

33

Directora del capítulo
Ellen K. Silbergeld

Sumario

Introducción	<i>Ellen K. Silbergeld</i>	33.2
<hr/>		
PRINCIPIOS GENERALES DE LA TOXICOLOGIA		
Definiciones y conceptos	<i>Bo Holmberg, Johan Höglberg</i> <i>y Gunnar Johanson</i>	33.3
Toxicocinética	<i>Dušan Djurić</i>	33.8
Organo diana y efectos críticos	<i>Marek Jakubowski</i>	33.16
Efectos de la edad, el sexo y otros factores	<i>Spomenka Telišman</i>	33.18
Determinantes genéticos de la respuesta tóxica	<i>Daniel W. Nebert y Ross A. McKinnon</i>	33.21
<hr/>		
MECANISMOS DE LA TOXICIDAD		
Introducción y conceptos	<i>Philip G. Watanabe</i>	33.29
Lesión celular y muerte celular	<i>Benjamin F. Trump</i> <i>e Irene K. Berezsky</i>	33.33
Toxicología genética	<i>R. Rita Misra</i> <i>y Michael P. Waalkes</i>	33.35
Inmunotoxicología	<i>Joseph G. Vos y Henk van Loveren</i>	33.39
Toxicología de órganos diana	<i>Ellen K. Silbergeld</i>	33.44

METODOS DE ENSAYO EN TOXICOLOGIA

Biomarcadores	<i>Philippe Grandjean</i>	33.44
Evaluación de la toxicidad genética	<i>David M. DeMarini</i> <i>y James Huff</i>	33.49
Ensayos de toxicidad <i>in vitro</i>	<i>Joanne Zurlo</i>	33.51
Relaciones estructura-actividad	<i>Ellen K. Silbergeld</i>	33.55
<hr/>		
TOXICOLOGIA REGULADORA		
La toxicología en la regulación de la salud y la seguridad	<i>Ellen K. Silbergeld</i>	33.57
Principios de la identificación de los peligros: el enfoque japonés	<i>Masayuki Ikeda</i>	33.57
El enfoque estadounidense de la evaluación del riesgo de los tóxicos para la reproducción y agentes neurotóxicos	<i>Ellen K. Silbergeld</i>	33.60
Enfoques en la identificación de los peligros: la IARC	<i>Harri Vainio y Julian Wilbourn</i>	33.65
Apéndice: evaluaciones globales de carcinogenicidad para los humanos: monografías de la IARC, volúmenes 1-69 (836)	33.69
Evaluación del riesgo de carcinogenicidad: otros enfoques	<i>Cees A. van der Heijden</i>	33.76

● INTRODUCCION

Ellen K. Silbergeld

La toxicología es el estudio de los venenos o, en una definición más precisa, la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición a agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones. En ese sentido, la toxicología es tributaria, en materia de información, diseños de la investigación y métodos, de la mayoría de las ciencias biológicas básicas y disciplinas médicas, de la epidemiología y de determinadas esferas de la química y la física. La toxicología abarca desde estudios de investigación básica sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos hasta la elaboración e interpretación de pruebas normalizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes. Aporta una importante información tanto a la medicina como a la epidemiología de cara a comprender la etiología de las enfermedades, así como sobre la plausibilidad de las asociaciones que se observan entre éstas y las exposiciones, incluidas las exposiciones profesionales. Cabe dividir la toxicología en disciplinas normalizadas, como la toxicología clínica, la forense, la de investigación y la reguladora; otra clasificación hace referencia a los sistemas o procesos orgánicos que se ven afectados, y tenemos entonces la immunotoxicología o la toxicología genética; puede presentarse también desde el punto de vista de sus funciones, y entonces se habla de investigación, realización de ensayos y evaluación de los riesgos.

La presentación completa de la toxicología en esta *Enclopedia* no es una tarea fácil. El presente capítulo no contiene un compendio de información sobre la toxicología o sobre los efectos adversos de determinados agentes concretos. Esta última información es más fácil obtenerla en las bases de datos que se están actualizando continuamente y a las que se hace referencia en la última sección de este capítulo. Tampoco se pretende situar la toxicología en el contexto de sus subdisciplinas específicas, como la toxicología forense. Se ha pretendido más bien ofrecer una información que sea de interés para todos los tipos de actividades toxicológicas y para la utilización de la toxicología en diversas especialidades y esferas de la medicina. Los temas que se tratan en este capítulo se han enfocado de una manera esencialmente práctica y con miras a integrarlos en los fines generales de la *Enclopedia* en su conjunto. Al elegir los temas se ha procurado asimismo facilitar las referencias cruzadas dentro de la obra.

En la sociedad moderna, la toxicología es ya un elemento importante de la salud ambiental y de la salud en el trabajo. Ello es así porque muchas organizaciones, tanto gubernamentales como no gubernamentales, utilizan la información toxicológica para evaluar y regular los peligros presentes tanto en el lugar de trabajo como en el medio ambiente general. La toxicología es un componente crucial de las estrategias de prevención, pues proporciona información sobre peligros potenciales en los casos en que no hay una exposición humana amplia. Los métodos de la toxicología son asimismo muy utilizados por la industria en el desarrollo de productos, pues permiten obtener una información valiosa para el diseño de determinadas moléculas o formulaciones.

El capítulo se inicia con cinco artículos sobre los principios generales de la toxicología, principios que es importante tener en cuenta al abordar la mayoría de los temas de esta disciplina. Los primeros principios generales se refieren a la comprensión de las relaciones entre la exposición externa y la dosis interna. En la terminología moderna, con “exposición” se hace referencia a las concentraciones o cantidad de una sustancia con que están en contacto los individuos o las poblaciones –las cantidades presentes en un determinado volumen de aire o de agua,

o en una determinada masa de suelo. El término “dosis” se refiere a la concentración o cantidad de una sustancia que hay en el interior de una persona u organismo expuesto. En el ámbito de la salud laboral, las normas y directrices suelen expresarse en términos de exposición, o de concentraciones límite permisibles en situaciones concretas, como por ejemplo en el aire del lugar de trabajo. Esos límites de exposición se basan en hipótesis o informaciones sobre la relación entre la exposición y la dosis; no obstante, es frecuente que no se pueda obtener información sobre la dosis interna. Así, en muchos estudios sobre salud laboral, sólo cabe establecer asociaciones entre la exposición y la respuesta o efecto. En algunos casos se han establecido normas basadas en la dosis (por ejemplo, niveles permisibles de plomo en sangre o de mercurio en orina). Aunque estas medidas presentan una correlación más directa con la toxicidad, sigue siendo no obstante necesario, a efectos de controlar los riesgos, calcular retrospectivamente los niveles de exposición asociados con esos efectos.

El siguiente artículo trata de los factores y hechos que determinan las relaciones entre la exposición, la dosis y la respuesta. Los primeros factores tienen que ver con la captación, la absorción y la distribución —los procesos que determinan el transporte efectivo de las sustancias desde el medio externo hasta el cuerpo, por vías de entrada como la piel, los pulmones o el aparato digestivo. Esos procesos se sitúan en la interfase entre los seres humanos y su medio ambiente. En el caso de los segundos factores, los del metabolismo, se trata de comprender la forma en que el cuerpo hace frente a las sustancias que ha absorbido. Algunas sustancias se transforman mediante procesos metabólicos de la célula, que pueden incrementar o reducir su actividad biológica.

Para mejorar la interpretación de los datos toxicológicos se han elaborado los conceptos de órgano diana y efecto crítico. Dependiendo de la dosis, la duración y la ruta de exposición, y también de factores del huésped como la edad, muchos agentes tóxicos pueden inducir diversos efectos en los órganos y organismos. Una de las misiones principales de la toxicología es identificar el efecto o grupos de efectos importantes con miras a prevenir enfermedades irreversibles o debilitadoras. Una parte destacada de esa tarea es la identificación del órgano que se ve afectado en primer lugar o que se ve más afectado por un agente tóxico: es lo que se denomina el “órgano diana”. Una vez en el órgano diana es necesario identificar el hecho o hechos importantes que indican la intoxicación o daño, a fin de comprobar que el órgano se ha visto afectado más allá de su variabilidad normal. Es lo que se denomina el “efecto crítico”; puede ser el primer hecho en una sucesión de fases fisiopatológicas (como la excreción de proteínas de bajo peso molecular como efecto crítico en la toxicidad renal), o puede ser el efecto primero y potencialmente irreversible de un proceso patológico (como la formación de un aducto de ADN en la carcinogénesis). Estos conceptos son importantes en el ámbito de la salud en el trabajo porque definen los tipos de toxicidad y la enfermedad clínica asociados con determinadas exposiciones, y en la mayoría de los casos la reducción de la exposición está orientada a prevenir no tanto cualquier tipo de efecto en cualquier órgano cuanto los efectos críticos en los órganos diana.

En los dos artículos siguientes se estudian importantes factores del huésped que afectan a muchos tipos de respuestas a muchos tipos de agentes tóxicos. Se trata de los determinantes genéticos, o factores heredados de susceptibilidad/resistencia, y de la edad, el sexo y otros factores como la dieta o la existencia simultánea de una enfermedad infecciosa. Esos factores pueden afectar también a la exposición y la dosis modificando la captación, la absorción, la distribución y el metabolismo. Como muchos de estos factores presentan variaciones en las poblaciones de

trabajadores de todo el mundo, es esencial que los especialistas en salud en el trabajo y los encargados de formular las políticas comprendan la forma en que esos factores pueden contribuir a la variabilidad de las respuestas entre unas poblaciones y otras y entre individuos de una misma población. Estas consideraciones son especialmente importantes en las sociedades con poblaciones heterogéneas. La variabilidad de las poblaciones humanas es un elemento que hay que tener en cuenta al evaluar los riesgos de las exposiciones profesionales y al extraer conclusiones racionales del estudio de organismos no humanos en las investigaciones o ensayos toxicológicos.

En la sección siguiente se ofrecen dos panoramas generales de la toxicología desde el punto de vista de sus mecanismos. Desde la óptica mecanicista, los toxicólogos modernos estiman que todos los efectos tóxicos se manifiestan en primer lugar a nivel celular; por consiguiente, las respuestas celulares son las primeras indicaciones del contacto del cuerpo con un agente tóxico. Se considera además que esas respuestas comprenden toda una serie de hechos, desde la lesión hasta la muerte. Se denomina lesión celular a unos procesos específicos que utilizan las células, que es la unidad mínima de organización biológica dentro de los órganos, para responder al problema que se les plantea. Entre esas respuestas figuran cambios en la función de procesos celulares, como los de la membrana y su capacidad de captar, liberar o excluir sustancias, la síntesis dirigida de proteínas a partir de aminoácidos y el recambio de componentes celulares. Esas respuestas pueden ser comunes a todas las células lesionadas, o pueden ser específicas de determinados tipos de células pertenecientes a determinados sistemas orgánicos. La muerte celular es la destrucción de células de un sistema orgánico como consecuencia de una lesión celular irreversible o no compensada. Los agentes tóxicos pueden causar la muerte celular como un proceso agudo que se revela de varias maneras, como perjudicando la transferencia de oxígeno, pero otras veces la muerte celular es consecuencia de una intoxicación crónica. Después de la muerte celular puede producirse una sustitución en algunos sistemas orgánicos pero no en todos, aunque en algunas circunstancias la proliferación de células inducida por la muerte celular puede considerarse una respuesta tóxica. Aun cuando no hay muerte celular, las lesiones celulares reiteradas pueden inducir una tensión en los órganos que pone en peligro su función y que afecta a su descendencia.

Se examinan después en el capítulo varios temas más específicos, que se agrupan en las categorías siguientes: mecanismos, métodos de ensayo, regulación y evaluación del riesgo. En la mayoría de los artículos sobre los mecanismos se analizan más los sistemas diana que los órganos diana. Esto refleja la práctica habitual de la toxicología y la medicina modernas, que no estudian tanto órganos aislados como sistemas orgánicos. Así, por ejemplo, la sección de toxicología genética no se centra en los efectos tóxicos de los agentes sobre un órgano específico, sino más bien en el material genético como diana de la acción tóxica.

Análogamente, en el artículo sobre inmunotoxicología se examinan los diversos órganos y células del sistema inmunitario como dianas de los agentes tóxicos. En los artículos sobre los métodos de la toxicología se ha adoptado un punto de vista eminentemente práctico: se describen los métodos de identificación de los peligros que se utilizan en la actualidad en muchos países, es decir, los métodos para obtener información relacionada con las propiedades biológicas de los agentes.

Figuran a continuación cinco artículos sobre la aplicación de la toxicología en el establecimiento de normas y la formulación de políticas, desde la identificación de los peligros hasta la evaluación de los riesgos. Se presenta la práctica habitual en varios países, así como la de la IARC. En estos artículos el lector entenderá cómo se integra la información obtenida en los ensayos toxicológicos con inferencias básicas y mecanicistas para obtener la información cuantitativa que se utiliza para establecer los niveles de exposición o adoptar otras medidas de control de los peligros en el lugar de trabajo y en el medio ambiente general.

El lector interesado en información detallada sobre determinados agentes tóxicos y sus exposiciones puede consultar el resumen de las bases de datos toxicológicos existentes que figura en el Volumen III (véase "Bases de datos de toxicología" en el capítulo *Manejo seguro de las sustancias químicas*, que contiene información sobre muchas de estas bases de datos, sus fuentes de información, métodos de evaluación e interpretación y formas de acceso). Junto con la *Enciclopedia*, esas bases de datos ofrecen a los especialistas en salud en el trabajo, a los trabajadores y a las empresas la posibilidad de obtener y utilizar información toxicológica actualizada, así como la evaluación de los agentes tóxicos efectuada por organismos nacionales e internacionales.

En este capítulo se estudian sobre todo los aspectos de la toxicología que tienen que ver con la salud y la seguridad en el trabajo. Por esa razón no se abordan específicamente las subdisciplinas de la toxicología clínica y la toxicología forense. En esas subdisciplinas, y también en el campo de la salud ambiental, se utilizan muchos de los mismos principios y enfoques que aquí se describen. Esos principios y enfoques son igualmente aplicables a la evaluación de los efectos de los agentes tóxicos sobre poblaciones no humanas, cuestión que ocupa un lugar importante en las políticas ambientales de muchos países. Aunque se ha puesto especial interés en recoger las perspectivas y experiencias de los expertos y técnicos de todos los sectores y de muchos países, es posible que el lector advierta un cierto sesgo hacia los científicos académicos del mundo desarrollado. Aunque la directora del capítulo y los autores de los artículos son de la opinión de que los principios y la práctica de la toxicología son internacionales, es muy posible que se pongan de manifiesto aquí los problemas del sesgo cultural y la escasez de experiencia. La directora del capítulo espera que los lectores de la *Enciclopedia* ayuden a ampliar lo más posible la perspectiva en las sucesivas actualizaciones y ampliaciones de esta importante obra de referencia.

PRINCIPIOS GENERALES DE LA TOXICOLOGÍA

DEFINICIONES Y CONCEPTOS

*Bo Holmberg, Johan Höglberg
y Gunnar Johanson*

Exposición, dosis y respuesta

Toxicidad. La capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano.

Xenobióticos. "Sustancias extrañas", es decir, extrañas al organismo. Lo contrario son los compuestos endógenos. Entre los

xenobióticos figuran los fármacos, las sustancias químicas industriales, los venenos presentes en la naturaleza y los contaminantes del medio ambiente.

Peligro. La posibilidad de que la toxicidad sea efectiva en un contexto o situación determinados.

Riesgo. La probabilidad de que se produzca un efecto adverso específico. Suele expresarse como el porcentaje de casos de una población dada durante un determinado período de tiempo. La estimación del riesgo puede basarse en casos reales o en una proyección de casos futuros a partir de extrapolaciones.

Las expresiones *categorías de toxicidad* y *clasificación de la toxicidad* se utilizan a veces en el ámbito de las actividades de regulación. Las categorías de toxicidad se refieren a una calificación arbitraria de las dosis o niveles de exposición que causan efectos tóxicos. Se habla así de “sumamente tóxico”, “muy tóxico”, “moderadamente tóxico”, etc. Lo más frecuente es que estas expresiones se apliquen a la toxicidad aguda. La clasificación de la toxicidad se refiere a la agrupación de las sustancias químicas en categorías generales conforme a su efecto tóxico principal. Se habla así de sustancias alergénicas, neurotóxicas, carcinógenas, etc. Esta clasificación puede ser útil en el ámbito administrativo como advertencia y como información.

La *relación dosis-efecto* es la relación entre la dosis y el efecto a nivel individual. Un incremento de la dosis puede incrementar la intensidad de un efecto o su gravedad. Puede obtenerse una curva de dosis-efecto a nivel de todo el organismo, de la célula o de la molécula diana. Hay algunos efectos tóxicos, como la muerte o el cáncer, que no tienen grados, sino que son efectos “de todo o nada”.

La *relación dosis-respuesta* es la relación entre la dosis y el porcentaje de individuos que presentan un determinado efecto. Al incrementarse la dosis lo normal es que aumente el número de individuos afectados en la población expuesta.

El establecimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta es esencial en toxicología. En los estudios médicos (epidemiológicos) suele utilizarse como criterio para aceptar una relación causal entre un agente y una enfermedad el hecho de que el efecto o la respuesta sean proporcionales a la dosis.

Pueden establecerse varias curvas de dosis-respuesta respecto de una misma sustancia química —una curva para cada tipo de efecto. En la mayoría de los efectos tóxicos (cuando se estudian en poblaciones grandes), la curva de dosis-respuesta tiene una forma sigmoidea. Hay por lo general un intervalo de dosis bajas en el que no se detecta respuesta alguna; al aumentar la dosis, la respuesta sigue una curva ascendente que normalmente llega a una meseta cuando la respuesta es del 100 %. La curva de dosis-respuesta refleja las variaciones entre individuos de una misma población. La pendiente de la curva varía según la sustancia química de que se trate y también entre los diferentes tipos de efectos. En el caso de algunas sustancias que tienen efectos específicos (carcinógenos, iniciadores, mutágenos) la curva de dosis-respuesta podría ser lineal desde la dosis cero dentro de un determinado intervalo de dosis. Esto significa que no hay un umbral y que hasta las dosis pequeñas representan un riesgo. Por encima de ese intervalo de dosis, el riesgo puede incrementarse a una tasa superior a la lineal.

