) Que reaccione con algunos de los componentes que son esenciales para su funcionamiento.
- b) Que la célula carezca de la capacidad para reemplazarle.

Precisamente, esta selectividad de actividad biológica presentada por muchas estructuras químicas sobre los mecanismos bioquímicos o fisiológicos, comunes a células de especies diferentes, es lo que proporciona a los resultados toxicológicos, obtenidos en experiencias con animales, un cierto valor para predecir sus posibles efectos cuando actúan sobre seres humanos.

No obstante, para que las extrapolaciones puedan ser lo más representativas posibles, hay que cuidar de modo particular la elección de la especie animal,

siempre en función de la similitud metabólica o de su parecida sensibilidad frente a la sustancia problema. Aunque muchas veces se escoge la rata por razones prácticas, este animal presenta enormes diferencias fisiológicas y bioquímicas con el ser humano, tanto de tipo cualitativo como cuantitativo.

Influencia de factores estructurales que inciden sobre la actividad tóxica

El cuarto principio establece que pequeños cambios en la estructura química de un xenobiótico puede influir de modo notable en su actividad biológica. Básicamente, es una extensión del criterio toxicológico, enunciado con anterioridad, por el que se admite cómo la relación entre una sustancia química y su efecto biológico es el resultado de reacciones fisicoquímicas o de una interacción entre su estructura química y algún componente del sistema biológico.

Como se desconoce la identidad de muchos de estos componentes, se suele hacer referencia a ellos bajo el nombre de «receptores», a los que se le supone una entidad química específica o bien son puntos activos de una molécula.

Cuando se plantean estudios acerca de la naturaleza de los procesos implicados en la reacción de un agente tóxico con su receptor, lo que precisamente se pretende es llegar a conocer la relación que pueda existir entre su estructura química y su actividad biológica. Se conocen muchos casos concretos en los que este tipo de estudios han resultado muy provechosos para la Toxicología aplicada; entre otras cosas, ha sido posible ensayar la actividad de análogos estructurales para comprobar cómo repercuten sobre su actividad biológica ligeros cambios en la molécula.

De este modo, se han conseguido resultados interesantes: consecución de insecticidas con estructuras análogas, que mejoran su eficacia; conocimiento de una mayor potencia de actuación frente a los mamíferos de los derivados catiónicos de As (V), comparados con los de As (III); diferencias en los efectos obtenidos con los distintos isómeros de las anfetaminas, cuyas formas D actúan con doble potencia que las formas L, sobre el sistema nervioso central de los mamíferos, mientras que en la actividad sobre el corazón ocurre todo lo contrario; etc.

Todos estos hechos plantean ciertas exigencias experimentales, puesto que resulta esencial trabajar siempre con sustancias de reconocida pureza química, para que las posibles impurezas no enmascaren los efectos que son propios de la sustancia. En caso contrario, de los resultados obtenidos se podrían deducir conclusiones erróneas.

Métodos experimentales de evaluación de la toxicidad

El rápido desarrollo de la industria química y el amplio uso de sustancias químicas a todos los niveles ha hecho necesario determinar la toxicidad de

numerosos compuestos, que de algún modo se relacionan con la vida humana, y establecer cuáles son los niveles de exposición a esas sustancias que pueden representar un peligro potencial para la salud de la población.

En tiempos pasados, la Toxicología hacía referencia de modo especial a los efectos agudos de los tóxicos, efectos que eran fácilmente investigados mediante pruebas llevadas a cabo con animales de laboratorio. Sin embargo, en los tiempos presentes la atención se desplaza hacia aquellos efectos que sólo se hacen patentes mucho tiempo después de haber tenido lugar la absorción del tóxico; ello ha motivado la introducción de cambios profundos en los planteamientos.

En la actualidad, la amplitud de los estudios sobre toxicidad de un compuesto depende, entre otros, de dos factores:

- Del *uso* que vaya a tener el compuesto: muy amplios en el caso de productos destinados a ser consumidos por el ser humano, tales como medicamentos o aditivos alimentarios.
- De su *importancia económica*: se realiza una evaluación toxicológica completa cuando se trate de productos destinados a formar parte, hoy día, de las numerosas preparaciones empleadas para uso doméstico.

En 1937 se produjo la muerte de más de cien personas que se habían medicado con un elixir de sulfanilamida y se demostró que el agente mortal había sido el polietilenglicol, empleado como disolvente. Este hecho toxicológico dio motivo a que desde ese momento fuera exigido por ley que todo medicamento comprobara su seguridad con ensayos animales, antes de su comercialización para el ser humano. No obstante, hasta la década de los años sesenta estas pruebas no iban más allá de los datos sobre toxicidad aguda. En los momentos actuales, los planteamientos han cambiado y se realizan estudios de toxicidad mucho más amplios.

Una evaluación toxicológica completa significa que la toxicidad del compuesto debe ser probada mediante diversos ensayos: unos cortos, para detectar la toxicidad general sobre el animal de experimentación; y otros prolongados, para comprobar toxicidades específicas después de una exposición continuada durante un largo periodo de la vida de los animales, que cuando menos deben corresponder a dos especies diferentes. En el caso de compuestos que puedan afectar al medio ambiente, como los plaguicidas, se deben aplicar ensayos con especies animales que puedan verse afectados por ellos: peces, insectos, etc.

En la práctica, las Agencias oficiales reconocidas por los distintos países son las que regulan y normalizan los niveles de seguridad para cada uno de los grupos de compuestos establecidos: medicamentos de uso humano, medicamentos de uso animal; aditivos alimentarios; productos químicos de uso industrial; plaguicidas; cosméticos; etc.

Aunque los métodos de evaluación de toxicidad puedan ser básicamente los mismos, sin embargo pueden diferir en lo que respecta a los tipos de ensayos a realizar, o a las interpretaciones que se hacen de los resultados obtenidos. En

general, los diferentes métodos que se aplican para la evaluación de la toxicidad de cada sustancia química pueden ser clasificados en dos grandes grupos:

Primer grupo

Ensayos diseñados para evaluar los efectos globales que los compuesto químicos provocan en los animales de experimentación. Dentro del mismo, las pruebas pueden diferir unas de otras, tanto en la duración del ensayo como en la amplitud con la que es capaz de evaluar la toxicidad. Dentro del grupo pueden incluirse los siguientes tipos de ensayos:

- *Pruebas de toxicidad aguda*: tienen por objeto determinar algunos parámetros toxicológicos de cierta utilidad: la dosis mínima mortal o las dosis letales 100 (DL₁₀₀) y 50 (DL₅₀). Esta última permite establecer un orden de prelación en las sustancias químicas, atendiendo a su toxicidad. El compuesto se administra en una sola toma, con un periodo de observación variable, pero siempre bastante corto. Sus resultados suelen servir de punto de partida para fijar las dosis a utilizar en pruebas ulteriores.
- *Ensayos de toxicidad prolongada o subcrónica*: definidos como estudios que abarcan la décima parte del tiempo vital propio de un organismo vivo. El compuesto se administra en varias tomas de forma regular, o bien de manera irregular con la alimentación. Permiten poner de manifiesto unas posibles acumulaciones del agente tóxico, que proporciona especial interés a sus resultados.
- *Estudios crónicos de toxicidad a largo plazo*: son pruebas que, al menos, deben abarcar dos tercios de la vida del animal base de la experimentación. Aunque no detectan todas las formas de toxicidad, sí pueden poner de manifiesto alguna específica y permiten señalar la conveniencia de complementarlas con otras pruebas. Por ejemplo, es normal que se acompañen de ensayos relativos a la detección de una actividad cancerígena potencial.
- *Estudios bioquímicos*: son pruebas que han adquirido una importancia fundamental en la evaluación toxicológica moderna, particularmente por la información que proporcionan sobre las transformaciones metabólicas y la identificación de metabolitos, cuyas naturalezas químicas permiten explicar a menudo los fenómenos tóxicos. Además facilitan la selección de la especie más adecuada para realizar los estudios de toxicidad.

Segundo grupo

Como los *tests* anteriores no resultan suficientes para evaluar el conjunto de efectos tóxicos derivados de la actividad biológica de una sustancia, se han planteado otros ensayos que permiten prever algún aspecto específico y concreto de

su toxicidad. Son ensayos que responden a la necesidad surgida por los distintos usos que se hacen de algunos compuestos y que pueden requerir la estimación de los márgenes de seguridad vinculados con su empleo. Entre todas ellas cabe destacar las siguientes:

- *Estudios de los efectos sobre las funciones de reproducción*: comprenden los estudios sobre efectos embriotóxicos, no sólo dentro de una etapa fetal teratogénica, sino también en estadios anteriores y posteriores.
- *Estudios sobre potencialidades mutagénicas*: investigan la posible incidencia sobre el genoma.
- *Estudios sobre carcinogenicidad*: valoran la capacidad de algunas sustancias para promover el desarrollo de tumores.
- *Estudios sobre comportamiento*: hacen referencia a posibles manifestaciones neurotóxicas propias de algunas sustancias, como ocurre con los derivados órganofosforados.
- *Estudios inmunológicos*: pone de manifiesto posibles alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune.
- *Estudios sobre los efectos de potencialización*: pruebas que ponen particularmente de manifiesto la potencialización de los efectos tóxicos de ciertas sustancias, cuando la ingestión de las mismas coincide con determinados estados fisiológicos de salud: alcoholismo, hipoproteïnemia, etc.

La finalidad de todas estas pruebas es la de conseguir un mínimo razonable de seguridad en el uso de los innumerables compuestos químicos relacionados con el ámbito vital del ser humano, puesto que la inocuidad absoluta nunca puede llegar a demostrarse, y lo más probable es que no exista.

Los diferentes resultados obtenidos con los métodos experimentales de evaluación de la toxicidad de un xenobiótico permiten aplicaciones prácticas de gran interés. Así, cuando una sustancia presenta efectos tóxicos a los niveles habituales de consumo, dicha sustancia debe ser rechazada y no utilizada. En el caso contrario, pueden ocurrir dos cosas:

- a) Que dentro de un amplio margen de dosis aplicadas carezca totalmente de toxicidad. En este caso, la sustancia se considera inocua.
- b) Que presente toxicidad a partir de cierta dosis. Para estas sustancias se establecen las Dosis Diarias Admisibles (DDA), cuyos valores se expresan en mg/kg de peso corporal. Para su cálculo se parte de la dosis más elevada que no ha presentado efecto tóxico y se divide por 100.

Las DDA deben ser índices obtenidos con los datos aportados por experiencias con aquellas especies animales que se consideran más sensibles frente a cada sustancia. Como se admite que para la población humana se producen variaciones de sensibilidad del orden de un factor 10, se supone que el ser humano es diez veces más sensible que la especie animal experimentada.