La variación de la exposición a lo largo del día y la duración total de la exposición a lo largo de toda la vida del sujeto pueden ser importantes para el resultado (respuesta) ya sea como un nivel de dosis media, promediado o incluso integrado. Los picos de exposición muy altos pueden ser más nocivos que un nivel de exposición más uniforme. Así ocurre en el caso de algunos disolventes orgánicos. En el de algunas sustancias carcinógenas, en cambio, se ha demostrado experimentalmente que el fraccionamiento de una única dosis en varias exposiciones con la misma dosis total puede ser más eficaz en la producción de tumores.

La dosis suele definirse como la cantidad de un xenobiótico que entra en un organismo (en unidades como mg/kg de peso corporal). La dosis puede expresarse de diferentes maneras (más o menos informativas): dosis de exposición, que es la concentración en el aire del contaminante que se inhala durante un determinado período de tiempo (en el ámbito de la higiene industrial, normalmente ocho horas), o dosis absorbida o retenida (llamada también carga corporal en higiene industrial), que es la cantidad presente en el cuerpo en un determinado momento durante la exposición o después de ella. La dosis tisular es la cantidad de

sustancia en un determinado tejido, y la dosis diana es la cantidad de sustancia (por lo general un metabolito) unida a la molécula crítica. La dosis diana puede expresarse en mg de sustancia química unida por mg de una determinada macromolécula del tejido. Para la aplicación de este concepto se precisa información sobre el mecanismo de la acción tóxica a nivel molecular. La dosis diana está asociada con más precisión al efecto tóxico. La dosis de exposición y la carga corporal pueden obtenerse con más facilidad, pero su relación con el efecto es menos precisa.

En el concepto de dosis se suele incluir un elemento temporal, aun cuando no se exprese siempre. Según la ley de Haber, la dosis teórica es $D = ct$, donde D es la dosis, c es la concentración del xenobiótico en el aire y t la duración de la exposición a la sustancia química. Cuando este concepto se utiliza al nivel de órganos o moléculas diana, puede utilizarse la cantidad por mg de tejido o de molécula en un período de tiempo determinado. El aspecto temporal suele ser más importante para comprender las exposiciones reiteradas y los efectos crónicos que en el caso de las exposiciones únicas y los efectos agudos.

Se producen *efectos aditivos* cuando hay una exposición a una combinación de sustancias químicas en la que simplemente se suman las diversas toxicidades individuales ($1+1=2$). Cuando varias sustancias actúan a través del mismo mecanismo se presupone la aditividad de sus efectos, aunque no siempre ocurre así en la realidad. La interacción entre varias sustancias puede tener como resultado una inhibición (*antagonismo*), en la que el efecto es menor de lo que sería la suma de los efectos individuales ($1+1<2$). También puede ocurrir lo contrario, es decir, que una combinación de sustancias produzca un efecto mayor que la suma de los efectos individuales (mayor respuesta entre individuos o incremento de la frecuencia de respuesta en una población), y entonces se habla de *sinergismo* ($1+1>2$).

El *tiempo de latencia* es el tiempo que transcurre entre la primera exposición y la aparición de un efecto o respuesta observable. Esta expresión suele utilizarse en el caso de los efectos de los carcinógenos, en los que los tumores pueden aparecer mucho tiempo después del comienzo de la exposición y a veces mucho tiempo después de que ésta haya cesado.

Un *umbral de dosis* es un nivel de la dosis por debajo del cual no hay ningún efecto observable. Se cree que existen umbrales en el caso de determinados efectos, como los efectos tóxicos agudos, pero no en el de otros, como los efectos carcinógenos (por iniciadores de la formación de aductos de ADN).

No obstante, la mera ausencia de respuesta en una población dada no debe entenderse como prueba de la existencia de un umbral. La ausencia de respuesta podría deberse a sencillos fenómenos estadísticos: es posible que un efecto adverso que se produce con baja frecuencia no sea detectable en una población pequeña.

La DL_{50} (dosis letal) es la dosis que produce una mortalidad del 50 % en una población animal. La DL_{50} solía considerarse en la bibliografía más antigua como una medida de la toxicidad aguda de las sustancias químicas. A mayor DL_{50} , menor toxicidad aguda. De una sustancia química muy tóxica (con una DL_{50} baja) se dice que es *potente*. No hay una correlación necesaria entre la toxicidad aguda y la toxicidad crónica. La DE_{50} (dosis efectiva) es la dosis que produce en el 50 % de los animales un efecto específico no letal.

El *NOEL (NOAEL)* es el nivel sin efecto (adverso) observado, o la dosis más alta que no produce efecto tóxico. Para establecer un NOEL se necesitan múltiples dosis, una población amplia e información complementaria para garantizar que la ausencia de respuesta no es un mero fenómeno estadístico. El *LOEL* es la mínima dosis efectiva observada en una curva de dosis-respuesta, (es decir, la dosis mínima) que produce un efecto.

Un *factor de seguridad* es un número convencional, arbitrario, por el que se divide el NOEL o el LOEL obtenidos en experimentos con animales para establecer una dosis permisible provisional en los seres humanos. Suele utilizarse en la esfera de la toxicología alimentaria, pero puede emplearse también en la toxicología laboral. A veces se utiliza también un factor de seguridad para extrapolar a poblaciones mayores datos obtenidos en poblaciones pequeñas. Los factores de seguridad van de 10^0 a 10^3 . Típicamente, un factor de seguridad de 2 puede ser una protección suficiente contra efectos menos graves (como la irritación), mientras que en efectos muy graves (como el cáncer) puede utilizarse hasta un factor de 1.000. Sería conveniente sustituir la expresión *factor de seguridad* por *factor de protección* o incluso por *factor de incertidumbre*. Ello reflejaría mejor las incertidumbres científicas, como si datos de dosis-respuesta exactos pudieran trasladarse de animales a seres humanos para una determinada sustancia química, efecto tóxico o circunstancia de exposición.

Las *extrapolaciones* son estimaciones teóricas, cualitativas o cuantitativas, de la toxicidad (extrapolaciones del riesgo) que se obtienen trasladando datos de una especie a otra o bien una serie de datos de dosis-respuesta (generalmente en el intervalo de dosis altas) a zonas de la dosis-respuesta sobre las que no existen datos. Por lo general han de hacerse extrapolaciones para predecir las respuestas tóxicas fuera del intervalo de observación. Para las extrapolaciones se elaboran modelos matemáticos que se basan en el conocimiento del comportamiento de la sustancia química en el organismo (modelos toxicocinéticos) o en el conocimiento de las probabilidades estadísticas de que se produzcan determinados hechos biológicos (modelos biológicos o mecanicistas). Algunos organismos nacionales han elaborado complejos modelos de extrapolación como método formalizado de predecir riesgos con fines de regulación. (Véase más adelante en este mismo capítulo el análisis de la evaluación del riesgo.)

Los *efectos sistémicos* son efectos tóxicos que se producen en tejidos alejados de la ruta de absorción.

El *órgano diana* es el órgano principal o más sensible afectado tras la exposición. Una misma sustancia química que entra en el cuerpo por diferentes rutas de exposición, tasa de dosis, sexo y especie puede afectar a diferentes órganos diana. La interacción entre las sustancias químicas, o entre las sustancias químicas y otros factores, puede afectar también a diferentes órganos diana.

Los *efectos agudos* son los que se producen tras una exposición limitada y poco tiempo después de ésta (horas, días), y pueden ser reversibles o irreversibles.

Los *efectos crónicos* se producen tras una exposición prolongada (meses, años, decenios) y/o persisten después de que haya cesado la exposición.

La *exposición aguda* es una exposición de corta duración, mientras que la *exposición crónica* es una exposición de larga duración (a veces toda la vida).

La *tolerancia* a una sustancia química es el fenómeno que se produce cuando repetidas exposiciones tienen como resultado una respuesta más baja de la que sería de esperar sin tratamiento previo.

Captación y disposición

Procesos de transporte

Difusión. Para entrar en el organismo y llegar al lugar en el que producen el daño, las sustancias extrañas han de atravesar varias barreras, entre ellas las células y sus membranas. La mayoría de las sustancias tóxicas atraviesa las membranas pasivamente, por difusión. Por este proceso, las moléculas hidrosolubles pequeñas pasan por los canales acuosos, y las moléculas liposolubles se disuelven en la parte lipídica de la membrana y después la

atraviesan por difusión. El etanol, que es una pequeña molécula hidro y liposoluble, se difunde rápidamente a través de las membranas celulares.

Difusión de ácidos y bases débiles. Los ácidos y bases débiles pueden atravesar fácilmente las membranas en su forma liposoluble no ionizada, mientras que las formas ionizadas son demasiado polares para pasar. El grado de ionización de estas sustancias depende del pH. Si entre un lado y otro de una membrana hay un gradiente de pH, se acumularán en sólo uno de los lados. La excreción urinaria de los ácidos y bases débiles depende en gran medida del pH de la orina. El pH fetal o embrionario es algo más alto que el pH materno, lo que produce una ligera acumulación de ácidos débiles en el feto o embrión.

Difusión facilitada. El paso de una sustancia puede verse facilitado por transportadores presentes en la membrana. La difusión facilitada se asemeja a los procesos enzimáticos en que se produce con la mediación de una proteína y en que es muy selectiva y saturable. Hay otras sustancias que pueden inhibir el transporte facilitado de los xenobióticos.

Transporte activo. Algunas sustancias atraviesan las membranas celulares mediante un transporte activo. Ese transporte se realiza con la mediación de proteínas transportadoras en un proceso análogo al de las enzimas. El transporte activo es similar a la difusión facilitada, pero puede producirse en contra de un gradiente de concentración. Necesita un aporte de energía, y un inhibidor metabólico puede bloquear el proceso. Los contaminantes ambientales casi nunca se transportan activamente. Una excepción es la secreción y reabsorción activas de metabolitos ácidos en los túbulos renales.

Tránsito activo. Algunas sustancias atraviesan las membranas celulares mediante un tránsito activo. Ese tránsito se realiza con la mediación de proteínas transportadoras en un proceso análogo al de las enzimas. El tránsito activo es similar a la difusión facilitada, pero puede producirse en contra de un gradiente de concentración. Necesita un aporte de energía, y un inhibidor metabólico puede bloquear el proceso. Los contaminantes ambientales casi nunca se transportan activamente. Una excepción es la secreción y reabsorción activas de metabolitos ácidos en los túbulos renales.

Transporte en los flujos corporales. Las sustancias se mueven asimismo por el cuerpo con el movimiento del aire en el sistema respiratorio durante la respiración y con los movimientos de la sangre, la linfa o la orina.

Filtración. Debido a la presión hidrostática u osmótica, grandes cantidades de agua atraviesan los poros del endotelio. Todo soluto que sea suficientemente pequeño se filtrará junto con el agua. Hay cierto nivel de filtración en el lecho de capilares de todos los tejidos, pero es importante sobre todo en la formación de la orina primaria en el glomérulo renal.

Absorción

La absorción es el paso de una sustancia del medio ambiente al organismo. Por lo general se entiende no sólo como el hecho de atravesar la barrera tisular sino también como su llegada ulterior a la circulación sanguínea.

Absorción pulmonar. Los pulmones son la principal ruta de depósito y absorción de pequeñas partículas suspendidas en el aire, gases, vapores y aerosoles. En el caso de los gases y vapores muy hidrosolubles, una parte importante de la absorción se produce en la nariz y el árbol respiratorio, pero en el caso de las sustancias menos solubles se produce principalmente en los alveolos pulmonares. Los alveolos poseen una superficie enorme (alrededor de 100 m^2 en los humanos). Además, la barrera de difusión es sumamente pequeña, sólo dos delgadas capas de células y una distancia de micras entre el aire alveolar y la circulación sanguínea sistémica. Esto hace que los pulmones sean un órgano muy eficiente para el intercambio no sólo de oxígeno y dióxido de carbono, sino también de otros gases y vapores. En general, la difusión por la pared alveolar es tan rápida que no limita la captación. La velocidad de absorción, sin embargo, depende más del flujo (ventilación pulmonar, gasto cardíaco) y de la

solubilidad (coeficiente de reparto sangre/aire). Otro factor importante es la eliminación metabólica. La importancia relativa de estos factores en la absorción pulmonar varía mucho según la sustancia de que se trate. La actividad física tiene como consecuencia un aumento de la ventilación pulmonar y del gasto cardíaco, y un descenso del riego sanguíneo en el hígado (y por ende de la velocidad de biotransformación). En el caso de muchas sustancias inhaladas ello hace que aumente notablemente la absorción pulmonar.

Absorción percutánea. La piel es una barrera muy eficiente. Aparte de su función termorreguladora, protege al organismo de los microorganismos, la radiación ultravioleta y otros agentes nocivos, y también de la pérdida de agua excesiva. La distancia de difusión en la dermis es del orden de décimas de milímetro. Además, la capa de queratina opone mucha resistencia a la difusión de la mayoría de las sustancias. No obstante, en el caso de algunas sustancias suele producirse una absorción dérmica significativa con resultado de toxicidad —sustancias liposolubles muy tóxicas como por ejemplo los insecticidas organofosforados y los disolventes orgánicos. Lo más frecuente es que esa absorción significativa se produzca como consecuencia de la exposición a sustancias líquidas. La absorción percutánea de vapores puede ser importante en el caso de los disolventes con presión de vapor muy baja y gran afinidad por el agua y la piel.

Absorción gastrointestinal. Se produce tras la ingestión accidental o deliberada de las sustancias. A veces se tragan partículas de mayor tamaño originalmente inhaladas y depositadas en el tracto respiratorio, de donde llegan a la faringe por transporte mucociliar. Prácticamente todas las sustancias solubles se absorben de manera eficiente desde el tracto gastrointestinal. El bajo pH del intestino puede facilitar por ejemplo la absorción de los metales.

Otras rutas. En los ensayos de toxicidad y otros experimentos pueden utilizarse, por razones de comodidad, rutas de administración especiales que son muy poco frecuentes y por lo general no se dan en la exposición profesional. Entre esas rutas figuran las inyecciones intravenosas (IV), subcutáneas (sc), intraperitoneales (ip) e intramusculares (im). En general, las sustancias se absorben más deprisa y de manera más completa por esas rutas, especialmente por la inyección IV. Esto hace que se produzcan breves pero importantes picos de concentración que pueden incrementar la toxicidad de una dosis.

Distribución

La distribución de una sustancia dentro del organismo es un proceso dinámico que depende de las velocidades de absorción y eliminación, así como del flujo sanguíneo en los diferentes tejidos y de las afinidades de éstos por la sustancia. Las moléculas hidrosolubles pequeñas no cargadas, los cationes monovalentes y la mayoría de los aniones se difunden con facilidad y acaban por conseguir una distribución relativamente uniforme por todo el cuerpo.

El *volumen de distribución* es la cantidad de una sustancia que hay en el cuerpo en un momento determinado dividida por la concentración en la sangre, el plasma o el suero en ese momento. Este valor no tiene nada que ver con el volumen físico, pues muchas sustancias no se distribuyen de manera uniforme por el organismo. Un volumen de distribución inferior a 1 l/kg de peso corporal indica una distribución preferencial en la sangre (o en el suero o en el plasma), mientras que los valores superiores a 1 indican una preferencia por los tejidos periféricos, como el tejido adiposo en el caso de las sustancias liposolubles.

La *acumulación* es la retención de una sustancia en un tejido o en un órgano a unos niveles superiores a los de su concentración en la sangre o el plasma. Puede tratarse también de una

acumulación gradual en el organismo a lo largo del tiempo. Muchos xenobióticos son muy liposolubles y tienden a acumularse en el tejido adiposo, mientras que otros tienen una especial afinidad por el hueso. En el hueso, por ejemplo, el calcio puede intercambiarse por cationes de plomo, estroncio, bario y radio, mientras que los grupos hidroxilo pueden intercambiarse por flúor.

Barreras. Los vasos sanguíneos del cerebro, los testículos y la placenta tienen unas características anatómicas especiales que inhiben el paso de las moléculas grandes, como las proteínas. Esas características, que suelen denominarse barreras hematoencefálica, hematotesticular y hematoplacentaria, pueden dar la falsa impresión de que impiden el paso de cualquier sustancia, pero la realidad es que tienen poca o ninguna importancia en el caso de los xenobióticos capaces de atravesar por difusión las membranas celulares.

Unión a la sangre. Las sustancias pueden unirse a los glóbulos rojos o a componentes del plasma, o pueden estar también en forma libre en la sangre. El monóxido de carbono, el arsénico, el mercurio orgánico y el cromo hexavalente tienen una gran afinidad por los glóbulos rojos, mientras que el mercurio inorgánico y el cromo trivalente prefieren las proteínas plasmáticas. Hay otras sustancias que también se unen a las proteínas del plasma. Sólo la fracción libre puede llegar por filtración o difusión a los órganos de eliminación. Por consiguiente, la unión a la sangre puede incrementar el tiempo de retención de una sustancia en el organismo y sin embargo reducir su captación por los órganos diana.

Eliminación

La *eliminación* es la desaparición de una sustancia del cuerpo. Puede consistir en su excreción al exterior del organismo o en su transformación en otras sustancias que no son captadas por un determinado método de medición. La velocidad de desaparición puede expresarse mediante la constante de eliminación, la vida media biológica o el aclaramiento.

Curva de concentración-tiempo. La curva de concentración en sangre (o plasma) en relación con el tiempo es una forma cómoda de describir la captación de un xenobiótico por el organismo y su desaparición de él.

El *área bajo la curva* (ABC) es la integral de la concentración en la sangre (plasma) a lo largo del tiempo. Cuando no hay saturación metabólica u otros procesos no lineales, la ABC es proporcional a la cantidad de sustancia absorbida.

La *vida media biológica* (o vida media) es el tiempo que se necesita, a partir del momento en que cesa la exposición, para reducir a la mitad la cantidad presente en el organismo. Como muchas veces es difícil valorar la cantidad total de una sustancia, se emplean métodos de medición como la concentración en sangre (plasma). El concepto de vida media debe utilizarse con prudencia, ya que ésta puede modificarse, por ejemplo, con la dosis y la duración de la exposición. Además, muchas sustancias poseen complejas curvas de declinación, con varias vidas medianas.

La *biodisponibilidad* es la fracción de una dosis administrada que entra en la circulación sistémica. Cuando no hay aclaramiento presistémico, o *metabolismo de primer paso*, la fracción es 1. En la exposición oral, el aclaramiento presistémico puede deberse al metabolismo en el contenido gastrointestinal, las paredes intestinales o el hígado. El metabolismo de primer paso reduce la absorción sistémica de la sustancia y en cambio incrementa la absorción de sus metabolitos. Esto puede hacer que se modifique el cuadro de toxicidad.

El *aclaramiento* es el volumen de sangre (plasma) por unidad de tiempo del que se ha eliminado por completo una sustancia.