No obstante, los valores de las Dosis Diarias Admisibles carecen de significación cuando se tratan de aplicar a sustancias consideradas cancerígenas, por-

que en sus actividades pueden darse fenómenos de suma de efectos. En estos casos, el factor de seguridad aplicable ha de variar en función de la toxicidad de cada sustancia.

Las limitaciones de las pruebas experimentales toxicológicas vienen marcadas por tres factores:

- Las dificultades de realización de dichas pruebas.
- El costo elevado de las mismas.
- La imposibilidad de experimentar con los seres humanos.

Por ello, las pruebas toxicológicas con animales sólo facultan para concluir acerca de la inocuidad de una sustancia con una probabilidad suficientemente segura.

Por otra parte, los estudios toxicológicos actuales hacen uso de métodos *in vitro*, que vienen a ser métodos *complementarios* de los ensayos *in vivo*, en los que se ha centrado el interés de ser usados como métodos *alternativos*. Aunque, por el momento, no puedan sustituir de modo absoluto a los métodos tradicionales de experimentación con animales, sin embargo permiten dos objetivos importantes:

- De una parte, ahorrar el empleo no necesario de gran cantidad de animales.
- De otra, poder conocer con una mayor profundidad los aspectos mecánicos del fenómeno tóxico.

Criterios generales sobre el diseño de la experimentación toxicológica

Para diseñar cualquier tipo de experimentación toxicológica es conveniente ajustarse a una serie de criterios referentes a diversos factores de trabajo:

- *Las propiedades moleculares de las sustancias a ensayar*, el perfecto conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia en estudio nos permitirá definir las condiciones más apropiadas para su manipulación, así como establecer el modelo experimental más adecuado.
- *Las especies animales a elegir*, la elección de la especie animal resulta ser un punto crítico para toda evaluación toxicológica que, por lo general, se resuelve atendiendo a una serie de factores bastante circunstanciales: disponibilidad, características de crecimiento, alimentación, facilidad de manejo, etc.
- *Las dosis a ensayar y las vías de administración*: lo más frecuente es elegir una administración por vía oral, con dosis que dependen del tipo de experimentación, que se desee llevar a cabo.
- *La duración de la experiencia*: debe estar programada en función del tiempo en que aparecerán los efectos esperados: unas veces, con mayor o

menor rapidez; otras, después de un periodo de latencia. Sin duda, que la fijación de este factor se encuentra influido por las características propias de la especie elegida, sobre todo en lo que respecta a su longevidad.

Por otra parte, aunque no siempre resulte factible, antes de diseñar un programa destinado a evaluar la toxicidad de una sustancia parece muy conveniente disponer de algún tipo de información acerca de otros factores, que también son importantes:

- Conocimiento de la naturaleza del compuesto a estudiar, así como su grado de pureza. No faltan las ocasiones en la que es recomendable probar el producto comercializado en lugar del compuesto en toda su pureza. Incluso, en algunos casos, se ensaya por separado la posible toxicidad de las impurezas.
- Disponibilidad de métodos analíticos adecuados para estimar de modo cuantitativo la presencia del compuesto en los diferentes tejidos corporales.
- Para aquellos estudios prolongados, en los que el compuesto se administra en dosis repetidas, resulta de extraordinaria importancia comprobar su estabilidad.
- Conocimiento de aquellas propiedades moleculares que informan acerca de la solubilidad del compuesto, dato fundamental para poder elegir el modo y la vía de administración más adecuados. Lo ideal es que sea soluble en agua o en suero fisiológico (CINa al 0,9 % en agua), ya que de este modo el compuesto puede ser administrado por cualquier vía. Cuando esto no es posible por su escasa hidrosolubilidad, se elige algún aceite vegetal (como maíz), o bien un disolvente orgánico apropiado (como propienglicol); salvo en el caso de administración oral, debe evitarse el empleo de suspensiones o de emulsiones. El modo más simple para administrar un compuesto a un animal es la vía oral, unas veces mediante intubación y otras incorporándolo a la alimentación. En cambio, la ruta más compleja es la pulmonar, porque exige la aplicación de técnicas especiales, que por lo general implican la nebulización o la aerosolización del compuesto.
- El tamaño del animal a usar en las pruebas experimentales, porque este factor limita el volumen requerido para administrar una determinada dosis, con independencia de la vía elegida. Aunque en la práctica estos límites no sean absolutos, sin embargo existen unas recomendaciones generales acerca de los volúmenes máximos permisibles, fundadas en el trato ético que debe recibir todo animal de experimentación.

Además de la conveniencia de disponer de las informaciones anteriores, han sido establecidos cinco directrices o recomendaciones, a tener en consideración para que el diseño de estos tipos de estudios experimentales sea el adecuado:

1. A ser posible, debe trabajarse con aquellas especies (una, o más de una), que tengan un comportamiento lo más parecido posible con el ser huma-

no en lo que hace referencia a su toxicocinética, concretada en los procesos de absorción, metabolismo, retención y excreción.

2. Usar dosis adecuadas para obtener información acerca de todos los tipos de acciones tóxicas.
3. La aplicación de dosis elevadas pone de manifiesto daños tóxicos, que resultan muy útiles para aclarar el mecanismo de acción del efecto deletéreo.
4. La investigación debe ser planteada en base a criterios estadísticos, que permitan juzgar de la significación biológica de los resultados obtenidos.
5. Las rutas de administración elegidas para los animales de experimentación deben ser aquellas que se corresponden con las de exposición en el ser humano.

Sin embargo, a pesar de la significación aportada a la experimentación toxicológica por todas estas cautelas y recomendaciones, resulta prácticamente imposible poder establecer con una garantía total la seguridad ofrecida por un compuesto bajo cualquier condición de uso y para todo tipo de población. Esto se explica porque la seguridad de una sustancia depende siempre de las condiciones de utilización y solamente cabe ser expresada en términos de la probabilidad estimada para que el daño no ocurra.

Estudios de toxicidad aguda

En un principio correspondían a los tests de *letalidad* que se diseñan para determinar las dosis que causan la muerte en la especie animal elegida, único dato que se obtiene con este tipo de estudio. Aparte de recibir críticas por no ajustarse a una ética científica y por significar un derroche económico de los recursos experimentales, estas pruebas no deben ser consideradas como sinónimas de los test de toxicidad aguda, porque estos últimos deben responder a estudios muchos más amplios, que aporten una información toxicológica más completa.

Su objetivo ha de ser la completa caracterización de los efectos biológicos agudos de un compuesto químico; no sólo su letalidad, sino también los órganos diana y los signos clínicos, así como aportar los datos suficientes para identificar el síndrome de intoxicación aguda, de tal manera que los pacientes intoxicados puedan ser diagnosticados y tratados de manera adecuada. Por ello, deben ser aplicados a todos los compuestos químicos que presenten algún interés de tipo biológico.

Para estos tipos de ensayos, la sustancia es administrada a los animales de experimentación mediante una sola toma, para observar después la sintomatología consecuente a su actividad tóxica y el nivel de letalidad que produce. Hoy día, los protocolos de estos ensayos han variado de modo notable en lo que pueda hacer referencia a varios aspectos: utilizar un número bastante más redu-

cido de animales; de elegir la especie más sensible; utilizar, en lo posible, solamente una vía de administración. No obstante, siempre debe ser tenido en cuenta que la toxicidad de una sustancia depende bastante de la vía de penetración en el organismo, debido a la incidencia que puede representar una absorción intestinal deficiente, unos procesos metabólicos que modifiquen su estructura química a su paso por el hígado, etc.

Se suelen emplear grupos homogéneos de animales que, bajo tomas únicas, reciben dosis crecientes de la sustancia problema. La observación sintomatológica de los animales nunca sobrepasa a los catorce días. Las especies a utilizar suelen ser el ratón y la rata; pero cuando se desea calcular la dosis máxima tolerada, también se usan conejos, perros y primates.

Los tipos de efectos anormales que se someten a observación son bastante numerosos: sensibilidad al dolor, sonido y tacto; alteraciones de la actividad; funcionamiento de los reflejos; comportamiento del animal; características de la respiración; desarrollo de la defecación; presencia de convulsiones; etc. Además, también deben ser anotadas las lesiones detectadas mediante el examen macroscópico durante la autopsia.

En consecuencia, los estudios sobre toxicidad aguda apoyan unas informaciones toxicológicas muy valiosas:

- Apreciar la naturaleza de los efectos nocivos observados.
- Establecer una correlación entre la magnitud del efecto y la dosis administrada.
- Conocer la DL_{50} , es decir, determinar de modo estadístico la dosis capaz de provocar la muerte en el 50 % de los animales del grupo experimentado.
- Indicar las oportunas recomendaciones a tener en cuenta en el planteamiento de aquellos estudios toxicológicos que han de requerir una duración más prolongada.
- Predecir los efectos tóxicos que podrían darse en el ser humano.

En general, los métodos de valoración con animales han resultado ser bastante útiles para establecer los márgenes de seguridad en el ámbito del ser humano. Incluso puede afirmarse que los casos donde se detectan efectos tóxicos inesperados se deben a una inadecuada elección de la especie animal empleada, que entre otras cosas puede diferir en el metabolismo de la sustancia.

No obstante, una evaluación toxicológica no resulta completa hasta que el compuesto ha superado la prueba de aplicación durante un cierto tiempo en el ser humano sin manifestar algún tipo de problema.

Bajo el epígrafe de ensayos sobre toxicidad aguda, varias agencias reguladoras incluyen los siguientes tipos de pruebas: test de irritación ocular o dérmica; test de sensibilización dérmica; pruebas de fotosensibilización y fototoxicidad; test de letalidad/toxicidad aguda sistémica.

Estudios de toxicidad subcrónica o prolongada

Los estudios sobre toxicidad prolongada, también denominada subcrónica, tienen como base la aplicación diaria de dosis de la sustancia problema con la finalidad de reconocer y valorar todos aquellos efectos que aparecen como consecuencia de una exposición periódica a un compuesto químico.

En función de los datos aportados por ensayos preliminares y de los conocimientos que existen acerca de sus metabolismos, se eligen dos especies animales: ratas o ratones entre los roedores; perros o monos entre los que no lo son. Precisamente, las especies escogidas marcan la duración de las pruebas, que deben corresponder a una décima parte de la vida de los animales, que puede oscilar entre catorce días y tres meses.

Se suelen aplicar tres niveles de dosis y para determinar la vía de administración más adecuada hay que tener en cuenta si los animales van a continuar después con pruebas de toxicidad crónica, e incluso alguna de toxicidad específica, como suele suceder en el caso de aditivos alimentarios. En estas situaciones hay que tener presente dos importantes cautelas, relacionadas con la administración de las dosis diarias:

- La ruta de administración está limitada por la necesidad de elegir aquella que origine menos daño con las aplicaciones continuadas.
- Se deben emplear animales en los que sea fácil obtener, dentro de intervalos periódicos, las correspondientes muestras de sangre y orina necesarias para las determinaciones analíticas clínicas

Por eso, cuando una sustancia deba ser administrada de modo diario durante varias semanas, es normal que se utilice la vía oral.