Para distinguirlo del aclaramiento renal, se suele hablar por ejemplo de aclaramiento total, metabólico o sanguíneo (plasmático).

El *aclaramiento intrínseco* es la capacidad que poseen las enzimas endógenas de transformar una sustancia, y se expresa también en volumen por unidad de tiempo. Si el aclaramiento intrínseco de un órgano es muy inferior al flujo sanguíneo, se dice que el metabolismo está limitado por la capacidad. A la inversa, si el aclaramiento intrínseco es muy superior al flujo sanguíneo, se dice que el metabolismo está limitado por el flujo.

Excreción

La excreción es la salida del organismo de una sustancia y de sus productos de biotransformación.

Excreción en la orina y la bilis. El principal órgano excretor es el riñón. Algunas sustancias, especialmente los ácidos de alto peso molecular, se excretan con la bilis. Una fracción de las sustancias biliares excretadas puede reabsorberse en el intestino. Este proceso, denominado *circulación enterohepática*, es habitual en las sustancias conjugadas tras la hidrólisis intestinal del conjugado.

Otras rutas de excreción. Algunas sustancias, como los disolventes orgánicos y productos de descomposición como la acetona, son lo suficientemente volátiles para que una fracción considerable pueda excretarse en el aire espirado después de la inhalación. Pequeñas moléculas hidrosolubles y también liposolubles se segregan fácilmente al feto a través de la placenta y a la leche en los mamíferos. Para la madre, la lactancia puede ser una ruta excretora cuantitativamente importante en el caso de sustancias liposolubles persistentes. Los hijos pueden estar expuestos secundariamente a través de la madre durante el embarazo y durante la lactancia. Los compuestos hidrosolubles pueden excretarse hasta cierto punto en el sudor y la saliva, pero estas rutas son en general de escasa importancia. No obstante, como se produce y se traga un gran volumen de saliva, la excreción por esta vía puede contribuir a la reabsorción del compuesto. Algunos metales como el mercurio se excretan uniéndose de manera permanente a los grupos sulfhidrilo de la queratina presente en el pelo.

Modelos toxicocinéticos

Los modelos matemáticos son instrumentos importantes para entender y describir la captación y disposición de sustancias extrañas. Estos modelos son en su mayoría compartimentales, es decir, representan al organismo dividido en uno o más compartimentos. Un compartimento es un volumen química y físicamente teórico en el que se supone que la sustancia se distribuye de manera homogénea e instantánea. Los modelos sencillos pueden expresarse como una suma de términos exponentiales, mientras que los más complicados exigen efectuar procedimientos numéricos en ordenador para resolverlos. Los modelos pueden subdividirse en dos categorías: descriptivos y fisiológicos.

En los *modelos descriptivos*, el ajuste a los datos medidos se realiza modificando los valores numéricos de los parámetros del modelo o incluso la propia estructura de éste. La estructura del modelo normalmente tiene poco que ver con la estructura del organismo. Las ventajas del enfoque descriptivo son que se realizan pocos supuestos y que no se necesitan datos adicionales. Un inconveniente es que no son demasiado útiles para efectuar extrapolaciones.

Los *modelos fisiológicos* se construyen a partir de datos fisiológicos y anatómicos y otros datos independientes. Después el modelo se depura y se valida mediante su comparación con datos experimentales. Una ventaja de los modelos fisiológicos es que pueden utilizarse para realizar extrapolaciones. Por ejemplo, puede predecirse la influencia de la actividad física en

la captación y disposición de sustancias inhaladas a partir de ajustes fisiológicos conocidos de la ventilación y el gasto cardíaco. Un inconveniente es que requieren una gran cantidad de datos independientes.

Biotransformación

La *biotransformación* es un proceso que lleva a una conversión metabólica de los compuestos extraños (xenobióticos) presentes en el organismo. Suele denominarse también metabolismo de xenobióticos. Por regla general, el metabolismo convierte los xenobióticos liposolubles en grandes metabolitos hidrosolubles que pueden excretarse con facilidad.

La biotransformación se realiza principalmente en el hígado. Todos los xenobióticos captados en el intestino son transportados al hígado por un único vaso sanguíneo (*la vena porta*). Cuando se capta en pequeñas cantidades, una sustancia extraña puede metabolizarse completamente en el hígado antes de llegar a la circulación general y a otros órganos (efecto de primer paso). Los xenobióticos inhalados se distribuyen por la circulación general hasta llegar al hígado. En ese caso sólo se metaboliza en el hígado una fracción de la dosis antes de llegar a otros órganos.

Las células hepáticas contienen diversas enzimas que oxidan los xenobióticos. Por lo general, esa oxidación activa el compuesto —lo hace más reactivo que la molécula precursora. En la mayoría de los casos, el metabolito oxidado vuelve a ser metabolizado por otras enzimas en una segunda fase. Esas enzimas conjugan el metabolito con un sustrato endógeno, de manera que la molécula se hace más grande y más polar, lo cual facilita la excreción.

También en otros órganos como el pulmón y el riñón hay enzimas que metabolizan los xenobióticos. En esos órganos pueden desempeñar funciones específicas y cualitativamente importantes en el metabolismo de determinados xenobióticos. A veces metabolitos formados en un órgano se metabolizan aún más en otro. También pueden participar en la biotransformación las bacterias intestinales.

Los metabolitos de xenobióticos pueden excretarse por los riñones o a través de la bilis. Pueden exhalararse también a través de los pulmones, o unirse a moléculas endógenas del organismo.

Entre biotransformación y toxicidad hay una relación compleja. Puede entenderse la biotransformación como un proceso necesario para la supervivencia. Protege al organismo de la toxicidad impidiendo que se acumulen en él sustancias nocivas. Sin embargo, en ese proceso pueden formarse, como productos intermedios, metabolitos reactivos que son potencialmente nocivos. Este fenómeno se denomina activación metabólica. De esta manera, la biotransformación puede también inducir toxicidad. Metabolitos intermedios oxidados que no se conjugan pueden unirse a estructuras celulares y dañarlas. Cuando por ejemplo un metabolito de xenobiótico se une al ADN puede inducirse una mutación (véase “Toxicología genética”). Si el sistema de biotransformación está sobrecargado, puede producirse una destrucción masiva de proteínas esenciales o de membranas lípidicas. Y ello puede desembocar en muerte celular (véase “Lesión celular y muerte celular”).

Metabolismo es una palabra que suele utilizarse indistintamente con biotransformación. Indica las reacciones químicas de descomposición o síntesis que se producen en el cuerpo gracias a la acción catalizadora de las enzimas. En el organismo se metabolizan los nutrientes procedentes de los alimentos, los compuestos endógenos y los xenobióticos.

Se habla de *activación metabólica* cuando un compuesto menos reactivo se convierte en una molécula más reactiva. Este fenómeno se da generalmente durante las reacciones de la Fase 1.



Se habla de *desactivación metabólica* cuando una molécula activa o tóxica se convierte en un metabolito menos activo. Este fenómeno se da generalmente durante las reacciones de la Fase 2. En algunos casos un metabolito desactivado puede reactivarse, por ejemplo mediante escisión enzimática.

Las *reacciones de la Fase 1* son el primer paso en el metabolismo de los xenobióticos. Suelen consistir en la oxidación del compuesto. Por lo general, la oxidación hace que el compuesto sea más hidrosoluble y facilita las reacciones ulteriores.

Las *enzimas citocromo P450* son un grupo de enzimas que oxidan preferentemente los xenobióticos en reacciones de la Fase 1. Estas enzimas están especializadas en hacer frente a determinados grupos de xenobióticos que poseen determinadas características. También utilizan como sustratos moléculas endógenas. Las enzimas citocromo P450 son inducidas por los xenobióticos de una manera específica. La obtención de datos sobre la inducción del citocromo P450 puede proporcionar información de la naturaleza de exposiciones anteriores (véase "Determinantes genéticos de la respuesta tóxica").

Por *reacciones de la Fase 2* se entiende el segundo paso del metabolismo de los xenobióticos. Suelen consistir en que el compuesto oxidado se conjuga con una molécula endógena, es decir, se acopla a ella. Esta reacción incrementa aún más su hidrosolubilidad. Muchos metabolitos conjugados se excretan activamente en el riñón.

Las *transferasas* son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de la Fase 2. Conjugan los xenobióticos con compuestos endógenos como el glutatión, aminoácidos, el ácido glucurónico o sulfatos.

El *glutatión* es una molécula endógena, un tripeptido, que se conjuga con xenobióticos en reacciones de la Fase 2. Está presente en todas las células (y en altas concentraciones en las células hepáticas) y suele ofrecer protección contra xenobióticos activados. Cuando el glutatión se agota pueden producirse reacciones tóxicas entre metabolitos xenobióticos activados y proteínas, lípidos o ADN.

Se habla de *inducción* cuando enzimas que participan en la biotransformación intensifican su actividad o aumentan en cantidad como respuesta a la exposición a xenobióticos. En algunos casos, al término de unos pocos días la actividad enzimática puede haberse multiplicado varias veces. La inducción suele estar equilibrada, de manera que las reacciones de la Fase 1 y de la Fase 2 se incrementan simultáneamente. Esto puede llevar a una biotransformación más rápida y puede explicar la tolerancia. A la inversa, una inducción desequilibrada puede aumentar la toxicidad.

Puede haber una *inhibición* de la biotransformación cuando dos xenobióticos son metabolizados por la misma enzima. Los dos sustratos tienen que competir entre sí, y por lo general uno de ellos es el elegido. En ese caso el segundo sustrato no se metaboliza, o sólo se metaboliza lentamente. Como en el caso de la inducción, la inhibición puede incrementar o reducir la toxicidad.

La *activación del oxígeno* es un fenómeno que pueden desencadenar los metabolitos de determinados xenobióticos. Pueden autooxidarse bajo la producción de especies de oxígeno activado. Esas especies derivadas del oxígeno, entre las que figuran el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, pueden dañar el ADN y lípidos y proteínas de las células. La activación del oxígeno interviene también en los procesos inflamatorios.

Se observa una *variabilidad genética* entre individuos en muchos genes que codifican enzimas de la Fase 1 y la Fase 2. La variabilidad genética puede explicar por qué determinados individuos son más susceptibles que otros a los efectos tóxicos de los xenobióticos.

TOXICOCINETICA

Dušan Djuric'

El organismo humano es un complejo sistema biológico que está organizado en diversos niveles, desde el molecular-cellular hasta el de los tejidos y órganos. Es un sistema abierto, que intercambia materia y energía con su medio ambiente a través de numerosas reacciones bioquímicas que están en equilibrio dinámico. El medio ambiente puede estar contaminado por diversos tóxicos.

Cuando moléculas o iones tóxicos penetran en ese sistema férreamente coordinado desde el medio en que un individuo trabaja o vive pueden verse perturbados, reversible o irreversiblemente, los procesos bioquímicos normales de la célula, o incluso producirse lesiones y muerte de la célula (véase "Lesión celular y muerte celular").

El proceso de penetración de un tóxico desde el medio ambiente hasta los lugares en que va a producir su efecto tóxico dentro del organismo puede dividirse en tres fases:

1. La fase de exposición, que comprende todos los procesos que se producen entre diversos tóxicos y/o la influencia que tienen sobre ellos los factores ambientales (luz, temperatura, humedad, etc.). Los tóxicos pueden sufrir transformaciones químicas, degradación, biodegradación (por microorganismos) y desintegración.
2. La fase toxicocinética, que comprende la absorción de los tóxicos en el organismo y todos los procesos subsiguientes: transporte por los fluidos corporales, distribución y acumulación en tejidos y órganos, biotransformación en metabolitos y eliminación del organismo (excreción) de los tóxicos y/o metabolitos.
3. La fase toxicodinámica, que se refiere a la interacción de los tóxicos (moléculas, iones, coloides) con lugares de acción específicos en las células o dentro de ellas —receptores—, con el resultado último de un efecto tóxico.

En esta sección nos ocuparemos exclusivamente de los procesos toxicocinéticos que se producen en el interior del organismo humano tras la exposición a tóxicos presentes en el medio ambiente.

Las moléculas o iones tóxicos presentes en el medio ambiente penetran en el organismo a través de la piel y las mucosas o a través de las células epiteliales del tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal, según cuál sea el punto de entrada. Esto significa que las moléculas y los iones tóxicos han de atravesar membranas celulares de esos sistemas biológicos, así como un complejo sistema de membranas interiores de la célula.

Todos los procesos toxicocinéticos y toxicodinámicos se producen en el nivel molecular-cellular. Son muchos los factores que influyen en esos procesos, y que cabe dividir en dos grupos básicos:

- La constitución química y las propiedades fisicoquímicas de los tóxicos.
- La estructura de la célula, especialmente las propiedades y función de las membranas que rodean la célula y sus orgánulos interiores.

Propiedades fisicoquímicas de los tóxicos

In 1854 el toxicólogo ruso E.V. Pelikan empezó a estudiar la relación existente entre la estructura química de una sustancia y su actividad biológica, es decir, la relación estructura-actividad. La estructura química determina directamente las propiedades fisicoquímicas, algunas de las cuales son responsables de la actividad biológica.

A la hora de definir la estructura química se pueden utilizar como descriptores numerosos parámetros, que cabe dividir en varios grupos:

1. Fisicoquímicos:

- Generales: punto de fusión, punto de ebullición, presión de vapor, constante de disociación (pK_a), coeficiente de partición de Nernst (P), energía de activación, calor de reacción, potencial de reducción, etc.
- Eléctricos: potencial de ionización, constante dieléctrica, momento dipolar, coeficiente masa/carga, etc.
- Químico-únicos: carga atómica, energía de enlace, energía de resonancia, densidad electrónica, reactividad molecular, etc.
- 2. Estéricos: volumen, forma y superficie de la molécula, forma de la subestructura, reactividad molecular, etc.
- 3. Estructurales: número de enlaces, número de anillos (en compuestos policíclicos), grado de ramificación, etc.

En el caso de cada tóxico es necesario seleccionar una serie de descriptores relacionados con un determinado mecanismo de actividad. No obstante, desde el punto de vista toxicocinético hay dos parámetros que son de importancia general para todos los tóxicos:

- El coeficiente de partición de Nernst (P), que establece la solubilidad de las moléculas tóxicas en el sistema bifásico octanol (aceite)-agua, la cual está en correlación con su lipofilia o hidrosolubilidad. Este parámetro influye considerablemente en la distribución y acumulación de las moléculas tóxicas en el organismo.
- La constante de disociación (pK_a), que define el grado de ionización (disociación electrolítica) de las moléculas de un tóxico en cationes y aniones a un determinado pH. Esta constante representa el pH al que se consigue una ionización del 50 %. Las moléculas pueden ser lipofílicas o hidrofílicas, pero los iones son solubles exclusivamente en el agua de los fluidos y tejidos corporales. Conociendo el pK_a se puede calcular, mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach, el grado de ionización de una sustancia para cada pH.

En el caso de los polvos y aerosoles inhalados influyen también en su toxicocinética y toxicodinámica el tamaño, la forma, la superficie y la densidad de las partículas.

Estructura y propiedades de las membranas

La célula eucariótica de los organismos humanos y animales está rodeada por una membrana citoplasmática que regula el transporte de sustancias y mantiene la homeostasis celular. También poseen membranas los orgánulos de la célula (núcleo, mitocondrias). El citoplasma celular está compartimentado por intrincadas estructuras membranosas, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (endomembranas). Todas estas membranas son similares desde el punto de vista estructural, pero varían en su contenido de lípidos y proteínas.

El marco estructural de las membranas es una capa doble o bicapa de moléculas de lípidos (fosfolípidos, esfingolípidos, colesterol). El elemento fundamental de una molécula de fosfolípido es el glicerol, con dos de sus grupos -OH esterificados por ácidos grasos alifáticos de 16-18 átomos de carbono, y el tercer grupo esterificado por un grupo fosfato y un compuesto nitrogenado (colina, etanolamina, serina). En los esfingolípidos, la base es la esfingosina.

La molécula de lípidos es anfipática porque consta de una "cabeza" hidrofílica polar (aminoalcohol, fosfato, glicerol) y una "cola" formada por dos líneas gemelas que es apolar (ácidos grasos). La bicapa lipídica está organizada de tal manera que las

cabezas hidrofílicas constituyen la superficie exterior e interior de la membrana, mientras que las colas lipofílicas se extienden hacia el interior de la membrana, que contiene agua, diversos iones y moléculas.

Las proteínas y glicoproteínas se insertan en la bicapa lipídica (proteínas intrínsecas) o se unen a la superficie de la membrana (proteínas extrínsecas). Estas proteínas contribuyen a la integridad estructural de la membrana, pero pueden funcionar también como enzimas, transportadores, paredes porosas o receptores.

La membrana es una estructura dinámica que puede desintegrarse y reconstruirse con otra proporción distinta de lípidos y proteínas, según sus necesidades funcionales.

La regulación de la entrada y salida de sustancias en la célula es una de las funciones básicas de las membranas exterior e interiores. Algunas moléculas lipofílicas pasan directamente a través de la bicapa lipídica. El transporte de las moléculas e iones hidrofílicos se efectúa a través de los poros. Las membranas responden a los cambios de condiciones abriendo o cerrando determinados poros de diversos tamaños.

En el transporte de sustancias, incluidas las tóxicas, a través de la membrana intervienen los procesos y mecanismos siguientes:

- Difusión a través de la bicapa lipídica.
- Difusión a través de los poros.
- Transporte por un transportador (difusión facilitada).

Procesos activos:

- Transporte activo por un transportador.
- Endocitosis (pinocitosis).

Difusión

Es el movimiento de moléculas e iones a través de la bicapa lipídica o de poros desde una zona de alta concentración, o de alto potencial eléctrico, a otra de escasa concentración o potencial ("a favor de corriente"). La diferencia de concentración o de carga eléctrica es la fuerza impulsora que influye en la intensidad del flujo en ambas direcciones. En el estado de equilibrio, las entradas serán iguales a las salidas. La velocidad de difusión obedece a la ley de Fick, que dice que es directamente proporcional a la superficie de membrana disponible, a la diferencia en el gradiente de concentración (carga) y al coeficiente de difusión característico, e inversamente proporcional al grosor de la membrana.

Las moléculas lipofílicas pequeñas atraviesan fácilmente la capa de lípidos de la membrana, según el coeficiente de partición de Nernst.