La detallada observación semanal del estado de salud de los animales permite obtener una serie de datos que resultan esenciales para una adecuada interpretación del fenómeno tóxico:

- *Factores externos*: estado general; comportamiento; consumo de alimentos y bebidas; variación del peso corporal, porque las pérdidas de peso suelen ser un índice de un efecto tóxico, etc.
- *Pruebas hematológicas*: fórmula leucocitaria, valor hematocrito, hemoglobina, test de coagulación, etc.
- *Pruebas bioquímicas en sangre*: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , proteínas séricas, glucosa en ayunas, N ureico, bilirrubina, fosfatasa alcalina (daño celular), transaminasas (daño hepático), etc.
- *Pruebas analíticas en orina*: pH, densidad, sedimentos, proteínas, glucosa, bilirrubina, etc.
- *Localización y distribución del xenobiótico o de sus metabolitos*: aplicación en los distintos órganos de métodos analíticos de fluorescencia, autoradiografía etc.

- *Pruebas de sensibilización y de adicción*: investigan la existencia de anti-cuerpos sensibilizantes, reacciones alérgicas y choques anafilácticos.
- *Pruebas funcionales* en todos los animales enfermos.
- *Necropsia completa* de todos los animales, al final de la experiencia: peso de órganos, análisis histopatológico de órganos y tejidos, etc.

Con todo ello, los estudios de toxicidad subaguda nos proporcionan ciertos conocimientos, que son importantes para poder concluir de un modo adecuado acerca de los posibles comportamientos tóxicos de todas aquellas sustancias químicas relacionadas con el ámbito vital del ser humano. En la práctica, permiten disponer de los datos siguientes:

- Información sobre los principales efectos tóxicos.
- Detección de los órganos dianas implicados.
- Cinética de la biotransformación del xenobiótico.
- Naturaleza acumulativa o retardada de los efectos tóxicos.
- Posible reversibilidad, o no, de los efectos tóxicos.
- Orientación sobre las dosis a utilizar en los estudios crónicos.

Estudios de toxicidad a largo plazo o crónica

Los estudios sobre toxicidad a largo plazo se realizan con el objeto de visualizar aquellos efectos tóxicos que aparecen como consecuencia de la administración diaria de un compuesto químico, aunque sea a dosis reducidas, durante un largo periodo de tiempo. En la práctica, son ensayos diseñados para poner de manifiesto los efectos tóxicos que requieren un largo tiempo de latencia, como los efectos cancerígenos, o bien son consecuencia de procesos acumulativos. En principio, son los únicos que permiten detectar ciertas afecciones cardíacas o renales normalmente vinculadas a la edad de los animales.

La duración de estos ensayos pueden variar entre dos y siete años, según las especies animales empleadas, que como las dosis aplicadas han sido elegidas en función de los resultados obtenidos con las pruebas sobre toxicidad subcrónica. La vía de administración debe coincidir con las mismas existentes en los seres humanos cuando se encuentran expuestos a dicho compuesto.

Durante todo el ensayo, se controla con cierta periodicidad el estado de salud de los animales mediante la observación y determinación analítica de parámetros relacionados con dicho estado:

- *Peso corporal y examen físico* cada semana.
- *Pruebas analíticas de sangre y orina* cada 3-6 meses.
- *Test funcionales* a intervalos de 3-6 meses.
- *Sacrificio frecuente de algunos animales*, con el fin de poder descubrir, tanto el momento de la aparición de lesiones histopatológicas, como su evolución en el tiempo.

— *Necropsia completa* de todos los animales al final de la experiencia, incluyendo el examen histológico de todos los órganos.

El tratamiento estadístico de todos estos resultados permite concluir acerca de una serie de factores toxicológicos, todos ellos de una gran importancia:

- Naturaleza del fenómeno tóxico a la vista de los órganos dianas y de las funciones dañadas.
- Tiempo de aparición de los efectos tóxicos.
- Posible reversibilidad de los efectos observados.
- Dosis con efectos tóxicos.
- Dosis sin efectos tóxicos, reconocida como la dosis umbral, que sirve de base para fijar varios parámetros importantes para el ser humano: la dosis diaria admisible; los límites de tolerancia en alimentos y bebidas; los valores límites de exposición ambiental; etc.

Evaluación del riesgo tóxico

- Introducción
- Percepción del riesgo
- Evaluación de riesgos
- Estrategias de evaluación de riesgos para la salud humana
- Conceptos relacionados con la evaluación del riesgo
- Fases del proceso de evaluación del riesgo
- Caracterización del riesgo: utilización de los NOAEL, método de la dosis «benchmark»

Introducción

La evaluación del riesgo tóxico es un proceso cuyo objetivo final es estimar la probabilidad que tiene un agente para producir efectos tóxicos en el organismo humano. Es un proceso difícil y largo que se realiza siguiendo una serie de pasos, que necesariamente deben ser completados para llegar a conclusiones válidas. A medida que se incrementan los datos conseguidos tanto a partir de observaciones realizadas en animales como en el ser humano, se progresa desde situaciones de completa Incertidumbre hasta otras en las que la Incertidumbre se hace cada vez menor (Fig. 17.1). Cuando el objetivo de la evaluación es el organismo humano, son los datos de ensayos clínicos y epidemiológicos los que tienen una mayor relevancia, mientras que los ensayos con animales adquieren un menor peso, al implicar extrapolaciones cargadas de dudas.

El proceso a seguir resulta diferente según se aplique a la evaluación de riesgos tóxicos provocados por los compuestos químicos o por los agentes físicos, como las radiaciones ionizantes, sobre el ser humano o sobre los ecosistemas, objetos de la ecotoxicología. Aunque los principios básicos sean los mismos, la metodología para cada caso es algo distinta. En el presente capítulo será tratada solamente la primera de las situaciones enunciadas.

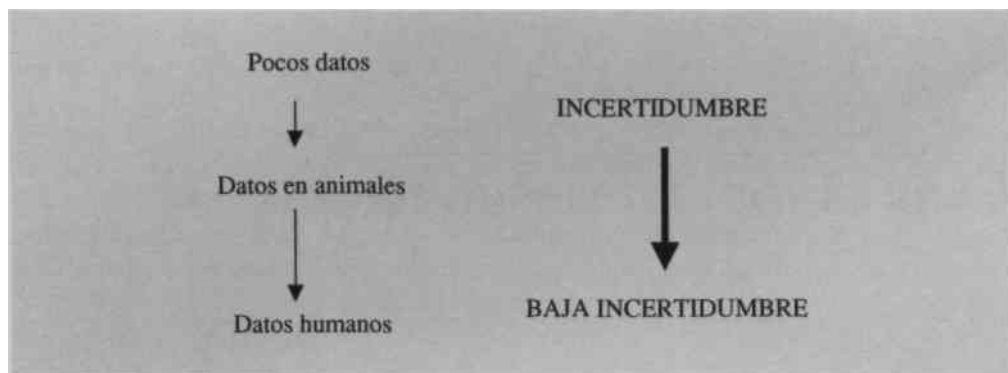


Figura 17.1. *Relación entre certidumbres del riesgo tóxico y los datos científicos disponibles.*

Como los datos disponibles para la mayoría de los compuestos químicos conocidos son mínimos, las conclusiones respecto de sus posibles efectos tóxicos en el ser humano resultan meramente especulativas, es decir, no fundamentadas de modo idóneo en un número adecuado de datos científicos. Por consiguiente, es muy importante conocer el grado de certeza o, lo que es equivalente, la incertidumbre asociada a cualquier afirmación sobre la toxicidad de una sustancia. En este ámbito, se suelen producir a menudo notables confusiones en la opinión pública, incapaz para distinguir lo que son conclusiones bien fundadas de lo que son meras especulaciones.

Por otra parte, aunque los datos de toxicidad disponibles de la mayor parte de los millones de compuestos químicos conocidos son muy escasos, sin embargo para una gran proporción de los mismos se puede dar alguna de las siguientes circunstancias: o bien la población general no está nunca expuesta a ellos, porque son productos que no están presentes en el medio ambiente al no salir del ámbito del laboratorio, o bien la exposición tiene lugar a concentraciones muy por debajo de los niveles tóxicos.

Percepción del riesgo

Los problemas toxicológicos son muy diferentes según las distintas regiones del planeta y pueden sufrir también variaciones en función de las épocas. Así, lo que en un país constituye un serio problema no lo es en otro, y lo que en un momento histórico puede suponer una grave amenaza para la salud pública deja de constituir un problema al cabo de un tiempo, probablemente por la adopción de una serie de medidas preventivas una vez reconocido el peligro. Tal ocurre en los países en desarrollo, donde la mala utilización de los plaguicidas puede dar lugar a serios problemas de intoxicaciones agudas y crónicas, mientras que son poco frecuentes hoy día en los países industrializados.

Incluso, dentro de una misma sociedad, la *percepción del riesgo* puede variar según los colectivos, de tal manera que lo que para unos puede ser *inaceptable* para otros puede ser totalmente *tolerable*, términos estos que no tienen un significado científico sino pragmático o político. Conviene precisar que desde un punto de vista científico el riesgo cero no existe, ya que es imposible demostrar un resultado negativo. Lo que se consigue con la investigación toxicológica es disminuir el grado de incertidumbre; cuanta más y mejor investigación se realice, menor será la incertidumbre asociada al resultado de la evaluación del riesgo. En resumen, la ciencia toxicológica trata de proporcionar la base científica necesaria para mantener el riesgo en unos niveles aceptables o tolerables por la población, aunque siempre haya que aceptar un cierto riesgo. Dicho de otra manera, un evento se puede admitir como *seguro* si sus riesgos se consideran aceptables.

Evaluación de riesgos

La evaluación de los riesgos tóxicos puede plantearse de modo bien diferente según se apliquen los puntos de vista de los Estados Unidos o de la Unión Europea. En los Estados Unidos la evaluación del riesgo es una actividad organizada que realizan las agencias federales desde la década de los años 70. Tal y como la definió el «National Research Council» en 1983, consiste en «la caracterización científica y sistemática de los posibles efectos adversos para la salud, que se pueden producir como consecuencia de la exposición humana a agentes o situaciones peligrosas». La evaluación de riesgos no es propiamente una ciencia, sino que constituye una herramienta muy potente para extraer de los conocimientos científicos unas conclusiones, que sean fácilmente comprensibles para los no científicos. Se considera como una metodología que sirve de apoyo a los diversos estamentos políticos para la toma de unas decisiones que habrán de tener su repercusión en la salud pública y que, a su vez, deberán ser entendidas por la sociedad en general. Este sistema de trabajo se ha aplicado sobre todo a la evaluación de los riesgos cancerígenos, en particular los del tabaco, pero actualmente se está utilizando también para otros efectos.