Las moléculas lipofílicas grandes, las moléculas hidrosolubles y los iones utilizan para atravesar la membrana los canales acuosos de los poros. En el caso de las moléculas influyen su tamaño y su configuración espacial. En el caso de los iones, además del tamaño es decisivo el tipo de carga. Las moléculas proteicas de las paredes de los poros pueden cargarse positiva o negativamente. Los poros estrechos tienden a ser selectivos —los ligandos con carga negativa permiten pasar sólo a los cationes, y los que tienen carga positiva sólo a los aniones. Cuando el diámetro del poro es mayor el factor dominante es el flujo hidrodinámico, que permite pasar a iones y moléculas según la ley de Poiseuille. Esta filtración es una consecuencia del gradiente osmótico. En algunos casos los iones pueden entrar mediante determinadas moléculas complejas —ionóforas— que pueden ser producidas por microorganismos de efecto antibiótico (nonactina, valinomicina, gramicidina, etc.).

Difusión facilitada o catalizada

Para este proceso es necesario que haya en la membrana un transportador, por lo general una molécula proteica (permeasa). El transportador se une selectivamente a determinadas sustancias, en una especie de conjunto sustrato-enzima. Otras moléculas similares (incluidas las tóxicas) pueden competir por el transportador específico hasta que se alcanza el punto de saturación. Los tóxicos pueden competir por el transportador, y cuando se unen a él de manera irreversible el transporte se bloquea. Cada tipo de transportador presenta una velocidad de transporte característica. Cuando el transporte se efectúa en ambas direcciones se habla de intercambio por difusión.

Transporte activo

En el transporte de algunas sustancias que son vitales para las células se utiliza un tipo especial de transportador, que es capaz de realizar su función en contra del gradiente de concentración o de potencial eléctrico ("contra corriente"). Este transportador es muy estereoespecífico y puede saturarse.

Para este tipo de transporte "contra corriente" se requiere energía. La energía necesaria se obtiene mediante la escisión (hidrólisis) catalítica de moléculas de ATP a ADP por la enzima adenosin trifosfatasa (ATP-asa).

Los tóxicos pueden interferir ese transporte inhibiendo de manera competitiva o no competitiva el transportador o también inhibiendo la actividad de la ATP-asa.

Endocitosis

La *endocitosis* se define como un mecanismo de transporte en el que la membrana celular rodea material invaginándose para formar una vesícula que lo transporta por la célula. Cuando el material es líquido, el proceso se denomina *pinocitosis*. En algunos casos el material está unido a un receptor, y el conjunto es transportado por una vesícula de la membrana. Este tipo de transporte lo utilizan especialmente las células epiteliales del tracto gastrointestinal, así como las células del hígado y el riñón.

Absorción de tóxicos

Las personas se hallan expuestas a numerosos tóxicos que están presentes en el medio ambiente profesional o general, y que pueden penetrar en el organismo humano por tres vías de entrada principales:

- A través del tracto respiratorio, por inhalación de aire contaminado.
- A través del tracto gastrointestinal, por ingestión de comida y bebida contaminadas.
- A través de la piel, por penetración dérmica, también llamada percutánea.

En el caso de la exposición en la industria, la principal vía de entrada de tóxicos es la inhalación, seguida por la penetración percutánea. En la agricultura, los casos de exposición a plaguicidas por absorción a través de la piel equivalen prácticamente a los casos en que se combinan la inhalación y la penetración percutánea. En la población general, la exposición se produce sobre todo por ingestión de comida y bebida contaminadas, seguida de la inhalación y, con menos frecuencia, de la penetración percutánea.

Absorción por el tracto respiratorio

La absorción en los pulmones es la principal vía de entrada de numerosos tóxicos que están en suspensión en el aire (gases, vapores, humos, nieblas, polvos, aerosoles, etc.).

El tracto respiratorio (TR) es un sistema ideal para el intercambio de gases, pues posee una membrana cuya superficie es

de 30 m^2 (espiración) a 100 m^2 (inspiración profunda), tras la cual hay una red de unos 2.000 km de capilares. Este sistema, que se ha ido desarrollando a lo largo de la evolución, está contenido en un espacio relativamente pequeño (la cavidad torácica) y cuenta con la protección de las costillas.

Desde el punto de vista anatómico y fisiológico, el TR puede dividirse en tres compartimientos:

- La parte superior o compartimiento nasofaríngeo (NF), que se inicia en los orificios de la nariz y se extiende hasta la faringe y la laringe; funciona como un sistema de acondicionamiento del aire.
- El árbol traqueobronquial (TB), integrado por numerosos tubos de diversos tamaños que llevan el aire a los pulmones.
- El compartimiento pulmonar (P), que consta de millones de alveolos (sacos de aire) dispuestos en formas arracimadas.

El epitelio de la región nasofaríngea absorbe fácilmente los tóxicos hidrófilos. Todo el epitelio de las regiones NF y TB está recubierto por una película de agua. Los tóxicos lipófilos se absorben parcialmente en las regiones NF y TB, pero sobre todo en los alveolos mediante su difusión por las membranas alveolo-capilares. La velocidad de absorción depende de la ventilación pulmonar, el gasto cardíaco (flujo sanguíneo por los pulmones), la solubilidad del tóxico en la sangre y su velocidad de metabolización.

El intercambio de gases se realiza en los alveolos. La pared alveolar consta de un epitelio, un armazón intersticial de membrana basal, tejido conectivo y el endotelio capilar. La difusión de los tóxicos es muy rápida por estas capas, que tienen alrededor de $0,8 \mu\text{m}$ de grosor. En los alveolos, el tóxico pasa de la fase área a la fase líquida (sangre). La velocidad de absorción (distribución aire/sangre) de un tóxico depende de su concentración en el aire alveolar y del coeficiente de partición de Nernst de la sangre (coeficiente de solubilidad).

En la sangre, el tóxico puede disolverse en la fase líquida por simples procesos físicos o puede unirse a las células sanguíneas y/o los componentes del plasma en función de su afinidad química o por adsorción. La sangre contiene un 75 % de agua, y por eso los gases y vapores hidrófilos son muy solubles en el plasma (por ejemplo los alcoholos). Los tóxicos lipófilos (como el benceno) suelen unirse a células o macromoléculas como la albúmina.

En el momento mismo en que se inicia la exposición pulmonar se producen dos procesos contrarios: absorción y desorción. El equilibrio entre ambos depende de la concentración de tóxico en el aire alveolar y en la sangre. Al comienzo de la exposición la concentración de tóxico en la sangre es 0, y la retención en la sangre casi del 100 %. Al proseguir la exposición, se alcanza un equilibrio entre absorción y desorción. Los tóxicos hidrófilos alcanzan rápidamente ese equilibrio, y la velocidad de absorción depende más de la ventilación pulmonar que del flujo sanguíneo. Los tóxicos lipófilos necesitan más tiempo para llegar al equilibrio, y por eso la velocidad de absorción está determinada por el flujo de sangre no saturada.

El depósito de partículas y aerosoles en el TR depende de factores físicos y fisiológicos, así como del tamaño de las partículas. En resumen, cuanto más pequeña es la partícula tanto más dentro del TR llega en su penetración.

La retención baja y relativamente constante de partículas de polvo en el pulmón de personas muy expuestas (como los mineros) sugiere la existencia de un sistema muy eficaz de eliminación de las partículas. En la parte superior del TR (traqueobronquial), la eliminación corre a cargo de un manto mucociliar. En la parte pulmonar funcionan tres mecanismos distintos: 1) manto mucociliar, 2) fagocitosis y 3) penetración directa de las partículas a través de la pared alveolar.

Las primeras 17 de las 23 ramas del árbol traqueobronquial poseen células epiteliales ciliadas. Merced a sus impulsos, esos cilios están moviendo constantemente un manto mucoso hacia la boca. Las partículas depositadas en ese manto mucociliar se tragan en la boca (ingestión). La superficie del epitelio alveolar también está recubierta de un manto mucoso, que se mueve hacia el manto mucociliar. A ello hay que añadir que las células móviles especializadas —los fagocitos— engloban partículas y microorganismos en los alveolos y migran en dos posibles direcciones:

- Hacia el manto mucociliar, que los transporta hasta la boca.
- Por los espacios intercelulares de la pared alveolar hasta llegar al sistema linfático del pulmón; las partículas también pueden penetrar directamente por esta vía.

Absorción por el tracto gastrointestinal

Se pueden ingerir tóxicos mediante deglución accidental, consumo de alimentos y bebidas contaminados o deglución de partículas procedentes del TR.

Todo el canal digestivo, desde el esófago hasta el ano, está construido básicamente de la misma manera: una capa mucosa (epitelio) bajo la cual hay tejido conectivo y después una red de capilares y músculo liso. El epitelio externo del estómago es muy rugoso para incrementar la superficie de absorción/secreción. El intestino contiene gran cantidad de pequeños salientes (vellosidades), que absorben los materiales por “bombeo”. La superficie activa de absorción en el intestino es de unos 100 m².

En el tracto gastrointestinal (TGI) todos los procesos de absorción presentan gran actividad:

- transporte transcelular por difusión a través de la capa lipídica y/o los poros de las membranas celulares, así como filtración por los poros
- difusión paracelular a través de las zonas de contacto entre unas células y otras
- difusión facilitada y transporte activo
- endocitosis y mecanismo de bombeo de las vellosidades.

Algunos iones metálicos tóxicos utilizan sistemas de transporte especializados para elementos esenciales: el talio, el cobalto y el manganeso utilizan el sistema del hierro, mientras que el plomo parece que utiliza el sistema del calcio.

Son muchos los factores que influyen en la velocidad de absorción de tóxicos en las diversas partes del TGI:

- Las propiedades fisicoquímicas de los tóxicos, especialmente el coeficiente de partición de Nernst y la constante de disociación; en el caso de las partículas es importante su tamaño —a menor tamaño, mayor solubilidad.
- La cantidad de alimentos presente en el TGI (efecto de dilución).
- El tiempo de permanencia en cada parte del TGI (desde unos minutos en la boca hasta una hora en el estómago y muchas horas en el intestino).
- La superficie de absorción y la capacidad de absorción del epitelio.
- El pH local, que rige la absorción de tóxicos disociados; en el pH ácido del estómago se absorben con más rapidez los compuestos ácidos no disociados.
- El peristaltismo (movimiento intestinal por acción de los músculos) y el flujo sanguíneo local.
- Las secreciones gástricas e intestinales, que transforman los tóxicos en productos más o menos solubles; la bilis es un agente emulsionante que produce complejos más solubles (hidrotropía).

- La exposición combinada a otros tóxicos, que puede producir efectos de sinergia o de antagonismo en los procesos de absorción.
- La presencia de agentes complejantes/quelantes.
- La acción de la microflora del TGI (alrededor de 1,5 kg), unas 60 especies distintas de bacterias que pueden biotransformar los tóxicos.

Es necesario mencionar también la circulación enterohepática. Los tóxicos y/o metabolitos polares (glucurónidos y otros conjugados) se excretan con la bilis al duodeno. Allí las enzimas de la microflora los hidrolizan, y los productos liberados pueden reabsorberse y llegar al hígado por la vena porta. Este mecanismo es muy peligroso en el caso de las sustancias hepatotóxicas, pues permite su acumulación temporal en el hígado.

En el caso de los tóxicos que se biotransforman en el hígado en metabolitos menos tóxicos o no tóxicos, la ingestión puede ser una vía de entrada menos peligrosa. Tras ser absorbidas en el TGI, las sustancias son transportadas por la vena porta hasta el hígado, donde pueden detoxificarse parcialmente por biotransformación.

Absorción por la piel (dérmica o percutánea)

La piel (con una superficie de 1,8 m² en una persona adulta) recubre la superficie del cuerpo junto con las membranas mucosas de los orificios corporales. Es una barrera contra los agentes físicos, químicos y biológicos, manteniendo la integridad y homeostasis del cuerpo y realizando muchas otras funciones fisiológicas.

La piel consta básicamente de tres capas: la epidermis, la piel propiamente dicha (dermis) y el tejido subcutáneo (hipodermis). Desde el punto de vista toxicológico la que más nos interesa aquí es la epidermis. Está constituida por muchas capas de células. La capa superior es una superficie irregular de células muertas aplastadas (estrato córneo), bajo la cual hay una capa continua de células vivas (estrato córneo compacto) seguida de una típica membrana lipídica y después por los estratos lúcido, granuloso y mucoso. La membrana lipídica es una barrera protectora, pero en las partes velludas de la piel penetran por ella tanto los folículos pilosos como los canales de las glándulas sudoríparas. Así pues, la absorción por la piel puede producirse por cualquiera de los mecanismos siguientes:

- Absorción transepidermica por difusión a través de la membrana (barrera) lipídica, sobre todo de sustancias lipofílicas (disolventes orgánicos, plaguicidas, etc.) y en pequeña medida de algunas sustancias hidrófilas a través de los poros.
- Absorción transfolicular alrededor del tallo del pelo hasta penetrar en el folículo piloso, evitando así la barrera de la membrana; esta absorción se produce únicamente en las zonas de la piel que tienen vello.
- Absorción a través de los conductos de las glándulas sudoríparas, que tienen una sección transversal de entre el 0,1 y el 1 % aproximadamente de la superficie total de piel (la absorción relativa presenta esa misma proporción).
- Absorción a través de la piel cuando ésta sufre lesiones mecánicas, térmicas o químicas o por enfermedades cutáneas; en esos casos se produce una horadación de las capas de la piel, incluida la barrera lipídica, lo que abre la puerta a la entrada de agentes tóxicos y nocivos.

La velocidad de absorción percutánea depende de muchos factores:

- La concentración del tóxico, el tipo de vehículo (medio) y la presencia de otras sustancias.

- El contenido hídrico de la piel, su pH y su temperatura, el flujo sanguíneo local, la transpiración, la superficie de piel contaminada y el grosor de la piel.
- Características anatómicas y fisiológicas de la piel debidas al sexo y la edad, a variaciones individuales, a diferencias entre diversos grupos étnicos y razas, etc.

Transporte de los tóxicos por la sangre y la linfa

Tras ser absorbidos por alguna de esas vías de entrada, los tóxicos llegan a la sangre, la linfa u otros fluidos corporales. La sangre es el principal vehículo de transporte de los tóxicos y sus metabolitos.

La sangre es un órgano líquido en circulación que lleva a las células el oxígeno y las sustancias vitales que necesitan y extrae de ellas los productos de desecho del metabolismo. Contiene asimismo componentes celulares, hormonas y otras moléculas que intervienen en muchas funciones fisiológicas. Impulsada por la actividad del corazón, la sangre corre por el interior de un sistema circulatorio de vasos que es relativamente estanco y que está en condiciones de alta presión. Debido a la alta presión hay una parte del líquido que se escapa del sistema por filtración. El sistema linfático realiza la labor de drenaje gracias a su delicada malla de pequeños capilares linfáticos, de finas paredes, que se ramifican por los tejidos y órganos blandos.

La sangre es una mezcla de una fase líquida (plasma, 55 %) y células sólidas (45 %). El plasma contiene proteínas (albúminas, globulinas, fibrinógeno), ácidos orgánicos (láctico, glutámico, cítrico) y muchas otras sustancias (lípidos, lipoproteínas, glicoproteínas, enzimas, sales, xenobióticos, etc.). Los componentes celulares de la sangre son los eritrocitos (Er), los leucocitos, los reticulocitos, los monocitos y las plaquetas.

Los tóxicos se absorben en forma de moléculas y de iones. En el pH de la sangre, algunos tóxicos forman partículas coloidales, que sería la tercera forma presente en el líquido. Las moléculas, los iones y los coloides de tóxicos se pueden transportar por la sangre de diversas maneras:

- Uniéndose física o químicamente a los componentes de la sangre, sobre todo a los Er.
- Disolviéndose físicamente en el plasma en estado libre.
- Uniéndose a uno o varios tipos de proteínas plasmáticas, formando compuestos con los ácidos orgánicos o enlazándose con otras fracciones del plasma.

En su mayoría, los tóxicos presentes en la sangre se encuentran unos en estado libre en el plasma y otros unidos a los eritrocitos y componentes del plasma. La distribución depende de la afinidad de las sustancias tóxicas por esos componentes. Todas las fracciones se encuentran en un equilibrio dinámico.

Algunos tóxicos son transportados por los elementos de la sangre —sobre todo por los eritrocitos, muy raras veces por los leucocitos. Pueden adsorberse en la superficie de los eritrocitos o pueden unirse a los ligandos estromáticos. Cuando penetran en el eritrocito pueden unirse al hemo (por ejemplo, el monóxido de carbono y el selenio) o a la globina (Sb^{111} , Po^{210}). Algunos de los tóxicos que transportan los eritrocitos son el arsénio, el cesio, el torio, el radón, el plomo y el sodio. El cromo hexavalente se une exclusivamente a los eritrocitos, y el cromo trivalente a las proteínas plasmáticas. En el caso del zinc hay una competencia entre los eritrocitos y el plasma. Alrededor del 96 % del plomo lo transportan los eritrocitos. El mercurio orgánico se une sobre todo a los eritrocitos, mientras que el mercurio inorgánico lo transporta esencialmente la albúmina del plasma. Las fracciones pequeñas de berilio, cobre, telurio y uranio son transportadas por los eritrocitos.

La mayor parte de los tóxicos la transportan el plasma o sus proteínas. Están presentes muchos electrolitos como iones en un

equilibrio con moléculas no disociadas libres o unidas a las fracciones plasmáticas. Esta fracción iónica de los tóxicos es muy difusible, lo que hace que penetre en los tejidos y órganos atravesando las paredes de los capilares. En el plasma puede haber gases y vapores disueltos.

Las proteínas plasmáticas ofrecen a la absorción de tóxicos una superficie total de entre 600 y 800 km². Las moléculas de albúmina poseen alrededor de 109 ligandos catiónicos y 120 aniónicos a disposición de los iones. Muchos iones son transportados parcialmente por la albúmina (por ejemplo el cobre, el zinc y el cadmio), al igual que compuestos como los dinitro- y ortocresoles, los derivados nitro- y halogenados de hidrocarburos aromáticos y los fenoles.

Las moléculas de globulina (alfa y beta) transportan pequeñas moléculas de tóxicos así como algunos iones metálicos (cobre, zinc y hierro) y partículas coloidales. El fibrinógeno tiene afinidad por determinadas moléculas pequeñas. En la unión de las tóxicos con las proteínas plasmáticas participan muchos tipos de enlaces: fuerzas de Van der Waals, atracción de cargas, asociación entre grupos polares y apolares, puentes de hidrógeno y enlaces covalentes.

Las lipoproteínas plasmáticas transportan tóxicos lipofílos como los PCB. Las otras fracciones del plasma son también un vehículo de transporte. La afinidad de los tóxicos por proteínas plasmáticas sugiere su afinidad por proteínas de los tejidos y órganos durante la fase de distribución.

Los ácidos orgánicos (láctico, glutámico, cítrico) forman complejos con algunos tóxicos. Los elementos alcalinotérreos y los pertenecientes al grupo de las tierras raras, así como algunos elementos pesados en forma de cationes, forman complejos asimismo con ácidos orgánicos oxi- y amino. Todos estos complejos son por lo general difusibles y se distribuyen con facilidad por los tejidos y órganos.

Agentes fisiológicamente quelantes del plasma, como la transferrina y la metalotioneína, compiten con los ácidos orgánicos y con los aminoácidos para conseguir cationes con los que formar quelatos estables.

Los iones libres difusibles, algunos complejos y algunas moléculas libres pasan fácilmente de la sangre a los tejidos y órganos. La fracción libre de los iones y moléculas está en equilibrio dinámico con la fracción unida. La concentración de un tóxico en la sangre determinará la velocidad de su distribución por los tejidos y órganos, o su paso de éstos a la sangre.

Distribución de los tóxicos en el organismo

El organismo humano puede dividirse en los compartimentos siguientes: 1) órganos internos, 2) piel y músculos, 3) tejidos adiposos, 4) tejidos conectivos y huesos. Esta clasificación se basa principalmente en el grado de perfusión vascular (sanguínea) en orden de mayor a menor. Por ejemplo, los órganos internos (incluido el cerebro), que representan sólo el 12 % del peso corporal total, reciben alrededor del 75 % del volumen total de sangre. En cambio, los tejidos conectivos y los huesos (15 % del peso corporal total) reciben sólo un 1 % del volumen total de sangre.

Por lo general, los órganos internos, que están muy perfundidos, consiguen la concentración más alta de tóxicos en el tiempo más corto, así como un equilibrio entre la sangre y ese compartimento. La captación de tóxicos por tejidos menos perfundidos es mucho más lenta, pero la retención es superior y el tiempo de permanencia mucho más largo (acumulación) debido a la escasa perfusión.

Hay tres componentes que son de gran importancia para la distribución intracelular de los tóxicos: el contenido de agua, los lípidos y las proteínas presentes en las células de los diversos tejidos y órganos. El orden de compartimentos antes señalado se

corresponde también en gran medida con el orden decreciente de contenido de agua en sus células. Los tóxicos hidrófilos se distribuyen más rápidamente a los fluidos y células del cuerpo que tienen un alto contenido de agua, y los tóxicos lipófilos a las células que tienen un mayor contenido de lípidos (tejido graso).

El organismo posee algunas barreras que obstaculizan la penetración de algunos grupos de tóxicos, sobre todo los hidrófilos, en determinados órganos y tejidos, como por ejemplo las siguientes:

- La barrera hematoencefálica (o cerebroespinal), que limita la entrada de moléculas grandes y tóxicos hidrófilos en el cerebro y el SNC; consiste en una capa muy tupida de células endoteliales; pueden atravesarla por tanto los tóxicos lipófilos.
- La barrera placentaria, que tiene un efecto similar sobre la penetración de los tóxicos en el feto desde la sangre de la madre.
- La barrera histohematológica en las paredes de los capilares, que es permeable para las moléculas de tamaño pequeño y mediano y para algunas de las de mayor tamaño, así como para los iones.

Como se ha señalado anteriormente, sólo las formas libres de los tóxicos en el plasma (moléculas, iones, coloides) están disponibles para penetrar por las paredes de los capilares que participan en la distribución. Esa fracción libre está en equilibrio dinámico con la fracción unida. La concentración de los tóxicos en la sangre está en equilibrio dinámico con su concentración en los órganos y tejidos, lo que determina su retención (acumulación) o su salida de ellos.

Afectan también a la distribución el estado general del organismo, el estado funcional de los órganos (especialmente la regulación neurohumoral), el equilibrio hormonal y otros factores.

La retención de un tóxico en un determinado compartimento es por lo general temporal, y puede redistribuirse a otros tejidos. La retención y la acumulación se basan en la diferencia entre las velocidades de absorción y eliminación. La duración de la retención en un compartimento se expresa mediante la vida media biológica, que es el tiempo que tarda en reducirse al 50 % la cantidad de tóxico presente en el tejido u órgano, por redistribución, translocación o eliminación del organismo.

Durante la distribución y la retención en diversos órganos y tejidos tienen lugar procesos de biotransformación. Esta produce metabolitos más polares y más hidrófilos, que se eliminan con más facilidad. Una velocidad de biotransformación baja de un tóxico lipófilo tiene por lo general como consecuencia su acumulación en un compartimento.

Desde el punto de vista de su afinidad, de su tendencia a retenerte y acumularse en un determinado compartimento, los tóxicos pueden dividirse en cuatro grupos principales:

1. Los tóxicos solubles en los fluidos corporales, que se distribuyen de manera uniforme en función del contenido de agua de los compartimentos. De esta forma se distribuyen muchos cationes monovalentes (por ejemplo, litio, sodio, potasio o rubidio) y algunos aniones (por ejemplo, cloro o bromo).
2. Los tóxicos lipófilos, que presentan una fuerte afinidad por los órganos y tejidos que son ricos en lípidos (SNC y tejido graso y adiposo respectivamente).
3. Los tóxicos que forman partículas coloidales, que son atrapadas por células especializadas del sistema reticuloendotelial (SRE) de los órganos y tejidos. Los cationes tri y tetravalentes (lantano, cesio, hafnio) se distribuyen en el SRE de los tejidos y órganos.
4. Los tóxicos que presentan una fuerte afinidad por los huesos y el tejido conectivo (elementos osteotrópicos o “buscadores de hueso”), como los cationes divalentes (por ejemplo, calcio, bario, estroncio, radón, berilio, aluminio, cadmio o plomo).

Acumulación en tejidos ricos en lípidos

En el “hombre estándar” de 70 kg , alrededor del 15 % del peso corporal es tejido adiposo, proporción que con la obesidad puede llegar hasta el 50 %. Pero esa fracción lípida no está distribuida de manera uniforme. El cerebro (SNC) es un órgano rico en lípidos, y los nervios periféricos están rodeados por las células de Schwann, ricas en lípidos, que constituyen la llamada vaina de mielina. Todos estos tejidos se prestan a la acumulación de tóxicos lipófilos. En este compartimento se pueden distribuir numerosos tóxicos no electrólitos y no polares que tengan un coeficiente de partición de Nernst adecuado, así como numerosos disolventes orgánicos (alcoholes, aldehídos, cetonas, etc.), hidrocarburos clorados (incluidos insecticidas organoclorados como el DDT), algunos gases inertes (radón), etc.

En el tejido adiposo se acumulan tóxicos debido a su escasa vascularización y a su menor velocidad de biotransformación. En este caso la acumulación de tóxicos puede ser una especie de “neutralización” temporal, pues no hay dianas para el efecto tóxico. No obstante, siempre hay un peligro potencial para el organismo, pues los tóxicos presentes en este compartimento pueden volver a la circulación.

El depósito de tóxicos en el cerebro (SNC) o en el tejido rico en lípidos de la vaina de mielina del sistema nervioso periférico es muy peligroso. Los neurotóxicos se depositan aquí directamente junto a sus dianas. Los tóxicos retenidos en el tejido rico en lípidos de las glándulas endocrinas pueden producir trastornos hormonales. Pese a la barrera hematoencefálica, son muchos los neurotóxicos de carácter lipófilo que llegan al cerebro (SNC): anestésicos, disolventes orgánicos, plaguicidas, tetraetilplomo, organomercuriales, etc.

Retención en el sistema reticuloendotelial

En cada tejido y órgano hay un determinado porcentaje de las células que está especializado en la actividad fagocitaria, es decir, en capturar microorganismos, partículas, coloides, etc. Es lo que se llama el sistema reticuloendotelial (SRE), que comprende células tanto fijas como móviles (fagocitos). Estas células están presentes en forma no activa. El incremento del número de esos microbios o de esas partículas activa las células hasta llegar a un punto de saturación.

Los tóxicos en forma de coloides son capturados por el SRE de los órganos y tejidos. La distribución depende del tamaño de las partículas coloidales. Las mayores se retienen preferentemente en el hígado. Cuando son de menor tamaño, se produce una distribución más o menos uniforme entre el bazo, la médula ósea y el hígado. La eliminación de los coloides desde el SRE es muy lenta, aunque las partículas pequeñas se eliminan algo más deprisa.

Acumulación en los huesos

Se han identificado unos 60 elementos que son osteotrópicos, es decir, “buscadores de hueso”.

Los elementos osteotrópicos pueden dividirse en tres grupos:

1. Elementos que representan o sustituyen a componentes fisiológicos del hueso. De veinte de ellos hay cantidades considerables, mientras que los demás están presentes como elementos traza. En condiciones de exposición crónica, también pueden penetrar en la matriz mineral de las células óseas metales tóxicos como el plomo, el aluminio y el mercurio.
2. Los elementos alcalinotérreos y otros elementos que forman cationes y que tienen un diámetro iónico similar al del calcio son intercambiables con éste en el mineral óseo. Asimismo, algunos aniones son intercambiables con aniones (fósforo, hidroxilo) del mineral óseo.

3. Elementos que forman microcoloides (tierras raras) pueden adsorberse en la superficie del mineral óseo.

El esqueleto de un “hombre estándar” representa del 10 al 15 % del peso corporal total, lo que ofrece grandes posibilidades para el depósito de tóxicos osteotrópicos. El hueso es un tejido sumamente especializado que está integrado, en volumen, por un 54 % de minerales y un 38 % de matriz orgánica. La matriz mineral del hueso es hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, en la que la relación Ca/P es más o menos de 1,5/1. La superficie de mineral en que puede producirse la adsorción es de aproximadamente 100 m^2 por g de hueso.

La actividad metabólica de los huesos del esqueleto puede dividirse en dos categorías:

- el hueso metabólico activo, en el que se producen con gran amplitud procesos de resorción y formación de hueso nuevo, o de remodelación del hueso existente
- el hueso estable, que tiene una tasa baja de remodelación o crecimiento.

En el feto, los recién nacidos y los niños de corta edad, el hueso metabólico (o “esqueleto disponible”) representa casi el 100 % del esqueleto. Con la edad la proporción de hueso metabólico se va reduciendo. La incorporación de tóxicos durante la exposición aparece en el hueso metabólico y en compartimentos de renovación más lenta.

La incorporación de tóxicos al hueso se efectúa de dos maneras:

1. En el caso de los iones, se produce un intercambio con los cationes de calcio fisiológicamente presentes, o con los aniones (fósforo, hidroxilo).
2. En el caso de los tóxicos que forman partículas coloidales, se produce una adsorción en la superficie mineral.

Reacciones de intercambio de iones

El mineral óseo, la hidroxiapatita, presenta un complejo sistema de intercambio de iones. Los cationes de calcio pueden intercambiarse con otros cationes diversos. Los aniones presentes en el hueso también se pueden intercambiar con otros aniones: fosfato con citrato y carbonato, hidroxilo con flúor. Los iones que no son intercambiables pueden adsorberse en la superficie mineral. Cuando se incorporan iones tóxicos al mineral, la superficie puede cubrirse con una nueva capa de mineral, integrando el tóxico en la estructura del hueso. El intercambio de iones es un proceso reversible, y depende de la concentración de iones, el pH y el volumen del fluido. Así, por ejemplo, un incremento del calcio en la dieta puede reducir el depósito de iones tóxicos en la retícula mineral. Ya se ha señalado que el porcentaje de hueso metabólico desciende con la edad, aunque el intercambio de iones continúa. Con el paso de los años se produce una resorción del mineral óseo que resta efectivamente densidad al hueso. En ese punto pueden liberarse tóxicos presentes en el hueso (plomo por ejemplo).

Alrededor del 30 % de los iones que se incorporan a los minerales óseos están unidos más débilmente y pueden ser objeto de intercambio, de captura por agentes quelantes naturales y de excreción, con una vida media biológica de 15 días. El otro 70 % está unido con más fuerza. La movilización y excreción de esa fracción presenta una vida media biológica de 2,5 años o más según el tipo de hueso (procesos de remodelación).

Los agentes quelantes (Ca-EDTA, penicilamina, BAL, etc.) pueden movilizar cantidades considerables de algunos metales pesados, e incrementar en gran medida su excreción por la orina.

Adsorción de coloides

Las partículas coloidales se adsorben como una película en la superficie mineral (100 m^2 por g) por la acción de las fuerzas de Van der Waals o por quimiadsorción. Una vez en la superficie mineral, esta capa de coloides se recubre con la capa siguiente de minerales formados, con lo que los tóxicos se entierran aún más en la estructura del hueso. La tasa de movilización y eliminación depende de los procesos de remodelación.

Acumulación en el pelo y las uñas

El pelo y las uñas contienen queratina, con grupos sulfhidrilo capaces de quelar cationes metálicos como el mercurio y el plomo.

Distribución del tóxico en el interior de la célula

Recientemente ha cobrado importancia la cuestión de la distribución de los tóxicos, en especial de algunos metales pesados, en el interior de las células de tejidos y órganos. Gracias a las técnicas de ultracentrifugación, se pueden separar diversas fracciones de la célula para determinar su contenido de iones metálicos y otros tóxicos.

Estudios con animales han revelado que, una vez que han penetrado en la célula, algunos iones metálicos se unen a una proteína concreta, la metalotioneína. Esta proteína, de bajo peso molecular, está presente en las células del hígado, el riñón y otros órganos y tejidos. Sus grupos sulfhidrilo pueden unirse a seis iones por molécula. Una mayor presencia de iones metálicos induce la biosíntesis de esta proteína. El inductor más potente son los iones de cadmio. La metalotioneína sirve también para mantener la homeostasis de los vitales iones de cobre y zinc. Puede unirse al zinc, el cobre, el cadmio, el mercurio, el bismuto, el oro, el cobalto y otros cationes.

Biotransformación y eliminación de los tóxicos

Mientras están retenidos en las células de diversos tejidos y órganos, los tóxicos están expuestos a enzimas que pueden biotransformarlos (metabolizarlos), produciendo metabolitos. Hay muchas vías para la eliminación de los tóxicos y/o metabolitos: en el aire espirado por el pulmón, en la orina a través del riñón, en la bilis a través del TGI, en el sudor a través de la piel, en la saliva a través de la mucosa de la boca, en la leche a través de las glándulas mamarias, y en el pelo y las uñas a través del crecimiento y recambio celulares normales.

La eliminación de un tóxico absorbido depende de la ruta de entrada. En el pulmón, el proceso de absorción/desorción se inicia inmediatamente, y los tóxicos se eliminan parcialmente con el aire espirado. La eliminación de tóxicos absorbidos por otras rutas es un proceso prolongado y se inicia una vez que han sido transportados por la sangre, para acabar completándose después de su distribución y biotransformación. Durante la absorción existe un equilibrio entre las concentraciones de un tóxico en la sangre y en los tejidos y órganos. La excreción reduce su concentración en la sangre y puede inducir su paso de los tejidos a la sangre.

En la velocidad de eliminación de los tóxicos y de sus metabolitos influyen numerosos factores:

- Las propiedades fisicoquímicas de los tóxicos, en especial el coeficiente de partición de Nernst (P), la constante de disociación (pK_a), la polaridad, la estructura molecular, la forma y el peso.
- El nivel de exposición y el tiempo de eliminación desde la exposición.
- La ruta de entrada.

- los compartimentos corporales en los que se hayan distribuido, pues tienen distintas velocidades de intercambio con la sangre y distintos grados de perfusión sanguínea
- la velocidad de la biotransformación de tóxicos lipófilos a metabolitos más hidrófilos
- el estado de salud general del organismo y, en especial, de los órganos excretores (pulmón, riñón, TGI, piel, etc.)
- la presencia de otros tóxicos que pueden interferir en la eliminación

Cabe distinguir a este respecto dos grupos de compartimentos: 1) el *sistema de intercambio rápido* —en estos compartimentos, la concentración de tóxico en el tejido es similar a la de la sangre; y 2) el *sistema de intercambio lento*, donde la concentración del tóxico en el tejido es más alta que en la sangre debido a los fenómenos de unión y acumulación —el tejido adiposo, el esqueleto y el riñón pueden retener temporalmente algunas sustancias, como por ejemplo el arsénico y el zinc.

Un tóxico puede excretarse simultáneamente por dos o más vías excretoras, aunque lo normal es que predomine una de ellas.

Los científicos están elaborando modelos matemáticos para describir la excreción de un tóxico determinado. Esos modelos se basan en el movimiento de salida desde uno de los compartimentos o de los dos (sistema de intercambio), en la biotransformación, etc.

Eliminación en el aire espirado por el pulmón

La eliminación por el pulmón (desorción) es típica de los tóxicos muy volátiles (como por ejemplo los disolventes orgánicos). Los gases y vapores que son poco solubles en la sangre se eliminan rápidamente por esta vía, mientras que los tóxicos que son muy solubles en la sangre se eliminan por otras vías.

Los disolventes orgánicos absorbidos por el TGI o por la piel se excretan parcialmente en el aire espirado en cada paso de la sangre por el pulmón, siempre que tengan una presión de vapor suficiente. Este es el fundamento de los alcoholímetros que se utilizan para comprobar si un conductor está en estado de embriaguez. La concentración de CO en el aire espirado está en equilibrio con el contenido de CO-Hb en la sangre. El gas radiactivo radón aparece en el aire espirado debido a la desintegración del radio acumulado en el esqueleto.

La eliminación de un tóxico en el aire espirado en relación con el tiempo transcurrido desde la exposición suele expresarse mediante una curva de tres fases. La primera fase representa la eliminación de la sustancia desde la sangre, con una vida media corta. La segunda fase, más lenta, representa la eliminación debida al intercambio entre la sangre y los tejidos y órganos (sistema de intercambio rápido). La tercera fase, sumamente lenta, indica el intercambio entre la sangre y el tejido graso y el esqueleto. Si un tóxico no se ha acumulado en esos compartimentos, la curva será de dos fases. En algunos casos es posible también una curva de cuatro fases.

Una forma de evaluar las exposiciones profesionales es determinar los gases y vapores presentes en el aire espirado en el tiempo transcurrido desde la exposición.

Excreción renal

El riñón es un órgano especializado en la excreción de numerosos tóxicos y metabolitos hidrosolubles, lo que contribuye a mantener la homeostasis del organismo. Cada riñón posee alrededor de un millón de nefrones capaces de realizar la función excretora. La excreción renal es un hecho sumamente complejo que comprende tres mecanismos distintos:

- La filtración glomerular por la cápsula de Bowman.
- El transporte activo en el túbulos proximal.
- El transporte pasivo en el túbulos distal.