El proceso completo consta de tres fases: evaluación de riesgos, gestión de riesgos y comunicación de riesgos (Fig. 17.2). Se entiende como *gestión del riesgo* el proceso de toma de decisiones políticas, en esta etapa se tienen en cuenta no sólo los resultados obtenidos en la evaluación de riesgos, sino también toda una serie de factores adicionales y frecuentemente contrapuestos: preocupación social, intereses económicos, limitaciones legales, binomio coste-beneficio, implicaciones políticas, etc. La decisión final, teniendo en cuenta estos factores, supone la elaboración de una legislación y el establecimiento de unas medidas de control para verificar su cumplimiento. Por tanto, los dos componentes de la gestión del riesgo son *legislación* y *control*.

Se entiende como *comunicación del riesgo*, el proceso por el cual la información sobre la evaluación del riesgo y sobre la gestión del mismo se hace com-

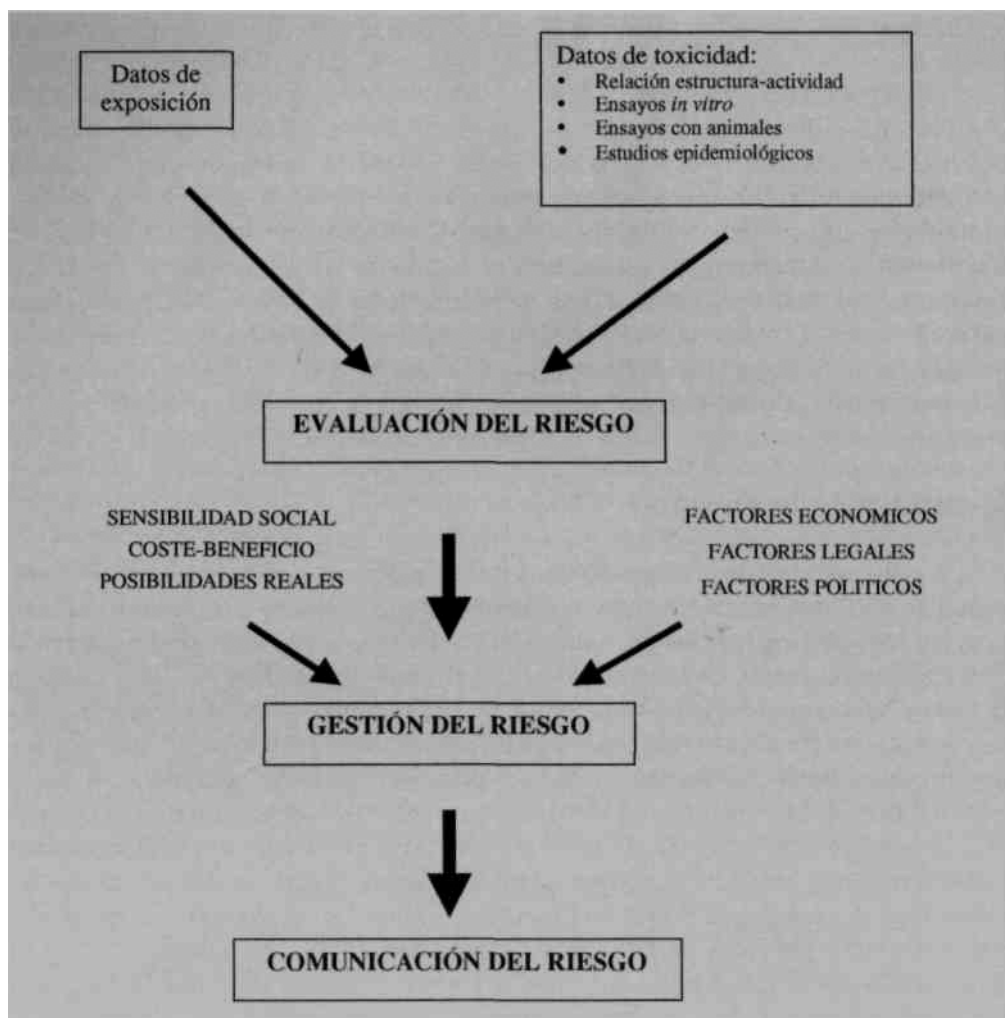


Figura 17.2. *Fases del proceso implicado en la caracterización de los riesgos tóxicos.*

previsible para los distintos colectivos sociales: legisladores, jueces, trabajadores, amas de casa, ecologistas etc. En definitiva se trata de responder de una manera clara si unas circunstancias son o no seguras, pregunta que con mayor frecuencia se plantea la sociedad en general.

Los países de la Unión Europea establecen la evaluación de riesgo para aquellos productos químicos considerados peligrosos. En el caso de *sustancias nuevas*, existe la obligación de que el fabricante o importador de una nueva sustancia lo notifique antes de colocarla en el mercado a la autoridad competente del Estado miembro en el cual se vaya a fabricar o importar (Directiva del Consejo 67/548/EEC). Una vez recibida la notificación, dicha autoridad deberá realizar una evaluación de los riesgos que conlleva el uso de esa sustan-

cia para el ser humano y para el medio ambiente (Directiva de la Comisión 93/67/EEC).

Por otra parte, para las *sustancias ya comercializadas*, se exige que se evalúen los riesgos para el ser humano y el medio ambiente en aquellas que son consideradas como *prioritarias*, evaluaciones que deben ser realizadas por las correspondientes autoridades designadas por los responsables de los Estados miembros que actúan como ponentes (Regulación del Consejo (EEC) No 793/93, artículo 10).

El procedimiento a seguir en uno u otro caso, está contenido en la guía técnica que la Comisión Europea (DGXI) dirige a las autoridades competentes de los diferentes estados miembros y que se hace extensible a los fabricantes e importadores de sustancias, los cuales tienen la obligación de proporcionar la información requerida para realizar dicha evaluación de riesgos. Así mismo, también resulta útil para otros tipos de organizaciones, dentro o fuera de la Unión Europea, que puedan estar implicadas en la evaluación de riesgos. Como los procedimientos técnicos, detallados en dicha guía, no son de obligado cumplimiento, las autoridades competentes pueden utilizar aquellos otros que consideren más apropiados y estén científicamente justificados.

Las sustancias ya comercializadas y consideradas como prioritarias, para las cuales se presupone existe una buena base de datos acerca de sus efectos tóxicos y exposición, necesitan de una evaluación de riesgos totalmente completa.

Aunque la evaluación de los riesgos tóxicos para la salud humana y para el medio ambiente se realizan por separado, al final se hace una evaluación conjunta para cada sustancia considerando ambos aspectos (Figura 17.3).

Una vez completado el proceso de una evaluación de riesgos, se pueden extraer del mismo diversos tipos de conclusiones:

1. Para las sustancias ya comercializadas:
 - a) La necesidad de obtener más información y de realizar más estudios.
 - b) En el momento actual no se necesitan más datos ni tomar medidas de reducción del riesgo.
 - c) Se deben de tomar medidas de reducción del riesgo.
2. Para las sustancias nuevas:
 - a) No existe una preocupación inmediata. No debe ser considerada de nuevo hasta que haya un aumento de la producción
 - b) Existen motivos de preocupación. Se exigen más datos de forma inmediata.
 - c) Existen motivos de preocupación. La autoridad competente hará recomendaciones para reducir el riesgo.
 - d) Existen motivos de preocupación. Se exigirán más datos cuando aumente la producción.

En definitiva, la evaluación del riesgo es un proceso iterativo, tanto para sustancias nuevas como para las ya existentes: serán requeridos nuevos datos

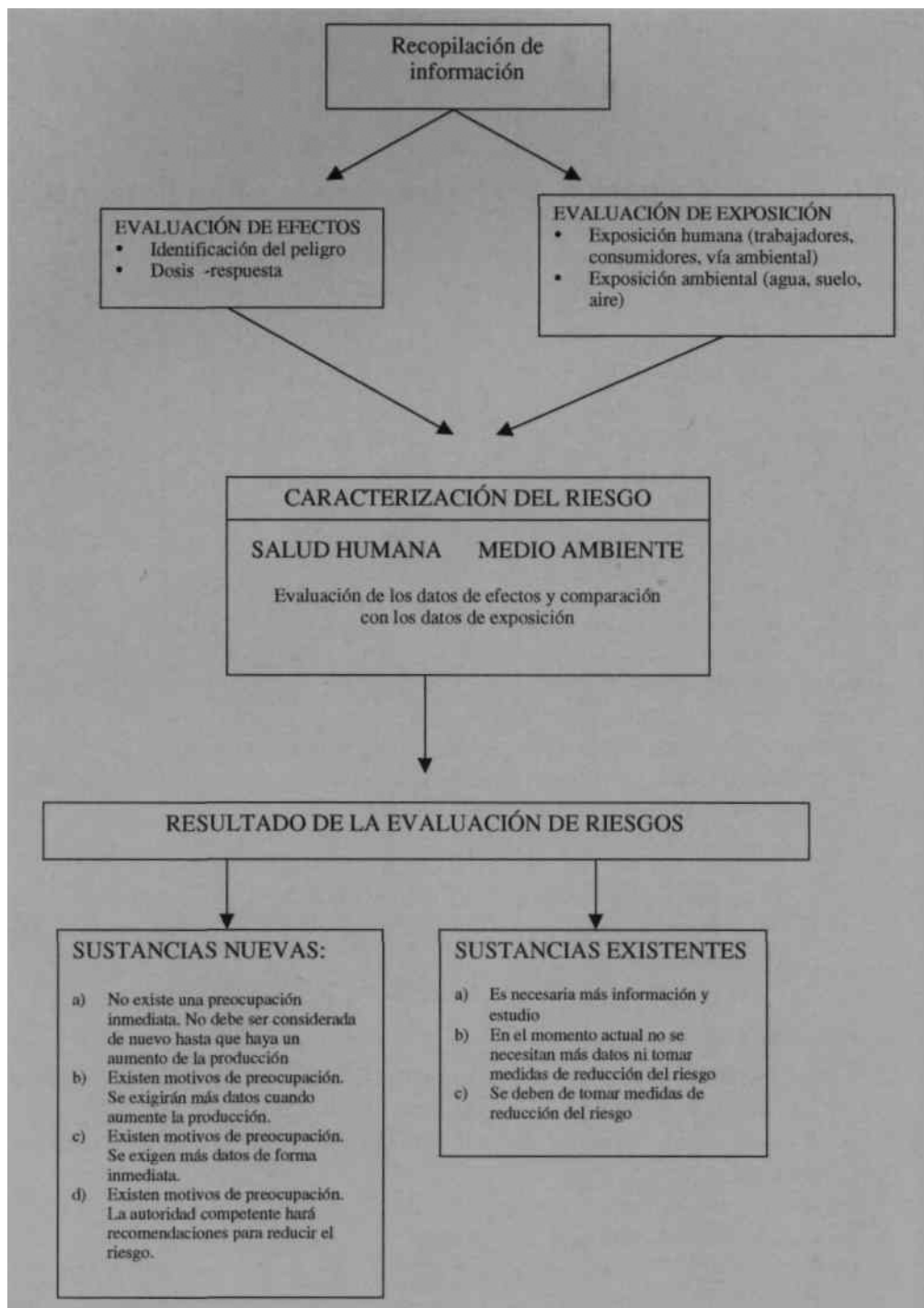


Figura 17.3. *Esquema de la evaluación conjunta de los riesgos tóxicos sobre la salud humana y el medio ambiente, que conlleva el uso de sustancias químicas.*

cuando aumente el tonelaje de producción anual o siempre que aparezcan informaciones más recientes acerca de la exposición o de los efectos adversos de las sustancias.