La excreción renal de un tóxico por la orina depende del coeficiente de partición de Nernst, la constante de disociación, el pH de la orina, el tamaño y forma de las moléculas, la velocidad de la conversión metabólica en metabolitos más hidrófilos y el estado de salud del riñón.

La cinética de la excreción renal de un tóxico o de su metabolito puede expresarse en una curva de dos, tres o cuatro fases, según cuál sea la distribución de la sustancia en los diversos compartimentos corporales, que presentan distintas tasas de intercambio con la sangre.

Saliva

Algunos fármacos e iones metálicos pueden excretarse en la saliva a través de la mucosa de la boca —por ejemplo, el plomo (“línea del plomo”), el mercurio, el arsénico y el cobre, así como bromuros, yoduros, alcohol etílico, alcoholes, etc. Después los tóxicos se deglutan y llegan al TGI, donde pueden reabsorberse o eliminarse en las heces.

Sudor

Muchos no electrólitos pueden eliminarse parcialmente por la piel en el sudor: alcohol etílico, acetona, fenoles, disulfuro de carbono e hidrocarburos clorados.

Leche

Muchos metales y disolventes orgánicos y algunos plaguicidas organoclorados (DDT) se segregan a través de la glándula mamaria en la leche materna. Esta vía puede ser peligrosa para los niños lactantes.

Pelo

Puede utilizarse el análisis del pelo como indicador de la homeostasis de algunas sustancias fisiológicas. También puede evaluarse mediante este tipo de bioensayo la exposición a algunos tóxicos, especialmente los metales pesados.

La eliminación de tóxicos del organismo puede incrementarse recurriendo a métodos como los siguientes:

- translocación mecánica mediante lavado gástrico, transfusión de sangre o diálisis
- creación de condiciones fisiológicas que movilicen los tóxicos a través de la dieta, modificando el equilibrio hormonal o mejorando la función renal mediante la administración de diuréticos
- la administración de agentes que forman complejos (citratos, oxalatos, salicilatos, fosfatos) o quelatos (Ca-EDTA, BAL, ATA, DMSA, penicilamina); este método está indicado sólo en personas sometidas a estricto control médico. Suelen administrarse, como medida terapéutica, agentes quelantes para eliminar metales pesados del organismo de trabajadores expuestos. Este método se utiliza también para evaluar la carga corporal total y el nivel de una exposición anterior.

Determinaciones de la exposición

La determinación de los tóxicos y los metabolitos presentes en la sangre, el aire espirado, la orina, el sudor, las heces y el pelo es un método cada vez más empleado para evaluar la exposición humana (ensayos de exposición) y/o el grado de intoxicación. Esta es la razón de que se hayan establecido recientemente límites de exposición biológica (valores de concentración máxima permisible (MAC), índices de exposición biológica (BEI). Mediante estos bioensayos se halla la “exposición interna” del organismo, es decir, su exposición total tanto en el medio ambiente profesional como en el general, y debida a todas las rutas de entrada (véase “Biomarcadores” en “Métodos de ensayo en toxicología”).

Efectos combinados debidos a la exposición múltiple

En el medio ambiente profesional y/o general, las personas suelen estar expuestas simultánea o consecutivamente a diversos agentes físicos y químicos. Hay que tener en cuenta también que algunas personas toman fármacos, fuman, consumen alcohol y alimentos que contienen aditivos, etc. Esto significa que lo más frecuente es que se produzca una exposición múltiple. Los agentes físicos y químicos pueden interactuar entre sí en cada fase de los procesos toxicocinéticos y/o toxicodinámicos, con el resultado de tres posibles efectos:

1. *Independiente*. Cada agente produce un efecto distinto debido a que sus mecanismos de acción son distintos.
2. *Sinérgico*. El efecto combinado es mayor que el de cada agente por separado. Aquí se pueden distinguir dos tipos: a) aditivo, cuando el efecto combinado es igual a la suma de los efectos producidos por separado por cada agente, y b) potenciador, cuando el efecto combinado es mayor que la suma de los efectos individuales.
3. *Antagonista*. El efecto combinado es menor que la suma de los efectos individuales.

No obstante, raras veces se estudian los efectos combinados. Se trata de estudios muy complejos por la combinación de diversos factores y agentes.

Cabe concluir que cuando el organismo humano está expuesto de manera simultánea o consecutiva a dos o más tóxicos es necesario considerar la posibilidad de que existan algunos efectos combinados, que pueden acelerar o desacelerar los procesos toxicocinéticos.

● ORGANO DIANA Y EFECTOS CRITICOS

Marek Jakubowski

El objetivo prioritario de la toxicología profesional y ambiental es mejorar la prevención o la limitación sustancial de los efectos que tiene sobre la salud la exposición a agentes peligrosos en el medio ambiente general y profesional. Con ese fin se han elaborado sistemas para evaluar cuantitativamente el riesgo relacionado con una determinada exposición (véase "Toxicología reguladora").

Los efectos de una sustancia química sobre un determinado sistema u órgano están relacionados con la magnitud de la exposición y con el carácter agudo o crónico de ésta. Habida cuenta de la diversidad de efectos tóxicos que se producen incluso en un solo sistema u órgano, se ha propuesto una línea de pensamiento uniforme acerca del órgano crítico y el efecto crítico con miras a evaluar los riesgos y desarrollar "concentraciones límite recomendadas basadas en criterios de salud para las sustancias tóxicas" presentes en los diferentes medios ambientales.

Desde el punto de vista de la medicina preventiva es especialmente importante la identificación precoz de los efectos adversos, sobre la base del supuesto general de que la prevención o la limitación de los primeros efectos pueden impedir que aparezcan otros efectos más graves.

Este planteamiento se ha aplicado a los metales pesados. Aunque los metales pesados, como el plomo, el cadmio y el mercurio, pertenecen a un grupo específico de tóxicos en el que el efecto crónico de su actividad depende de su acumulación en los órganos, las definiciones que se ofrecen a continuación fueron publicadas por el Grupo de Trabajo sobre Toxicidad de los Metales (Nordberg 1976).

Se ha adoptado la definición de órgano crítico que propuso este grupo de trabajo, pero con una leve modificación: se ha

sustituido el término *metal* por la expresión *sustancia potencialmente tóxica* (Duffus 1993).

El que un determinado órgano o sistema se considere crítico depende no sólo de la toximecánica del agente peligroso, sino también de la vía de absorción y de la población expuesta.

- *Concentración celular crítica*: la concentración en la que se producen en la célula cambios funcionales adversos, sean reversibles o irreversibles.
- *Concentración crítica en un órgano*: la concentración media en el órgano en el momento en el que el tipo más sensible de células del órgano alcanza la concentración crítica.
- *Órgano crítico*: el órgano que primero alcanza la concentración crítica del metal en determinadas circunstancias de exposición y en una población dada.
- *Efecto crítico*: punto definido en la relación entre la dosis y el efecto en el individuo, a saber, el punto en el que se produce un efecto adverso en la función celular del órgano crítico. A un nivel de exposición inferior al que provoca una concentración crítica del metal en el órgano crítico, pueden producirse algunos efectos que no deterioran la función celular en sí, aunque son detectables por medio de pruebas bioquímicas y de otro tipo. Esos efectos se denominan *efectos subcríticos*.

En ocasiones no está claro el significado biológico de la expresión "efecto subcrítico"; puede equivaler a un biomarcador de exposición, a un índice de adaptación o a un precursor del efecto crítico (véase "Biomarcadores" en "Métodos de ensayo en toxicología"). Esta última posibilidad puede ser especialmente importante de cara a las actividades profilácticas.

En la Tabla 33.1 se ofrecen ejemplos de órganos y efectos críticos respecto de diferentes sustancias químicas. En la exposición ambiental crónica al cadmio, donde la ruta de absorción es de importancia menor (las concentraciones de cadmio en el aire oscilan entre 10 y 20 µg/m³ en las zonas urbanas y entre 1 y 2 µg/m³ en las zonas rurales), el órgano crítico es el riñón. En el contexto profesional, donde el TLV llega a 50 µg/m³ y la principal ruta de exposición es la inhalación, se consideran críticos dos órganos: el pulmón y el riñón.

En el caso del plomo, los órganos críticos en los adultos son el sistema hematopoyético y el sistema nervioso periférico, donde los efectos críticos (por ejemplo una elevada concentración de protoporfirina eritrocitaria libre (FEP), un aumento de la excreción de ácido delta-aminolevulínico en la orina o un deterioro de la conducción de los nervios periféricos) se manifiestan cuando el nivel de plomo en sangre (que es un índice de la absorción de plomo en el sistema) se acerca a 200-300 µg/l. En los niños pequeños el órgano crítico es el sistema nervioso central (SNC), y se ha comprobado que los síntomas de disfunción detectados con el uso de una batería de pruebas psicológicas aparecen en las poblaciones examinadas incluso a concentraciones del orden de unos 100 µg/l de plomo en la sangre.

Se han formulado otras definiciones que quizás reflejen mejor el significado de este concepto. Según la OMS (1989), el efecto crítico es "el primer efecto adverso que aparece cuando se alcanza en el órgano crítico el umbral de concentración o dosis (crítica). Los efectos adversos que, como el cáncer, no tienen un umbral de concentración definido suelen considerarse críticos. La decisión de si un efecto es crítico o no es una cuestión de juicio de experto". En las directrices para elaborar los *Environmental Health Criteria Documents* del Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS), el efecto crítico se describe como "el efecto adverso que se considera más adecuado para determinar la cantidad tolerable que puede entrar en el cuerpo". Esta última definición se formuló directamente con miras a evaluar los límites de exposición en el medio ambiente.

Tabla 33.1 • Ejemplos de órganos críticos y efectos críticos.

Sustancia	Órgano crítico en exposición crónica	Efecto crítico
Cadmio	Pulmón	<u>Sin umbral:</u> Cáncer de pulmón (unidad riesgo $4,6 \times 10^{-3}$)
	Riñón	<u>Con umbral:</u> Mayor excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular (b_2 -M, RBP)
Plomo	Pulmón	Enfisema, leves cambios funcionales
	Adultos Sistema hematopoyético	Mayor excreción urinaria de ácido delta-aminolevúlico (ALA-U); mayor concentración de protoporfirina eritrocitaria libre (FEP) en los eritrocitos
Mercurio (elemental)	Sistema nervioso periférico	Menor velocidad de conducción del impulso nervioso en las fibras lentes
	Niños de corta edad	Descenso del Cl y otros efectos sutiles; temblor mercurial (dedos, labios, párpados)
Mercurio (mercúrico)	Sistema nervioso central	Proteinuria
	Riñón	
Manganese	Adultos	Deterioro de funciones psicomotoras
	Niños Pulmón	Síntomas respiratorios
Tolueno	Sistema nervioso central	Deterioro de funciones psicomotoras
	Membranas mucosas	Irritación
Cloruro de vinilo	Hígado	Cáncer (angiosarcoma, unidad riesgo 1×10^{-6})
Acetato de etilo	Membranas mucosas	Irritación

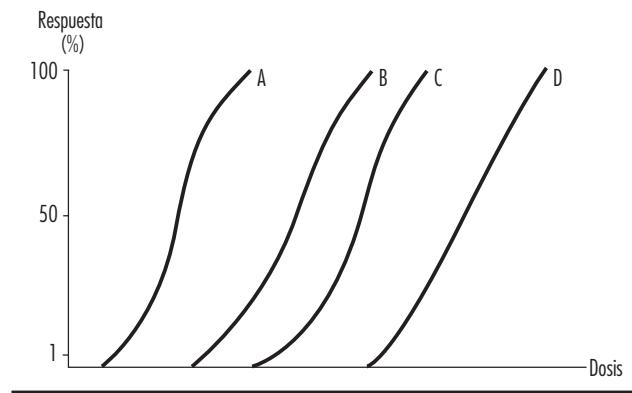
general, basados en consideraciones de salud. En este contexto, parece que lo más esencial es determinar qué efecto puede considerarse adverso. Conforme a la terminología actual, el efecto adverso es el “cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo o tiempo de vida de un organismo que tiene como resultado un deterioro de la capacidad de compensar una tensión adicional o un aumento de la susceptibilidad a los efectos nocivos de otras influencias ambientales. La decisión de si un efecto es adverso o no es una cuestión que requiere el juicio del experto”.

En la Figura 33.1 se presentan curvas de dosis-respuesta hipotéticas respecto de diversos efectos. En el caso de la exposición al plomo, A puede representar un efecto subcrítico (inhibición de la ALA-deshidratasa eritrocitaria), B el efecto crítico (incremento de la zinc-protoporfirina eritrocitaria o incremento de la excreción de ácido delta-aminolevúlico), C el efecto clínico (anemia) y D el efecto letal (muerte). En el caso de la exposición al plomo está ampliamente demostrado que determinados efectos de la exposición dependen de la concentración de plomo en la sangre (contrapartida práctica de la dosis), ya sea en forma de relación dosis-respuesta o en relación con diferentes variables (sexo, edad, etc.). La determinación de los efectos críticos y de la relación dosis-respuesta correspondiente a esos efectos en los seres humanos permite predecir la frecuencia de un efecto dado a una determinada dosis o su contrapartida (concentración en el material biológico) en una población.

Los efectos críticos pueden ser de dos tipos: los que se estima que tienen un umbral y aquellos otros en los que puede haber cierto riesgo a cualquier nivel de exposición (carcinógenos genotóxicos y mutágenos de células germinales: sin umbral). Siempre que sea posible, la evaluación del riesgo se ha de basar en datos humanos adecuados. Para determinar los efectos con umbral en la población general se han de elaborar hipótesis sobre el nivel de exposición (cantidad tolerable que puede entrar en el cuerpo, biomarcadores de la exposición) como es que la frecuencia del

efecto crítico en la población expuesta a un agente peligroso dado se corresponda con la frecuencia de ese efecto en la población general. En la exposición al plomo, la concentración máxima de plomo en sangre recomendada para la población general ($200 \text{ } \mu\text{g/l}$, mediana inferior a $100 \text{ } \mu\text{g/l}$) (OMS 1987) está prácticamente por debajo del valor de umbral del efecto crítico supuesto (alto nivel de protoporfirina eritrocitaria libre), aunque no por debajo del nivel asociado a los efectos sobre el SNC en los niños o sobre la tensión arterial en los adultos. En general, cuando la evaluación de la seguridad se basa en los datos obtenidos en estudios bien hechos sobre poblaciones humanas que definen un nivel sin efecto adverso observable, se considera adecuado aplicar un factor de incertidumbre de 10. En el caso de la exposición profesional, los efectos críticos pueden referirse a una determinada parte de la población (por ejemplo el 10%). En consecuencia, en la exposición profesional al plomo la

Figura 33.1 • Curvas hipotéticas de dosis-respuesta para diversos efectos.



concentración de plomo en sangre recomendada basada en criterios de salud se ha establecido en 400 mg/l en los hombres donde un 10 % de la población presenta un nivel de ALA-U de 5 mg/l como respuesta a unas concentraciones de PbB de 300 a 400 mg/l. En el caso de la exposición laboral al cadmio (partiendo de que el efecto crítico es el aumento de la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular), se ha estimado como valor admisible un nivel de 200 ppm de cadmio en la zona cortical del riñón, pues ese efecto se ha observado en el 10 % de la población expuesta. En muchos países se está considerando actualmente (es decir, en 1996) la posibilidad de rebajar estos dos valores.

No hay un consenso claro sobre la metodología adecuada para evaluar el riesgo de las sustancias químicas en las que el efecto crítico puede no tener umbral, como los carcinógenos genotóxicos. Para la evaluación de esos efectos se han adoptado diversos enfoques basados en gran parte en la caracterización de la relación dosis-respuesta. Como en el plano social y político no se acepta el riesgo de los carcinógenos para la salud, en documentos tales como las *Air Quality Guidelines for Europe* (OMS 1987) se ofrecen únicamente, para los efectos sin umbral, valores como la unidad riesgo a lo largo de toda la vida (es decir, el riesgo asociado a la exposición a lo largo de toda la vida a 1 µg/m³ del agente peligroso) (véase "Toxicología reguladora").

En la actualidad, el componente básico de las actividades de evaluación del riesgo es la determinación del órgano crítico y los efectos críticos. Las definiciones tanto de efecto crítico como de efecto adverso reflejan la responsabilidad de decidir qué efectos de entre los que se observan en un determinado órgano o sistema deben considerarse críticos, y ello está directamente relacionado con la determinación ulterior de los valores recomendados respecto de una determinada sustancia química en el medio ambiente general —por ejemplo, las *Air Quality Guidelines for Europe* (OMS 1987) o los límites de exposición laboral basados en criterios de salud (OMS 1980). Determinar el efecto crítico desde el intervalo de efectos subcríticos puede llevar a una situación en la que los límites recomendados sobre concentraciones de sustancias tóxicas en el medio ambiente general o profesional quizás sean en la práctica imposibles de mantener. Es posible que considerar como crítico un efecto que puede superponerse a los efectos clínicos tempranos lleve a adoptar valores con los que pueden desarrollarse efectos adversos en una parte de la población. La decisión de considerar crítico o no un determinado efecto sigue siendo responsabilidad de los grupos de expertos especializados en toxicidad y evaluación del riesgo.

● EFECTOS DE LA EDAD, EL SEXO Y OTROS FACTORES

Spomenka Telišman

Suele haber entre los seres humanos amplias diferencias en la intensidad de la respuesta a las sustancias químicas tóxicas, así como variaciones en la susceptibilidad de un individuo a lo largo de su vida. Ello puede atribuirse a diversos factores que pueden afectar a la velocidad de absorción, la distribución en el cuerpo y la velocidad de biotransformación y/o excreción de una determinada sustancia. Aparte de los factores hereditarios conocidos, cuya relación con el aumento de la susceptibilidad a la toxicidad química en los seres humanos está claramente demostrada (véase "Determinantes genéticos de la respuesta tóxica"), intervienen factores como los siguientes: las características constitucionales relacionadas con la edad y el sexo; los estados patológicos preexistentes o un deterioro de la función de un órgano (no hereditario,

es decir, adquirido); los hábitos alimentarios, el hábito de fumar, el consumo de alcohol y el empleo de fármacos; la exposición concomitante a biotoxinas (diversos microorganismos) y a factores físicos (radiación, humedad, temperaturas sumamente bajas o altas o presiones barométricas especialmente idóneas para la presión parcial de un gas), así como situaciones concomitantes de ejercicio físico o tensión psicológica, y las exposiciones anteriores, profesionales y/o ambientales, a una determinada sustancia, en particular la exposición concomitante a otras sustancias *no* necesariamente tóxicas (por ejemplo, a metales esenciales). Las posibles contribuciones de estos factores al aumento o la reducción de la susceptibilidad a efectos adversos sobre la salud, así como sus mecanismos de acción, son específicos de cada sustancia química. Por consiguiente, en esta sección se presentarán únicamente los factores más comunes, los mecanismos básicos y algunos ejemplos característicos; el lector interesado en información específica sobre una determinada sustancia química podrá encontrarla en otras secciones de la *Enciclopedia*.