Estrategias de evaluación de riesgos para la salud humana

En la actualidad, existe una gran confusión tanto entre la población en general como entre los toxicólogos, sobre lo que se debe entender por evaluación de riesgos para la salud humana. A menudo se confunden dos estrategias con metodologías completamente distintas, aunque dispongan como característica común su objetivo final: conseguir detectar y reducir los efectos adversos sobre la salud humana como consecuencia de la exposición a los productos químicos (Figura 17.4).

Una de ellas (estrategia A), se basa en experiencias realizadas con animales y es muy utilizada para el estudio de los aditivos alimentarios o de otros componentes, así como para algunos contaminantes alimenticios; suele estar encaminada a la toma de medidas preventivas para disminuir el riesgo al máximo. Por extrapolación de los estudios realizados con animales se definen los NOAEL

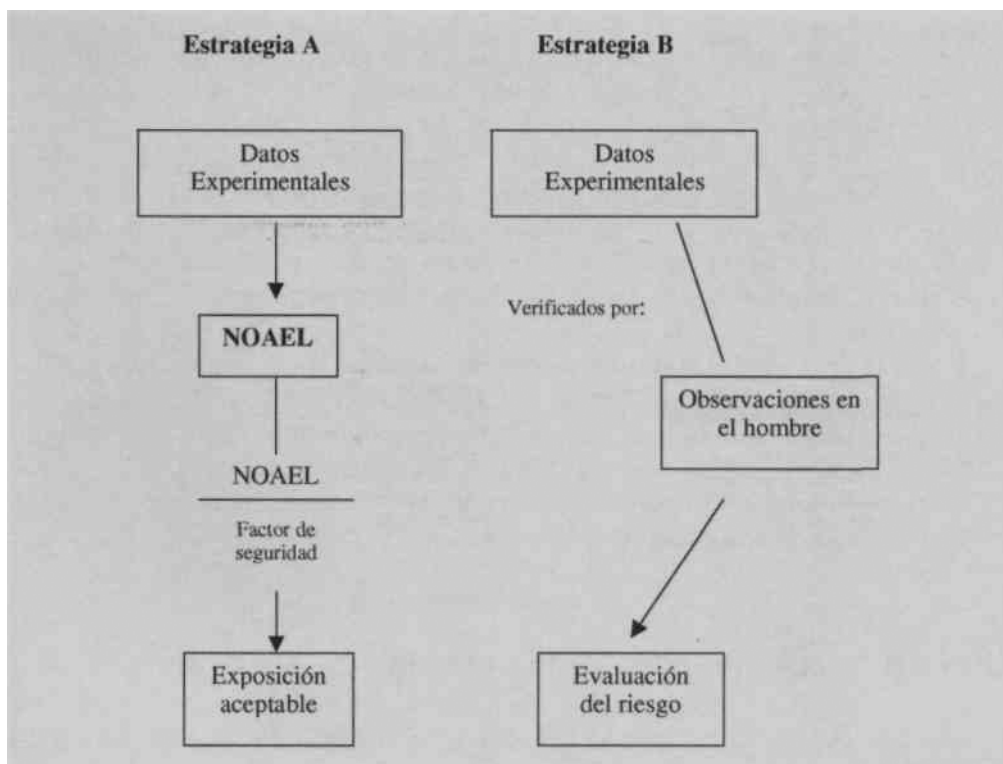


Figura 17.4. *Posibles estrategias de evaluación de riesgos para la salud humana.*

(Nivel sin efecto adverso observable) utilizados para diversos cálculos de riesgo; así por ejemplo, mediante división por unos factores de incertidumbre, seleccionados de una forma empírica, se definen unos niveles de ingesta tolerables (IDA: Ingesta diaria admisible).

La otra (estrategia B), se basa fundamentalmente en los estudios realizados con seres humanos, por lo que no es necesario realizar extrapolaciones. Debido a la escasez de datos, lamentablemente no se puede aplicar en muchas situaciones.

Los datos existentes en este caso, hacen referencia principalmente a medicamentos, mientras que para la mayoría de las sustancias presentes en el medio ambiente son bastante limitados; por consiguiente, en sentido estricto, no se podría realizar una evaluación de riesgos en otro ámbito que no fuera el terapéutico. Sin embargo, el hombre necesita ser protegido de otros muchos compuestos químicos a los cuales está expuesto.

Cuando existe una ausencia total de datos clínicos, es evidente que sólo se puede aplicar la estrategia A, pero siempre que sea posible, conviene apoyar las extrapolaciones con observaciones humanas. Con cierta frecuencia, este tipo de datos sólo se consiguen cuando suceden exposiciones masivas a una sustancia, unas veces por motivos ocupacionales y otras como consecuencia de un accidente. Así, por ejemplo, la mayor parte de los datos humanos de que se dispone sobre las dioxinas provienen del seguimiento realizado a las personas expuestas a dichos compuestos después del accidente que tuvo lugar en Seveso (Italia) en el año 1976.

Los estudios completos de evaluación de riesgos permiten cuantificar el mismo, es decir, llegar a una estimación de la disminución del porcentaje de personas afectadas si disminuye la exposición al agente químico a un determinado nivel. Evidentemente, este tipo de conclusiones solamente se pueden alcanzar con datos humanos óptimos, rara vez disponibles. Por otra parte, la determinación de los niveles máximos permisibles que se obtiene con la estrategia A, parece haber resultado efectiva desde el punto de vista de la prevención de los posibles efectos tóxicos, a pesar de sus limitaciones por no estar sustentada por datos clínicos.

Estas dos estrategias son mutuamente excluyentes. Si se realiza una evaluación de riesgos se necesitan datos epidemiológicos y por lo tanto es necesario que haya exposición humana. Si se adoptan medidas preventivas siguiendo la estrategia A, se disminuirá la exposición, de tal manera que impedirá la realización de estudios epidemiológicos adecuados y no permitirá conocer si realmente existe riesgo para la salud humana o no.

Conceptos relacionados con la evaluación del riesgo

En el ámbito de la evaluación del riesgo se manejan dos vocablos ingleses —«hazard» y «risk»— que en el mundo anglosajón no son usados de manera uniforme por los distintos científicos o por las distintas agencias reguladoras; su

traducción al idioma castellano comporta no pocas dificultades. Para evitar confusiones al respecto, en este capítulo el término «hazard» ha sido traducido por peligro y el término «risk» por riesgo, y sus definiciones corresponden a las acordadas por la mayoría de los expertos:

- *Peligro*: indica el potencial (la posibilidad) de una sustancia química para producir efectos adversos en condiciones apropiadas. Es una expresión *cualitativa*.

Puede ocurrir que para una sustancia determinada, las condiciones adecuadas se produzcan siempre, mientras que para otras solamente aparecen en un escenario extremo de exposición. Hay que señalar como la peligrosidad de una sustancia no informa ni sobre la probabilidad de inducción de un efecto bajo unas determinadas condiciones de exposición, ni sobre la posibilidad de que dichas condiciones se produzcan.

- *Riesgo*: incidencia de un efecto adverso definido bajo unos determinados niveles de exposición (dosis). Es una expresión *cuantitativa*.

El riesgo se determina mediante la relación dosis-respuesta y se refiere normalmente, si no se especifica lo contrario, a riesgo para el ser humano. Por lo tanto, *a priori*, estarían excluidas las extrapolaciones a partir de estudios en animales.

El riesgo informa tanto sobre la probabilidad de inducción de un efecto bajo unas determinadas condiciones de exposición, como sobre la posibilidad de que dichas condiciones de exposición se produzcan.

Así por ejemplo, la toxina botulínica es un compuesto con un potencial neurotóxico muy alto, es decir 1 µg de esa sustancia ingerido por un ser humano es mortal, pero esta circunstancia constituye un hecho raro o poco frecuente. Por lo tanto, corresponde a una sustancia considerada como muy peligrosa, pero con un riesgo muy bajo, porque las posibilidades de exposición humana son también muy bajas.

Fases del proceso de evaluación de riesgo

La evaluación de riesgos es una actividad realizada por expertos, que consiste en recoger los datos científicos disponibles sobre un determinado compuesto químico, o mezcla de ellos, y evaluarlos respecto de su calidad y valor predictivo, para finalmente llegar a unas conclusiones sobre los riesgos que su exposición conlleva para la salud humana o el medio ambiente.

El proceso de evaluación debe comenzar con una etapa previa en la cual se decide la sustancia, o sustancias, que se van a estudiar, así como los aspectos tóxicos y los parámetros de toxicidad en los que se va a centrar el estudio. Esta selección es del todo indispensable, porque evaluar los riesgos relacionados con todos los compuestos químicos presentes en el medio ambiente resulta comple-

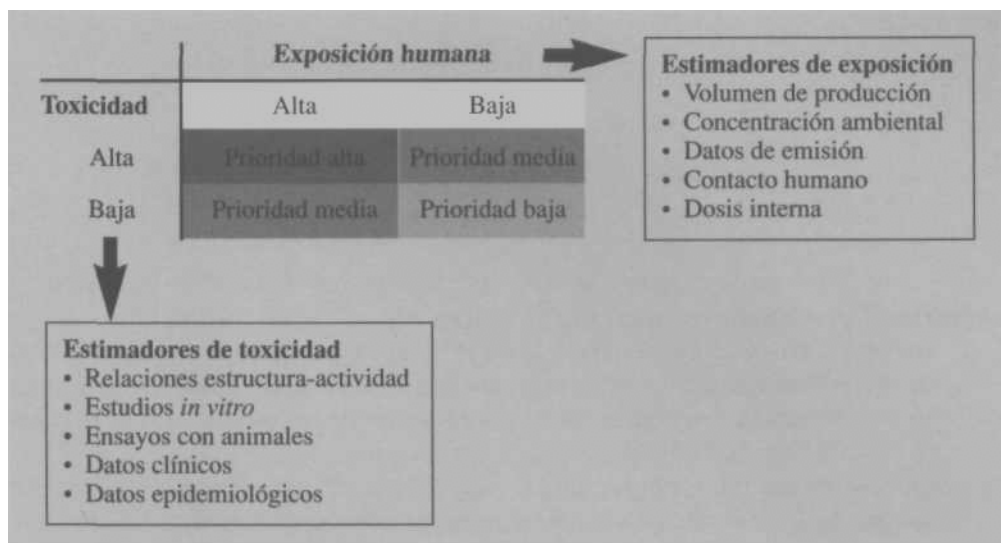


FIGURA 17.5. Esquema de los posibles factores que pueden incidir en la exposición a una sustancia y en su toxicidad.

tamente imposible de realizar. Esta etapa previa se podría definir como identificación del problema y se resuelve a instancias políticas de una manera pragmática. En la Figura 17.5 se muestra un esquema del tipo de factores que es necesario considerar para decidir un orden de prioridades ante los posibles problemas a estudiar. Además, hay que tener en cuenta la fuerte presión que la opinión pública puede ejercer sobre el poder político para que éste considere prioritario un determinado problema.

Teóricamente, el proceso de evaluación de riesgos continua con las fases siguientes:

1. *Identificación del peligro*: determinación de los efectos adversos que una sustancia química determinada puede causar.
2. *Evaluación de la exposición*: determinación de las concentraciones/dosis a las cuales las poblaciones humanas están expuestas.
3. *Evaluación de la dosis (concentración) - respuesta (efecto)*: determinación de la relación entre la dosis, o nivel de exposición a una sustancia, y la incidencia y severidad de los efectos resultantes.
4. *Caracterización del riesgo*: integración de todos los datos conseguidos en las etapas anteriores para estimar la incidencia y severidad de los efectos adversos que probablemente se pueden dar en una población debido a la exposición a una sustancia.

En la práctica, las distintas fases enumeradas no se realizan de una manera secuencial sino que los tres primeros pasos se van completando simultáneamen-

te a medida que se realizan experimentos de todo tipo, en animales, clínicos, epidemiológicos, *in vitro*, etc. La última fase, definida como caracterización del riesgo, consiste en la interpretación global de todos los resultados conseguidos. En función de los datos disponibles, fundamentalmente a expensas de que se tengan buenos datos humanos o no, se podrá hacer una verdadera evaluación de riesgos o, simplemente, tomar unas medidas preventivas de minimización del mismo.

Identificación del peligro

En esta fase se recogen y se analizan todos los datos de toxicidad disponibles sobre el producto. Se trata de precisar si el compuesto en estudio es un carcinógeno genotóxico, un agente nefrotóxico, un teratógeno, etc.; el número y calidad de los estudios toxicológicos depende en gran medida de la naturaleza de dicho producto químico. En el caso de los medicamentos y de los plaguicidas por ejemplo, que requieren una evaluación toxicológica completa para el registro, generalmente se dispone de un gran número de estudios; sin embargo, con otros tipos de sustancias químicas se suelen realizar muy pocos ensayos toxicológicos y normalmente muy simples. También depende del tiempo que el producto químico lleve comercializado o de su presencia en el medio ambiente, ya que cuanto mayor sea éste mayor será la probabilidad de que existan datos en humanos, que son los que tienen un mayor peso para hacer la evaluación de riesgos.

Los estudios que proporcionan información sobre la toxicidad de una sustancia química son de varios tipos: estudios de relación estructura-actividad, estudios *in vitro*, estudios en animales y estudios en humanos (Tabla 17.1). En estos últimos se pueden realizar distintos tipos de observaciones, bien sea de forma casual o bien en el transcurso de ensayos clínicos o epidemiológicos.

Casos aislados. Se definen unos síntomas que se asocian con la exposición a un compuesto químico. Rara vez se puede demostrar la relación causa-efecto. Se puede establecer cuando han sido descritos muchos casos con unos efectos muy pronunciados. Así se puso de manifiesto la teratogenicidad de la talidomida.

Ensayos clínicos a doble ciego. Se administra a un grupo de pacientes un medicamento a una dosis conocida y se miden varios parámetros bien definidos. Se trata, por lo tanto, de un estudio muy controlado y de altísima calidad, pero que sólo pueden ser realizados con medicamentos.

Estudios epidemiológicos. Sirven para identificar posibles factores de riesgo en la etiología de las enfermedades y establecer una relación causal entre dichos factores y el desarrollo de la enfermedad. Pueden responder a diversos tipos:

- *Prospectivos {de cohortes}:* estudian grupos de individuos elegidos en función de su exposición al agente en estudio y se realiza la monitorización de dichos individuos para ver si desarrollan la enfermedad. Por tanto, en un principio se parte de individuos supuestamente sanos.

Tabla 17.1. **Tipos de estudios para investigar el potencial tóxico de un compuesto**

Ensayos en animales

agudos, crónicos, teratogénesis, mutagénesis, carcinogénesis, etc.

Estudios *in vitro*

QSAR

Estudios clínicos

Estudios epidemiológicos

prospectivos, retrospectivos, transversales

- Retrospectivos *de (casos y controles)*: Los individuos para el estudio se seleccionan en función de su enfermedad y se eligen otros controles pareados libres de enfermedad. Se comparan las historias de exposición en ambos grupos para determinar los factores consistentes.
- Transversales: supervisan grupos poblacionales con objeto de identificar factores de riesgo (exposición) y enfermedad, pero no son útiles para establecer relaciones causales.

Un principio de la epidemiología establece que una relación causal no puede ser estatuida por un solo estudio epidemiológico. En este caso, solamente es posible sugerir una hipótesis que deberá ser comprobada con estudios posteriores.

Evaluación de la exposición

Los estudios de evaluación de la exposición tratan de estimar el contacto de la población con el compuesto de interés; es decir, averiguar el origen del compuesto, la vía de contacto, la magnitud y la duración de dicho contacto. Evidentemente, se trata de una etapa clave en el proceso de evaluación del riesgo, ya que si no existe exposición no existe peligro y, por ello, los posibles efectos tóxicos no pueden producirse. Por el contrario, la probabilidad de que haya consecuencias tóxicas, y por lo tanto el riesgo, será superior cuanto mayor sea la exposición.

La cuantificación de la exposición es extraordinariamente difícil y está considerada como el aspecto que genera un mayor grado de incertidumbre dentro del proceso global de la evaluación del riesgo.

En primer lugar, dentro del *escenario del riesgo* es necesario determinar cuáles son las *vías de exposición* que tienen relevancia (oral, dérmica, inhalación), durante cuanto *tiempo* tiene lugar la exposición (horas, días, años) y con *qué frecuencia* se producen (una vez al día, cada 2 h etc.). Conviene distinguir entre tres conceptos que en algunas ocasiones suelen ser utilizados de manera equívoca para designar la exposición: concentración, exposición y dosis.

En el ámbito de la evaluación de riesgos, tales conceptos designan lo siguiente:

- *Concentración*: cantidad de sustancia presente en un determinado medio como, por ejemplo cantidad de monóxido de carbono por m³ de aire.
- *Exposición*: cantidad de sustancia que está en contacto con la persona y se determina multiplicando la concentración por el tiempo, por ejemplo 100 ug/m³/hora.
- *Dosis*: cantidad de sustancia que penetra en el organismo de la persona expuesta y se calcula multiplicando la exposición por un factor que tenga en cuenta la vía de exposición y parámetros toxicocinéticos.

Como en la evaluación de riesgos se consideran poblaciones (de trabajadores, de niños, de mujeres embarazadas etc.), es necesario realizar estimaciones medias de exposición. Los datos se obtienen por distintos procedimientos:

- A través de cuestionarios: procedimiento muy frecuente cuando se trata de compuestos presentes en los alimentos.
- Mediante valoraciones directas de concentraciones: para ellas existen equipos especiales de medida, muy utilizados en el caso de contaminantes ambientales o presentes en el medio laboral.
- A partir de muestras biológicas (orina, sangre, saliva, pelo, etc.), que constituyen bioindicadores de exposición.

Los métodos escogidos para medir la exposición dependen de diversos factores: conocimientos previos de la relación dosis-respuesta, recursos técnicos, recursos económicos, limitaciones de tiempo, nivel de incertidumbre admisible etc.

Existen distintos procedimientos para calcular la exposición media de una población específica a un determinado agente. Algunos de ellos son el cálculo de la dosis diaria promediada durante un periodo definido de tiempo de exposición (ADD) y de la dosis diaria promediada durante toda la vida (LADD). Este último calculo se utiliza mucho en los estudios de evaluación de riesgos aplicados al cáncer.

$$\begin{aligned}
 \text{ADD} &= \frac{\text{Concentración del compuesto en el medio} \cdot \text{Tasa de absorción} \cdot \text{Duración de la exposición}}{\text{Peso corporal} \cdot \text{Tiempo de exposición}} \\
 \text{LADD} &= \frac{\text{Concentración del compuesto en el medio} \cdot \text{Tasa de absorción} \cdot \text{Duración de la exposición}}{\text{Peso corporal} \cdot 75 \text{ años}}
 \end{aligned}$$

Evaluación de la dosis - respuesta

Para una verdadera evaluación del riesgo los datos más relevantes son aquellos que se han obtenido en estudios humanos. No obstante, como este tipo de

estudios suelen ser bastante limitados, se utilizan también los datos obtenidos en los ensayos con animales. Ello exige realizar una primera *extrapolación interespecífica*, para lo que sería necesario conocer si los procesos de absorción, distribución y metabolismo entre las especies animales y la especie humana son semejantes.

Por otra parte, en la evaluación de riesgos interesan, por lo general, las exposiciones a concentraciones muy bajas de compuesto, normalmente muy inferiores al rango de concentraciones que dan lugar a respuestas observables experimentalmente en los ensayos con animales. Por lo tanto, es necesario realizar una segunda *extrapolación a dosis bajas*: de las curvas dosis-respuesta obtenidas en los ensayos con animales a altas dosis se extrapola a una hipotética curva dosis-respuesta a dosis bajas (Figura 17.6).