Según la fase en la que actúan estos factores (absorción, distribución, biotransformación o excreción de la sustancia), los mecanismos pueden clasificarse en general en dos categorías basadas en las consecuencias básicas de la interacción: 1) un cambio en la cantidad de sustancia presente en un órgano diana, es decir, en el lugar o lugares del organismo en que produce su efecto (interacciones toxicocinéticas), o 2) un cambio en la intensidad de una respuesta específica a la cantidad de sustancia presente en un órgano diana (interacciones toxicodinámicas). En ambos tipos de interacción, los mecanismos más frecuentes están relacionados con la competencia con otra u otras sustancias por unirse a los mismos compuestos que intervienen en su transporte por el organismo (por ejemplo, proteínas específicas del suero) y/o por utilizar una misma vía de biotransformación (por ejemplo, unas enzimas determinadas), lo que tiene como consecuencia un cambio en la velocidad o secuencia con que se pasa de la reacción inicial al efecto adverso final sobre la salud. No obstante, tanto las interacciones toxicocinéticas como las toxicodinámicas pueden influir en la susceptibilidad individual a una determinada sustancia química. La influencia de varios factores concomitantes puede producir tres tipos de efectos: a) *efectos aditivos*: la intensidad del efecto combinado es igual a la suma de los efectos de los diversos factores por separado, b) *efectos sinérgicos*: la intensidad del efecto combinado es superior a la suma de los efectos de los diversos factores por separado, o c) *efectos antagonistas*: la intensidad del efecto combinado es inferior a la suma de los efectos de los diversos factores por separado.

La cantidad de una sustancia tóxica o de su metabolito característico en el lugar o lugares en que producen su efecto en el cuerpo humano puede determinarse con más o menos exactitud mediante control biológico, es decir, eligiendo el espécimen biológico correcto y el momento óptimo para obtener la muestra, teniendo en cuenta las vidas medias biológicas de esa sustancia tanto en el órgano crítico como en el compartimento biológico que se mide. No obstante, en general falta información fiable sobre otros posibles factores que podrían influir en la susceptibilidad individual entre los humanos, y en consecuencia los conocimientos que tenemos sobre la influencia de diversos factores se basan en su mayoría en datos obtenidos en animales de experimentación.

Hay que subrayar que en algunos casos existen diferencias relativamente grandes entre los humanos y otros mamíferos en cuanto a la intensidad de la respuesta a un nivel y/o duración equivalentes de la exposición a muchas sustancias tóxicas; por ejemplo, parece que los humanos son considerablemente más sensibles que las ratas (animales que se emplean con frecuencia en los estudios experimentales) a los efectos adversos que producen sobre la salud varios metales tóxicos. Algunas de esas

diferencias pueden atribuirse al hecho de que las vías de transporte, distribución y biotransformación de diversas sustancias dependen en gran medida de cambios sutiles en el pH tisular y en el equilibrio redox del organismo (como ocurre con la actividad de diversas enzimas), y también al hecho de que el sistema redox de los humanos es considerablemente distinto del de las ratas.

Así ocurre evidentemente en el caso de importantes antioxidantes como la vitamina C y el glutatión (GSH), que son esenciales para mantener el equilibrio redox y que desempeñan una función de protección contra los efectos adversos de los radicales libres derivados del oxígeno o de un xenobiótico que intervienen en diversos estados patológicos (Kehrer 1993). A diferencia de la rata, el hombre no puede autosintetizar la vitamina C, y tanto los niveles como la velocidad de recambio del GSH eritrocitario son en el hombre considerablemente inferiores a los de la rata. Los humanos carecen asimismo de algunas de las enzimas antioxidantes protectoras que sí poseen las ratas y otros mamíferos (por ejemplo, se piensa que la GSH-peroxidasa tiene escasa actividad en el esperma humano). Estos son ejemplos de la vulnerabilidad potencialmente mayor a la tensión oxidativa en los humanos (sobre todo en células sensibles como por ejemplo las del esperma, que es aparentemente más vulnerable a las influencias tóxicas que el de las ratas), lo que puede tener como resultado una respuesta diferente o una mayor susceptibilidad a la influencia de diversos factores en los humanos en comparación con otros mamíferos (Telišman 1995).

Influencia de la edad

En comparación con los adultos, los niños de corta edad suelen ser más susceptibles a la toxicidad química porque sus volúmenes de inhalación y su velocidad de absorción gastrointestinal son relativamente mayores debido a la mayor permeabilidad del epitelio intestinal, y también porque sus sistemas enzimáticos detoxificantes están inmaduros y la velocidad de excreción de sustancias químicas tóxicas es relativamente menor. Parece que en las primeras fases de su desarrollo el sistema nervioso central es especialmente susceptible a la neurotoxicidad de diversas sustancias, como por ejemplo el plomo y el metilmercurio. Por el contrario, las personas de edad avanzada pueden ser susceptibles porque han pasado por exposiciones químicas anteriores y poseen unos mayores depósitos corporales de algunos xenobióticos, o también por el deterioro preexistente de la función de órganos diana y/o de las enzimas pertinentes, lo que hace que su velocidad de detoxificación y excreción sea más baja. Todos esos factores pueden contribuir a debilitar las defensas del organismo —una menor capacidad de reserva, lo que produce una mayor susceptibilidad a exposiciones ulteriores a otros peligros. Por ejemplo, las enzimas citocromo P450 (que intervienen en las rutas de biotransformación de casi todas las sustancias químicas tóxicas) pueden inducirse o ver reducida su actividad debido a la influencia de diversos factores que están presentes a lo largo de toda la vida (como hábitos alimentarios, hábito de fumar, alcohol, administración de fármacos y exposición a xenobióticos ambientales).

Influencia del sexo

Se han descrito diferencias de susceptibilidad relacionadas con el género con respecto a muchas sustancias tóxicas (aproximadamente 200), diferencias que se dan también en muchas especies de mamíferos. Parece que en general los hombres son más susceptibles a las toxinas renales, y las mujeres a las toxinas hepáticas. Las causas de estas diferencias de respuesta entre hombres y mujeres se han relacionado con sus diferencias en una gran

variedad de procesos fisiológicos (por ejemplo, las mujeres pueden excretar una mayor cantidad de algunas sustancias tóxicas en las hemorragias menstruales y en la leche transfiriéndolas al feto, pero sin embargo experimentan una tensión adicional durante el embarazo, el parto y la lactancia), actividades enzimáticas, mecanismos de reparación genética y factores hormonales, así como con la presencia de depósitos de grasa relativamente mayores en las mujeres, lo que produce una mayor acumulación de algunos tóxicos lipófilos, como los disolventes orgánicos y algunos fármacos.

Influencia de los hábitos alimentarios

Los hábitos alimentarios tienen una importante influencia en la susceptibilidad a la toxicidad química, sobre todo porque una nutrición adecuada es esencial para que el sistema de defensa química del cuerpo funcione correctamente y contribuya a mantener el buen estado de salud. Ingerir una cantidad suficiente de metales esenciales (incluidos metaloides) y proteínas, especialmente de aminoácidos que contienen azufre, es necesario para biosintetizar diversas enzimas detoxificantes y para aportar la glicina y el glutatión que precisan las reacciones de conjugación con compuestos endógenos y exógenos. Los lípidos, especialmente los fosfolípidos, y los elementos lipotrópicos (donantes de grupos metilo) son necesarios para la síntesis de las membranas biológicas. Los hidratos de carbono aportan la energía que se precisa en varios procesos de detoxificación y también el ácido glucurónico necesario para la conjugación de sustancias tóxicas y sus metabolitos. El selenio (metalide esencial), el glutatión y vitaminas como la C (hidrosoluble), la E y la A (liposolubles) desempeñan una importante función antioxidant (por ejemplo, en el control de la peroxidación de los lípidos y en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares), además de ofrecer protección frente a las sustancias tóxicas retirando los radicales libres. A ello hay que añadir que diversos componentes de la dieta (contenido de proteínas y fibra, minerales, fosfatos, ácido cítrico, etc.), así como la cantidad de alimentos ingerida, pueden influir considerablemente en la tasa de absorción gastrointestinal de muchas sustancias tóxicas (por ejemplo, la tasa media de absorción de las sales de plomo solubles tomadas con las comidas es de aproximadamente el 8 %, frente a alrededor del 60 % cuando se ingieren en ayunas). No obstante, la dieta misma puede ser también una fuente de exposición individual a diversas sustancias tóxicas (por ejemplo, niveles considerablemente incrementados de ingesta diaria y acumulación de arsénico, mercurio, cadmio y/o plomo en las personas que consumen pescado contaminado).

Influencia del hábito de fumar

El hábito de fumar puede influir en la susceptibilidad individual a muchas sustancias químicas tóxicas debido a las diversas posibilidades de interacción con el gran número de compuestos que están presentes en el humo de los cigarrillos (sobre todo hidrocarburos aromáticos policíclicos, monóxido de carbono, benceno, nicotina, acroleína, algunos plaguicidas, cadmio y, en menor medida, plomo y otros metales tóxicos, etc.), algunos de los cuales pueden acumularse en el cuerpo humano a lo largo de toda la vida, incluida la fase prenatal (por ejemplo el plomo y el cadmio). Las interacciones se producen principalmente porque diversas sustancias compiten por el mismo o los mismos lugares de unión para su transporte y distribución por el organismo y/o por la misma ruta de biotransformación en la que intervienen determinadas enzimas. Por ejemplo, algunos componentes del humo de los cigarrillos pueden inducir enzimas citocromo P450, mientras que otros pueden reducir su actividad, con lo que se ven

afectadas las rutas de biotransformación habituales de otros muchos tóxicos, como los disolventes orgánicos y algunos fármacos. El consumo intenso de cigarrillos a lo largo de un período prolongado puede reducir considerablemente los mecanismos de defensa del organismo al disminuir la capacidad de reserva con la que éste hace frente a la influencia adversa de otros factores del tipo de vida habitual.

Influencia del alcohol

El consumo de alcohol (etanol) puede influir de varias maneras en la susceptibilidad a muchas sustancias tóxicas. Puede influir en la velocidad de absorción y en la distribución de determinadas sustancias en el cuerpo —por ejemplo, incrementando la velocidad de absorción gastrointestinal del plomo, o reduciendo la velocidad de absorción pulmonar del vapor de mercurio al inhibir la oxidación que es necesaria para retener el vapor de mercurio inhalado. El etanol puede influir también en la susceptibilidad a diversas sustancias modificando temporalmente el pH tisular e incrementando el potencial redox derivado del metabolismo del etanol, pues tanto la oxidación del etanol a acetaldehído como la oxidación del acetaldehído a acetato producen un equivalente de nicotinamida-adenin dinucleótido reducido (NADH) e hidrógeno (H^+). Como la afinidad de los metales y metaloides tanto esenciales como tóxicos por diversos compuestos y tejidos está influida por el pH y por los cambios en el potencial redox (Telišman 1995), incluso una ingesta moderada de etanol puede producir una serie de consecuencias como las siguientes: 1)

redistribución del plomo acumulado durante mucho tiempo en el organismo humano a favor de una fracción biológicamente activa, 2) sustitución de zinc esencial por plomo en una o varias de las enzimas que contienen zinc, lo que afecta a la actividad enzimática, o influencia del plomo movilizado sobre la distribución en el organismo de otros metales y metaloides esenciales, como el cadmio, el hierro, el cobre y el selenio, 3) incremento de la excreción urinaria del zinc, etc. Esos posibles efectos se ven intensificados a veces por el hecho de que las bebidas alcohólicas pueden contener una cantidad apreciable de plomo, procedente de los recipientes o del proceso de elaboración (Prpić-Majić y cols. 1984; Telišman y cols. 1984; 1993).

Otra razón habitual de los cambios de susceptibilidad relacionados con el etanol es que muchas sustancias tóxicas, como por ejemplo diversos disolventes orgánicos, comparten la misma ruta de biotransformación, la de las enzimas citocromo P450. En función de la intensidad de la exposición a los disolventes orgánicos así como de la cantidad y frecuencia del etanol ingerido (es decir, consumo de alcohol agudo o crónico), el etanol puede reducir o incrementar las velocidades de biotransformación de diversos disolventes orgánicos y de esa forma influir en su toxicidad (Sato 1991).

Influencia de los fármacos

El uso frecuente de diversos fármacos puede influir en la susceptibilidad a sustancias químicas tóxicas sobre todo porque muchos fármacos se unen a proteínas séricas e influyen de esa manera en

Tabla 33.2 • Efectos básicos de posibles interacciones múltiples de los principales metales y metaloides tóxicos y/o esenciales en los mamíferos.

Metal o metaloide tóxico	Efectos básicos de la interacción con otro metal o metaloide
Aluminio (Al)	Reduce la velocidad de absorción de Ca y deteriora el metabolismo de Ca; la deficiencia de Ca en la dieta incrementa la velocidad de absorción de Al. Deteriora el metabolismo de los fosfatos. Los datos sobre interacciones con Fe, Zn y Cu son equívocos (es decir, sobre el posible papel de mediador de otro metal).
Arsénico (As)	Afecta a la distribución de Cu (incremento en riñón y descenso en hígado, suero y orina). Deteriora el metabolismo de Fe (incremento en hígado con descenso concomitante del hematocrito). Zn reduce la velocidad de absorción de As inorgánico y reduce la toxicidad de As. Se reduce la toxicidad de As y viceversa.
Cadmio (Cd)	Reduce la velocidad de absorción de Ca y deteriora el metabolismo de Ca; la deficiencia de Ca en la dieta incrementa la velocidad de absorción de Cd. Deteriora el metabolismo de los fosfatos incrementando su excreción urinaria. Deteriora el metabolismo de Fe; la deficiencia de Fe en la dieta incrementa la velocidad de absorción de Cd. Afecta a la distribución de Zn; Zn reduce la toxicidad de Cd, pero su influencia en la velocidad de absorción de Cd es equívoca. Se reduce la toxicidad de Cd. Mn reduce la toxicidad de Cd en exposiciones bajas. Los datos sobre la interacción con Cu son equívocos (es decir, sobre el posible papel de mediador de Zn o de otro metal). Los niveles altos de Pb, Ni, Sr, Mg o Cr(III) en la dieta pueden reducir la velocidad de absorción de Cd.
Mercurio (Hg)	Afecta a la distribución de Cu (incremento en hígado). Zn reduce la velocidad de absorción de Hg inorgánico y reduce la toxicidad de Hg. Se reduce la toxicidad de Hg. Cd incrementa la concentración de Hg en el riñón, pero al mismo tiempo reduce la toxicidad de Hg en el riñón (por influencia de la síntesis de metalotioneína inducida por Cd).
Plomo (Pb)	Deteriora el metabolismo de Ca; la deficiencia de Ca en la dieta incrementa la velocidad de absorción de Pb inorgánico y la toxicidad de Pb. Deteriora el metabolismo de Fe; la deficiencia de Fe en la dieta incrementa la toxicidad de Pb, pero su influencia en la velocidad de absorción de Pb es equívoca. Deteriora el metabolismo de Zn e incrementa su excreción urinaria; la deficiencia de Zn en la dieta incrementa la velocidad de absorción de Pb inorgánico y la toxicidad de Pb. Se reduce la toxicidad de Pb. Los datos sobre interacciones con Cu y Mg son equívocos (es decir, sobre el posible papel de mediador de Zn o de otro metal).

Nota: Los datos se refieren sobre todo a estudios experimentales con ratas, pues en general no existen datos clínicos y epidemiológicos pertinentes (especialmente sobre relaciones cuantitativas de dosis-respuesta) (Elsenhans y cols. 1991; Fergusson 1990; Telišman y cols. 1993).

el transporte, la distribución o la velocidad de excreción de diversas sustancias, y también porque pueden inducir las enzimas detoxificantes pertinentes o deprimir su actividad (por ejemplo las citocromo P450), lo que afecta a la toxicidad de sustancias que tienen la misma ruta de biotransformación. Característico de ambos mecanismos es el aumento de la excreción urinaria de ácido tricloroacético (metabolito de varios hidrocarburos clorados) cuando se toman salicilatos, sulfonamidas o fenilbutazonas, así como el aumento de la hepato y nefrotoxicidad del tetrachloruro de carbono cuando se toma fenobarbital. Además, algunos fármacos contienen una cantidad considerable de una sustancia química potencialmente tóxica, por ejemplo los antiácidos, que contienen aluminio, o los preparados que se emplean en el tratamiento de la hiperfosfatemia por insuficiencia renal crónica.

Influencia de la exposición concomitante a otras sustancias químicas

Los cambios de la susceptibilidad a efectos adversos sobre la salud debidos a la interacción de diversas sustancias químicas (es decir, los posibles efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas) se han estudiado casi exclusivamente en animales de experimentación, sobre todo en la rata. Carecemos de estudios epidemiológicos y clínicos a este respecto. Ello es motivo de especial preocupación habida cuenta de que en los humanos la intensidad de respuesta o la diversidad de efectos adversos de varias sustancias químicas son relativamente mayores que en la rata y otros mamíferos. Aparte de los que se han publicado en el ámbito de la farmacología, los datos que poseemos se refieren en su mayoría únicamente a combinaciones de dos sustancias químicas distintas pero pertenecientes a un mismo grupo, como diversos plaguicidas, disolventes orgánicos o metales y metaloides esenciales y/o tóxicos.

La exposición combinada a varios disolventes orgánicos puede producir diversos efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas (dependiendo de cuál sea la combinación de disolventes, de su intensidad y de la duración de la exposición), debido sobre todo a su capacidad de influirse mutuamente en sus biotransformaciones respectivas (Sato 1991).