Teóricamente, existen tres tipos de curvas dosis-respuesta: lineal sin umbral, lineal con umbral y hormética. Conocer la forma de la curva es fundamental para poder realizar extrapolaciones a dosis bajas, porque en función de ella los resultados serán diferentes; a dosis bajas podemos tener diversas posibilidades: un riesgo proporcional a la dosis, un riesgo no proporcional a la dosis, ningún riesgo o incluso un efecto beneficioso. Generalmente, con los datos en animales es difícil saber con exactitud ante qué tipo de curva nos encontramos por la carencia de datos a dosis bajas. Por consiguiente resulta evidente la dificultad de este tipo de extrapolaciones. Existen diversos modelos estadísticos para realizar estimaciones de la curva dosis-respuesta, en los cuales se asumen una serie de principios, y se obtienen unas curvas dosis-respuesta hipotéticas, que posterior-

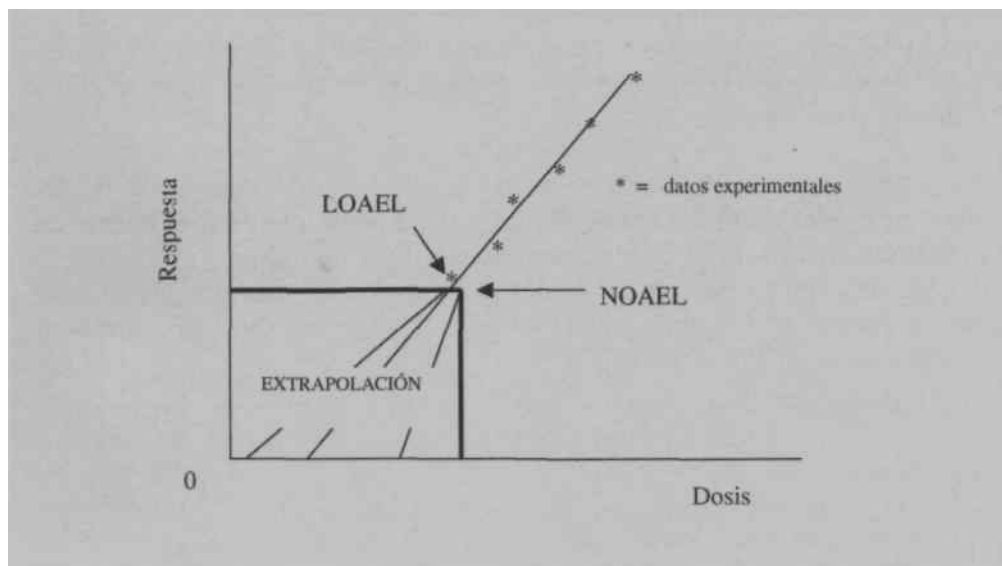


Figura 17.6. *Representación gráfica de la extrapolación a dosis bajas en las curvas dosis-respuesta.*

mente habrán de cotejarse con los datos experimentales que progresivamente se vayan obteniendo, y decidir cual es el modelo que se ajusta mejor.

Por último, al hacer evaluación de riesgo conviene también identificar aquellas poblaciones constituidas por individuos más sensibles o con un umbral de toxicidad inferior, para los cuales no servirán las estimaciones de riesgo realizadas con los datos de la población normal.

Caracterización del riesgo: utilización de los NOAEL, método de la dosis benchmark

Es la fase en la cual se integran los datos de identificación de peligro, evaluación de la exposición y evaluación de la dosis-respuesta para cuantificar el riesgo. Ya se ha dicho que para cuantificar verdaderamente el riesgo, es decir, para predecir la ocurrencia de efectos tóxicos en el ser humano, se necesita disponer de buenos datos en dicha especie. Cuanto mayor sea la cantidad de datos clínicos y epidemiológicos (más estudios y con poblaciones más numerosas), mejores serán las predicciones que se puedan hacer. En los últimos años se han desarrollado herramientas estadísticas muy potentes que permiten hacer ese tipo de predicciones e incluso cuantificar el grado de incertidumbre asociado a las mismas. Esta metodología es propia de la Epidemiología y Salud Pública y escapa de los objetivos de este libro.

Cuando únicamente se dispone de datos en animales, es imposible cuantificar el riesgo y se toman unas medidas preventivas de minimización del riesgo. En éste último caso, se trata de reconocer un patrón típico de efectos tóxicos del compuesto y valorar la relevancia de ese potencial tóxico en el hombre para, a continuación, tomar una serie de medidas administrativas, que pueden comprender desde una restricción de la exposición humana hasta la completa prohibición de la sustancia en cuestión.

El objetivo es suprimir o disminuir la exposición para evitar que ocurran efectos adversos en el ser humano. Generalmente, este tipo de medidas se toman teniendo en cuenta un único efecto tóxico y tiene poco interés si el agente en cuestión produce otros tipos de efectos tóxicos a dosis más altas.

Existen dos situaciones en las cuales la adopción de medidas preventivas contra el riesgo es aconsejable, ante la imposibilidad de realizar una evaluación de riesgos basada en datos humanos:

- a) La evaluación de productos químicos para los cuales es muy poco probable disponer de datos humanos, y sin embargo es deseable prevenir presuntos riesgos.
- b) La evaluación de algunos parámetros de toxicidad, como carcinogénesis o teratogénesis, que requieren muchos años para disponer de datos humanos.

En la caracterización del riesgo, según la estrategia que se ha denominado de minimización del riesgo, se utilizan una serie de herramientas como los

NOAEL, LOAEL, márgenes de seguridad, factores de seguridad, etc. para hacer cálculos de riesgo.

Concepto de NOAEL

Cuando se analizan los resultados para distintos tipos de efectos tóxicos, se pueden obtener curvas dosis-respuesta diferentes: con distinta pendiente, distinto efecto máximo y distinto umbral de toxicidad. Respecto del efecto máximo se pueden tener dos tipos de manifestaciones: *a)* a medida que aumenta la dosis aumenta la magnitud del efecto en un determinado individuo u órgano (respuesta gradual); lo que se mide en este caso es la intensidad del efecto *b)* a medida que aumenta la dosis aumenta el número de individuos afectados (respuesta cuántica); lo que se mide es la incidencia.

Hay que tener en cuenta que las curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de los datos experimentales no son sino estimaciones, y que por tanto, cada punto de la curva tendrá unos intervalos de confianza. Cuanto más estrechos sean esos intervalos de confianza menor incertidumbre estará asociada a dicha curva.

En Toxicología, la dosis que interesa conocer es la dosis mínima que produce un efecto adverso (LOAEL) o mejor incluso, la dosis que no produce ningún efecto adverso detectable (NOAEL). Estas dosis se refieren a un experimento concreto. Si se repite el experimento probablemente no se obtengan los mismos valores de NOAEL o LOAEL. La exactitud de tales datos depende de una serie de factores: separación entre las dosis, pendiente de la curva, número de individuos por grupo. Dependiendo de estos factores los intervalos de confianza de los valores NOAEL y LOAEL serán también distintos. En conclusión, las dosis NOAEL y LOAEL no son dosis muy bien definidas, aunque se pueden utilizar de una manera pragmática para caracterizar el riesgo.

Utilización de los NOAEL en los cálculos de riesgo

Los NOAEL se pueden utilizar como base para ciertos cálculos de evaluación de riesgos como las dosis de referencia (DRf) y las concentraciones de referencia (CRf), así como las ingestas diarias admisibles (IDAs). Las dosis y concentraciones de referencia son estimaciones de la exposición diaria a un agente que se asume no tiene ningún efecto adverso en la salud de la población humana. Los valores IDA son utilizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para pesticidas y aditivos alimentarios para definir la ingesta diaria de un compuesto químico, que durante una vida entera no representa un riesgo apreciable, sobre la base de los datos conocidos en ese momento. Las dosis de referencia y los IDAs se calculan a partir de los NOAEL dividiendo por unos factores de seguridad, también llamados factores de incertidumbre, y unos factores modificadores, no aplicables en todos los casos:

IDA = NOAEL/factores de seguridad • factores modificadores

DRf = NOAEL/factores de seguridad • factores modificadores

Los *factores de seguridad* se utilizan para salvar las posibles fuentes de variación no controladas, que dan lugar a incertidumbres en la caracterización del riesgo; por eso en la terminología utilizada por la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos se denominan *factores de incertidumbre*. Los factores de seguridad tienen un valor entero de 0 a 10; por defecto se aplica un valor de 10. Se puede emplear un número variable de ellos con distintos fines: a) la extrapolación de los datos experimentales en animales al hombre b) la existencia de un grupo poblacional más sensible c) para extrapolar los resultados obtenidos en estudios de duración corta a una situación de exposición crónica d) si se desconoce el NOAEL y sólo se dispone del LOAEL e) en general para paliar cualquier tipo de limitación experimental.

Se pueden aplicar otros *factores modificadores* en aquellas situaciones en las que los conocimientos sobre el mecanismo de acción y toxicocinética del compuesto o relevancia de la respuesta en los animales para la salud humana, permiten hacer ciertos ajustes.

Los valores NOAEL se pueden utilizar también para otros cálculos de riesgo como son la determinación del *margen de exposición* (MOE) o del *margen de seguridad* (MOS), en los cuales los NOAEL obtenidos en animales y expresados en mg/kg/día se comparan con los niveles de exposición en el hombre. Por ejemplo, si la exposición tiene lugar a través del agua de bebida y el agua contiene 1 ppm del xenobiótico en cuestión, la exposición sería de 1mg/litro de agua. Suponiendo un consumo diario de agua de 2 litros y un peso medio femenino de 50 kg, la exposición diaria sería de 0,04 mg/kg/día. Si el NOAEL de neurotoxicidad por ejemplo es de 200 mg/kg/día, el margen de exposición sería de 5000.

Margen de exposición = NOAEL en animales / exposición humana

Margen de exposición = (200 mg/kg/día) / (0,04 mg/kg/día) = 5000

Este margen tan amplio se puede considerar seguro desde el punto de vista de la salud pública. Valores bajos indican que los niveles de exposición en el hombre están próximos a los NOAEL en animales. Como no se incluye ningún factor de seguridad en este cálculo, valores por debajo de 100 constituyen alertas para que las agencias reguladoras consideren conveniente una nueva evaluación.

Método de la dosis *benchmark*

Debido a las numerosas críticas que ha recibido la metodología descrita basada en los NOAEL, se ha desarrollado un procedimiento alternativo denominado método de la dosis *benchmark*, según el cual los cálculos de riesgo, es decir la obtención de los valores DRf, se realizan a partir de dicha dosis «benchmark» que en castellano equivale a dosis de partida o de referencia.

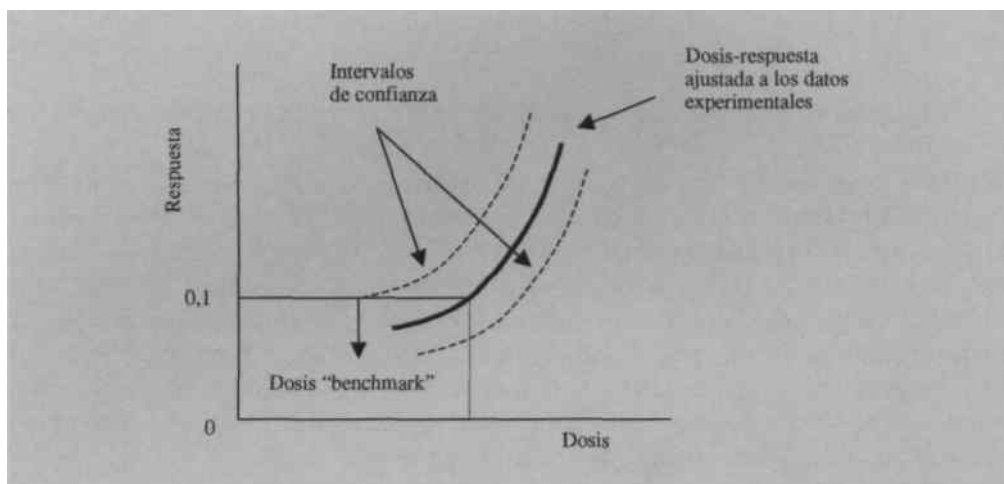


Figura 17.7. *Representación gráfica del método de la dosis benchmark.*

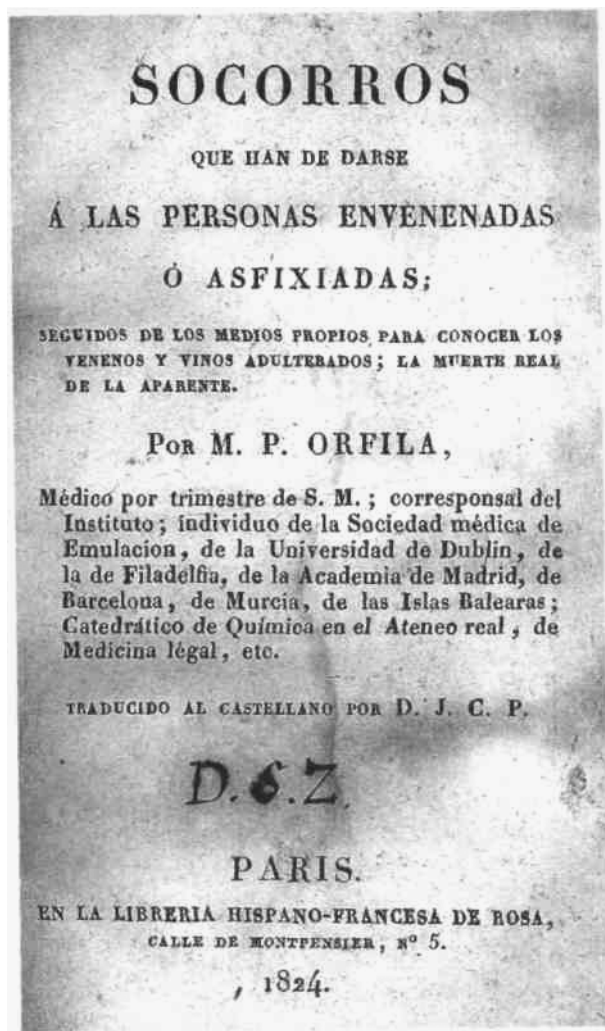
Según este método, en primer lugar se ajustan los datos experimentales a una curva dosis-respuesta con unos determinados intervalos de confianza. Este es un procedimiento muy laborioso que exige unas herramientas informáticas considerables. Se trata de encontrar el modelo de curva dosis-respuesta, perfectamente caracterizada desde el punto de vista matemático, que mejor se ajusta a los datos disponibles. De esta manera, a diferencia de lo que ocurre con los NOAEL se obtiene una curva dosis respuesta teniendo en cuenta todos o la mayoría de los resultados experimentales. Además se cuantifica la variabilidad asociada a dicha curva dosis-respuesta mediante el cálculo de los correspondientes intervalos de confianza (Fig. 17.7).

A continuación se define un nivel de respuesta específico (nivel de respuesta «benchmark») incluido en el rango de respuestas de la curva, que suele ser el 10%. Por último, se calcula para ese nivel de respuesta la dosis que se correspondería con el límite de confianza inferior y esa es la dosis *benchmark*. Una vez obtenida esta dosis se utilizaría de la misma manera que los NOAEL para los cálculos de las DRf.

Entre las ventajas de este método se pueden citar las siguientes: *a)* la introducción de una medida de variabilidad, como son los intervalos de confianza en la curva dosis-respuesta, la cual a su vez se obtiene considerando muchos experimentos y no uno sólo, *b)* el cálculo de la dosis *benchmark* en el rango de respuestas observables experimentalmente, sin necesidad de realizar una extrapolación a dosis más bajas.

PARTE V

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA



Orfila, M.J.B.

Editado en París, 1824.

Ejemplar de la Biblioteca de la Universidad de Navarra.

Bibliografía de consulta

- Anderson D, Conning DM. *Experimental toxicology: The basic issues*. 2.^a ed. London : Royal Society of Chemistry, 1993.
- Atterwill CK, Steele CE. *In vitro methods in toxicology*. Cambridge: University Press, 1987.
- Ballantyne B, Marrs T, Turner P. *General and applied toxicology*. New York: Stockton, 1993.
- Baskin SI, Salem H. *Oxidants, antioxidants and free radicals*. London: Taylor & Francis, 1996.
- Bénichou C. *Adverse drug reactions: A practical guide to diagnosis and management*. Chichester: Wiley & Sons, 1995.
- Browning E. *Ethel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvents*. 2.^a ed. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- Brusick D. *Principles of genetic toxicology*. 2.^a ed. New York: Plenum Press, 1987.
- Castell JV, Gómez-Lechón MJ. *In vitro alternatives to animal pharmaco-toxicology*. Madrid: Farmaindustria.1992.
- Chengelis CP, Holson JF, Gad SC. *Regulatory toxicology*. New York: Raven Press, 1995.
- De la Fuente L y García JF. *Toxicología y seguridad química: Evaluación y gestión del riesgo químico*. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales, Madrid: Comunidad de Madrid, 1995.
- Derelanko MJ & Hollinger MA. *CRC Handbook of toxicology*. Boca Ratón: CRC Press, 1995.
- Duffus JH, Worth GJ. *Fundamental toxicology for chemists*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1996.
- Écobichon DJ. *The basis of toxicity testing*. 2.^a ed. Boca Ratón: CRC Press, 1997.
- Ellenhorn MJ. *Ellenhorn's Medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning*. 2.^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.
- Evans GO. *Animal clinical chemistry: a primer for toxicologists*. London: Taylor & Francis, 1996.

- Flanagan RJ. *Basic analytical toxicology*. Geneva: World Health Organization, 1995.
- Gad SC, Chengelis CP. *Acute toxicology testing*. 2.^a ed. San Diego: Academic Press, 1998.
- Gakku CL, Morinovich M, Goldberg A. *Modulation of cellular responses in toxicity*. Berlín: Springer, 1995.
- Gad SC, Chengelis CP. *Animal models in toxicology*. New York: Dekker, 1992.
- Gad SC. *Statistics and experimental design for toxicologists*. 3.^a ed. Boca Ratón: CRC Press, 1999.
- Gossel TA, Bricker JD. *Principles of clinical toxicology*. 3.^a ed. New York: Raven Press, 1994.
- Goyer RA, Klaassen CD, Waalkers MR. *Metal toxicology*. San Diego: Academic Press, 1995.
- Haschek WM, Riysseaux CG. *Fundamentals of toxicologic pathology*. San Diego: Academic Press, 1991.
- Hathway DE. *Molecular aspects of toxicology*. London: Royal Society of Chemistry, 1984.
- Hayes AW. *Principles and methods of toxicology*. 3.^a ed. New York: Raven Press, 1994.
- Hess R, Waechter F. *Toxicology of industrial compounds*. London: Taylor & Francis, 1995.
- Hester RE, Harrison RM. *Risk assessment and risk management*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998.
- Hester RE, Harrison RM. *Endocrine disrupting chemicals*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999.
- Kent C. *Basics of toxicology*. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- Klaassen CD. *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. 5.^a ed. New York: McGraw-Hill, 1996.
- Krewski D, Franklin C. *Statistics in toxicology*. New York: Gordon and Breach Science, 1991.
- Lauwerys RR. *Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales*. Barcelona: Masson, 1994.
- Loomis TA, Hayes WA. *Loomis's Essentials of toxicology*. 4.^a ed. San Diego: Academic Press, 1996.
- Marquardt H, Schäfer SG, McClellan RO, Welsch F. *Toxicology*. San Diego: Academic Press, 1999.
- Massaro EJ. *Handbook of human toxicology*. Boca Ratón: CRC Press, 1997.
- Mencia E, Mayero LM. *Manual de toxicología básica*. Madrid. Ed. Díaz de Santos, 2000.
- Munne P. *Bases del tratamiento de las intoxicaciones agudas*. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve, 1988.
- Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA. *Toxicology. Principles and applications*. Boca Ratón: CRC Press, 1996.
- Ottoboni MA. *The dose makes the poison: a plain-language guide to toxicology*. 2.^a ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.
- Patty FA. *Patty's Industrial hygiene and Toxicology*. 5.^a ed. New York: Wiley & Sons, 2000.
- Plunkett ER. *Handbook of industrial toxicology*. 3.^a ed. New York: Chemical Publishing, 1987.

- Repetto M. *Toxicología fundamental*. 3.^a ed. Madrid: Díaz de Santos, 1997.
- Repetto M. *Toxicología avanzada*. Madrid: Díaz de Santos, 1995.
- Schardein JL. *Chemically induced birth defects*. 3.^a ed. New York: Marcel Dekker, 2000.
- Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ. *Comprehensive toxicology*. Oxford: Pergamon Press, 1997.
- Snell K, Mullock B. *Biochemical toxicology: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1987.
- Stahr HM. *Analytical methods in toxicology*. New York: Wiley & Sons, 1991.
- Sullivan JB, Krieger GR. *Hazardous materials toxicology: Clinical principles of environmental health*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992.
- Timbrell J. *Principles of biochemical toxicology*. 3.^a ed. London: Taylor & Francis, 2000.
- Timbrell JA. *Introduction to toxicology*. London: Taylor & Francis, 1989.
- Venitt S, Parry JM. *Mutagenicity testing: a practical approach*. Oxford : IRL Press, 1984.
- Yang RSH. *Toxicology of chemical mixtures: Case studies, mechanism and novel approaches*. San Diego: Academic Press, 1994.
- Zurlo J, Rudacille D, Goldberg AM. *Animals and alternatives in testing*. New York: Mary Anne Liebert, Inc. Publishers, 1994.