Otro ejemplo característico son las interacciones de metales y metaloides esenciales y/o tóxicos, pues intervienen en la posible influencia de la edad (por ejemplo, la acumulación en el organismo de plomo y cadmio ambientales a lo largo de toda la vida), el sexo (por ejemplo, la deficiencia de hierro frecuente en las mujeres), los hábitos alimentarios (por ejemplo, una mayor ingesta en la dieta de metales y metaloides tóxicos y/o una ingesta deficiente en la dieta de metales y metaloides esenciales), el hábito de fumar y el consumo de alcohol (por ejemplo, exposición adicional al cadmio, el plomo y otros metales tóxicos) y el empleo de fármacos (por ejemplo, por una única dosis de antiácido se incrementa en 50 veces la cantidad de aluminio que como promedio diario se ingiere en los alimentos). La posibilidad de que la exposición a varios metales y metaloides produzca en los humanos diversos efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas puede ilustrarse con ejemplos básicos relacionados con los principales elementos tóxicos (véase la Tabla 33.2), pero aparte de eso pueden producirse otras interacciones porque los elementos esenciales también pueden influir entre sí (por ejemplo, el efecto antagonista, bien conocido, del cobre en la velocidad de absorción gastrointestinal, así como en el metabolismo del zinc, y viceversa). La causa principal de todas estas interacciones es la competencia de los diversos metales y metaloides por un mismo lugar de unión (especialmente el grupo sulfhidrilo, $-SH$) en diversas enzimas, metaloproteínas (especialmente la metalotioneína) y tejidos (por ejemplo, las membranas

celulares y las barreras orgánicas). Esas interacciones pueden desempeñar un papel notable en el desarrollo de varias enfermedades crónicas que están mediadas por la acción de radicales libres y tensión oxidativa (Telišman 1995).

DETERMINANTES GENETICOS DE LA RESPUESTA TOXICA

Daniel W. Nebert y Ross A. McKinnon

Hace mucho tiempo que se sabe que cada persona responde de una manera distinta a las sustancias químicas presentes en el medio ambiente. La reciente explosión de la biología molecular y de la genética ha permitido entender mejor la base molecular de esa variabilidad. Entre los principales determinantes de la respuesta individual a las sustancias químicas figuran importantes diferencias entre más de una docena de superfamilias de enzimas, clasificadas colectivamente en enzimas *metabolizantes de xenobióticos* (agentes extraños al organismo) y enzimas *metabolizantes de fármacos*. Aunque tradicionalmente se ha considerado que desempeñan una función de detoxificación, estas enzimas también pueden convertir una serie de compuestos inertes en productos intermedios muy tóxicos. Recientemente se han identificado numerosas diferencias, unas sutiles y otras más obvias, en los genes que codifican esas enzimas, diferencias que se ha demostrado que producen notables variaciones de la actividad enzimática. Hoy se sabe con seguridad que cada individuo posee su propia dotación de enzimas metabolizantes de xenobióticos, diversidad que podría entenderse como una especie de "huella dactilar metabólica". Es la compleja interacción de todas esas superfamilias de enzimas distintas lo que en última instancia determina no sólo el destino y el potencial de toxicidad de una sustancia química en un individuo dado, sino también la evaluación de la exposición. En el presente artículo hemos elegido, para exponer los notables progresos que se han realizado en la comprensión de la respuesta individual a las sustancias químicas, la superfamilia de enzimas citocromo P450. Gracias al desarrollo de unos ensayos relativamente sencillos que están basados en el ADN y orientados a identificar alteraciones de genes específicos en esas enzimas, se están obteniendo hoy predicciones más fiables de la respuesta individual a la exposición química. Esperamos que el resultado final sea la toxicología preventiva. En otras palabras, cada individuo podría saber a qué sustancias químicas es especialmente sensible, lo que le permitiría evitar problemas de toxicidad o de cáncer que antes eran impredecibles.

Aunque no se suele tener conciencia de ello, los seres humanos están expuestos todos los días a una avalancha de innumerables sustancias químicas distintas. Muchas de esas sustancias son sumamente tóxicas, y proceden de una amplia variedad de fuentes ambientales y alimentarias. La relación entre esas exposiciones y la salud humana ha sido y sigue siendo una de las preocupaciones esenciales de la investigación biomédica en todo el mundo.

Veamos algunos ejemplos de ese bombardeo químico. En el vino tinto se han aislado y caracterizado más de 400 sustancias químicas. Se estima que un cigarrillo encendido produce al menos 1.000 sustancias químicas. En los cosméticos y jabones perfumados hay asimismo innumerables sustancias químicas. Otra fuente importante de exposición química es la agricultura: solamente en los Estados Unidos, las explotaciones agrarias reciben más de 75.000 sustancias químicas al año en forma de plaguicidas, herbicidas y fertilizantes; tras su captación por las plantas y por los animales que pastan, así como por los peces en los cursos de agua próximos, esas sustancias químicas son

ingeridas por los seres humanos (al final de la cadena alimentaria). Otras dos fuentes de grandes concentraciones de sustancias químicas que entran en el organismo son a) los fármacos de uso habitual y b) la exposición a sustancias peligrosas en el lugar de trabajo a lo largo de toda la vida profesional.

Está ya plenamente confirmado que la exposición química puede afectar negativamente a muchos aspectos de la salud humana, provocando enfermedades crónicas y el desarrollo de numerosos tipos de cáncer. En el último decenio más o menos ha empezado a desentrañarse el fundamento molecular de muchas de esas relaciones. Además, se ha comprobado que las personas presentan notables diferencias de susceptibilidad a los efectos nocivos de la exposición química.

En los actuales intentos de predecir la respuesta humana a la exposición química se combinan dos enfoques fundamentales (Figura 33.2): la vigilancia del grado de exposición humana mediante marcadores biológicos (biomarcadores) y la predicción de la respuesta probable de un individuo a un nivel de exposición determinado. Aunque los dos enfoques son muy importantes, hay que hacer hincapié en que difieren claramente uno de otro. En este artículo nos centraremos en los *factores genéticos* que subyacen a la susceptibilidad individual a una exposición química determinada.

Este ámbito de investigación se suele denominar en términos generales *ecogenética* o *farmacogenética* (Kalow 1962 y 1992). Muchos de los recientes avances en la determinación de la susceptibilidad individual a la toxicidad química se derivan de un mejor conocimiento de los procesos por los que los seres humanos y otros mamíferos detoxifican las sustancias químicas,

así como de la notable complejidad de los sistemas enzimáticos que intervienen en esos procesos.

Describiremos en primer lugar la variabilidad de las respuestas tóxicas en los seres humanos. Presentaremos después algunas de las enzimas responsables de esas variaciones en la respuesta, debidas a diferencias en el metabolismo de las sustancias extrañas. A continuación veremos en detalle la historia y nomenclatura de la super familia citocromo P450. Se describirán brevemente cinco polimorfismos humanos P450 y otros no P450, que son responsables de diferencias en la respuesta humana a las sustancias tóxicas. Examinaremos a continuación un ejemplo concreto para hacer hincapié en que las diferencias genéticas individuales pueden influir en la evaluación de la exposición cuando ésta haya sido determinada por control ambiental. Por último nos referiremos al papel que desempeñan esas enzimas metabolizantes de xenobióticos en las funciones críticas de la vida.

Variaciones de la respuesta tóxica en la población humana

Los toxicólogos y farmacólogos suelen hablar de dosis letal media para el 50 % de la población (DL_{50}), de dosis máxima tolerable media para el 50 % de la población (DMT_{50}) y de dosis efectiva media de un determinado fármaco para el 50 % de la población (DE_{50}). Pero ¿cómo nos afectan estas dosis a cada uno de nosotros como individuos? En otras palabras, un individuo muy sensible puede verse 500 veces más afectado o tener 500 veces más probabilidades de verse afectado que el individuo más resistente de una población; para esas personas no tendrían mucho sentido los valores de la DL_{50} (ni los de la DMT_{50} y la DE_{50}). Los valores de

Figura 33.2 • Interrelaciones entre evaluación de la exposición, diferencias étnicas, edad, dieta, nutrición y evaluación de la susceptibilidad genética —factores todos que afectan al riesgo individual de toxicidad y cáncer.

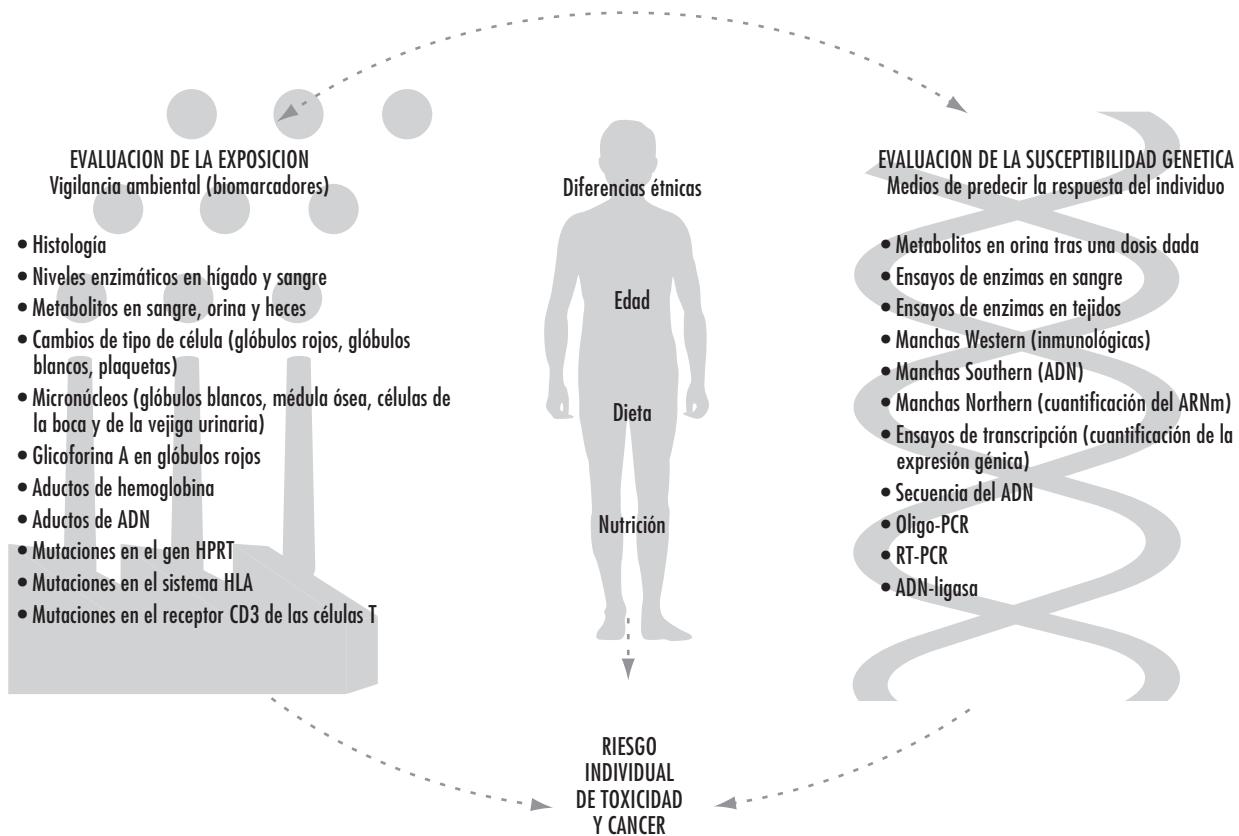
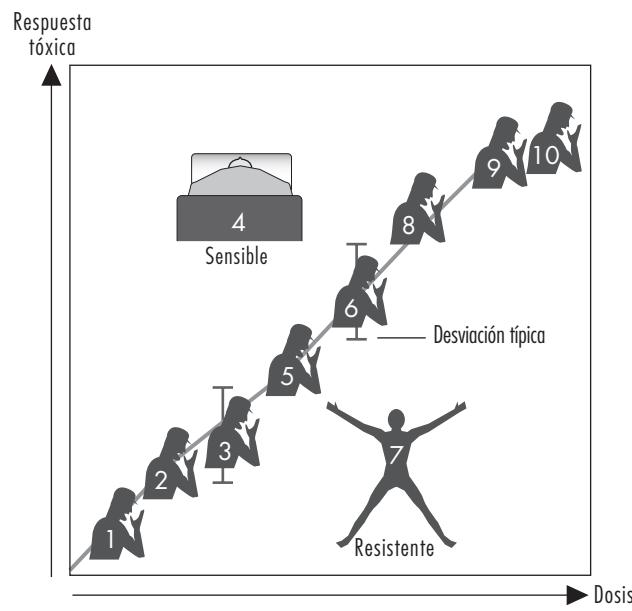


Figura 33.3 • Relación genérica entre cualquier respuesta tóxica y la dosis de cualquier agente químico o físico ambiental.



estas tres dosis sólo tienen sentido cuando se refieren a la población en su conjunto.

En la Figura 33.3 se presenta una hipotética relación dosis-respuesta respecto de una respuesta tóxica en individuos de una población determinada. Este diagrama genérico podría referirse a un carcinoma broncogénico en respuesta al número de cigarrillos fumados, a un cloracne como función de los niveles de dioxina en el lugar de trabajo, a un asma como función de las concentraciones de ozono o aldehido en el aire, a unas quemaduras en la piel en respuesta a la radiación ultravioleta, a un descenso del tiempo de coagulación por ingestión de aspirina o a unos trastornos gastrointestinales en respuesta al número de chiles jalapeños ingeridos. En todos esos casos, generalmente se observa que cuanto mayor es la exposición mayor es también la respuesta tóxica. La mayor parte de la población presentará la media y desviación típica de la respuesta tóxica como función de la dosis. El “marginal resistente” (abajo a la derecha en la Figura 33.3) es un individuo que responde menos a dosis o exposiciones altas. El “marginal sensible” (arriba a la izquierda) es un individuo que responde de una manera exagerada a una dosis o exposición relativamente pequeña. Estos individuos “marginales”, con sus diferencias extremas de respuesta en comparación con la mayoría de los individuos de la población, presentan a veces importantes variantes genéticas que pueden ayudar a los científicos a entender los mecanismos moleculares que subyacen a una respuesta tóxica.

Utilizando a esos individuos en estudios sobre familias, científicos de diversos laboratorios han empezado a comprobar la importancia que tiene la herencia mendeliana en una respuesta tóxica determinada. Después se puede recurrir a la biología molecular y a los estudios genéticos para delimitar el mecanismo subyacente a nivel genético (*genotípico*) que es responsable de la enfermedad de origen ambiental (*fenotípico*).

Enzimas metabolizantes de xenobióticos o de fármacos

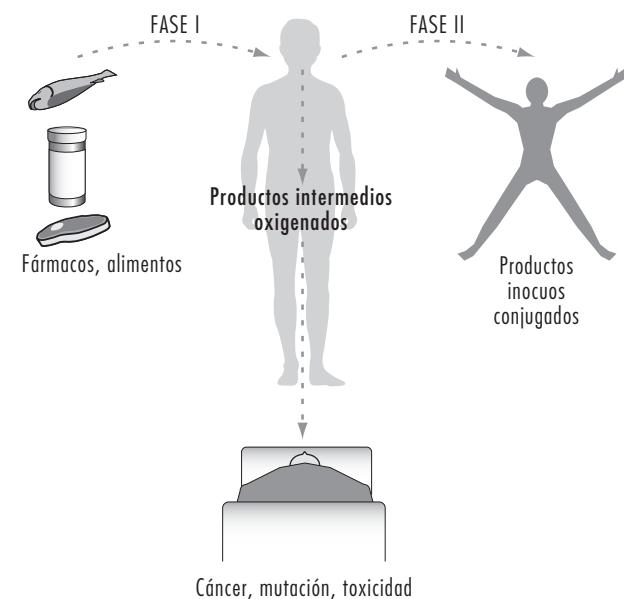
¿Cómo responde el organismo a la enorme cantidad de sustancias químicas exógenas a las que está expuesto? Los seres

humanos y otros mamíferos han desarrollado sistemas de enzimas metabólicas sumamente complejos, que comprenden más de una docena de superfamilias enzimáticas distintas. Prácticamente todas las sustancias químicas a las que están expuestos los seres humanos son modificadas por esas enzimas para que sea más fácil eliminar del cuerpo la sustancia extraña. Se suele agrupar a esas enzimas bajo las denominaciones genéricas de *enzimas metabolizantes de fármacos* y *enzimas metabolizantes de xenobióticos*. En realidad ambas expresiones son poco apropiadas. En primer lugar, muchas de esas enzimas no sólo metabolizan fármacos, sino también cientos de miles de sustancias químicas procedentes del medio ambiente y de la dieta. En segundo lugar, todas esas enzimas utilizan asimismo, como sustratos, compuestos normales del organismo; ninguna de ellas metaboliza sólo sustancias químicas extrañas.

Desde hace más de cuatro décadas, los procesos metabólicos mediados por esas enzimas se suelen clasificar como reacciones de Fase I o de Fase II (Figura 33.4). Las reacciones de la Fase I (“funcionalización”) suelen comportar modificaciones estructurales relativamente menores de la sustancia original mediante oxidación, reducción o hidrólisis para obtener un metabolito más hidrosoluble. Es frecuente que las reacciones de la Fase I “den pie” a que el compuesto se vuelva a modificar después en las reacciones de la Fase II. Las reacciones de la Fase I están mediadas básicamente por una superfamilia de enzimas de gran versatilidad, conocidas con el término colectivo de citocromo P450, aunque también pueden intervenir otras superfamilias (Figura 33.5).

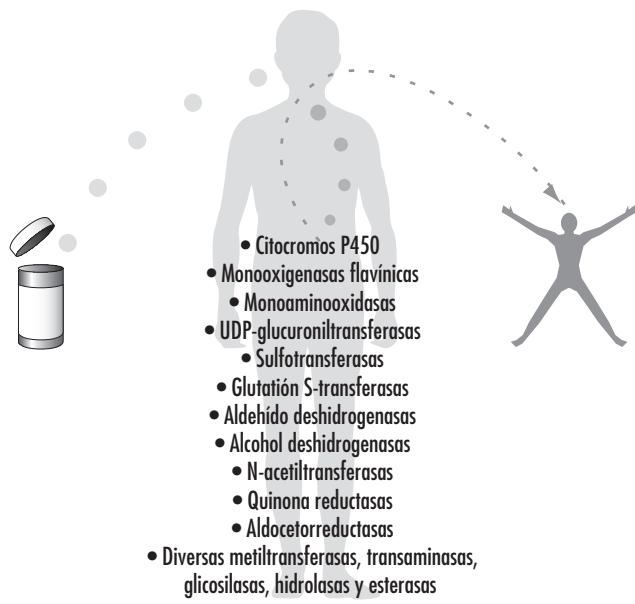
Las reacciones de la Fase II comportan el acoplamiento de una molécula endógena hidrosoluble y una sustancia química (sustancia original o metabolito de la Fase I) con miras a facilitar la excreción. Las reacciones de la Fase II suelen calificarse de “conjugación” o “derivación”. El nombre con que se conoce a las superfamilias de enzimas que catalizan las reacciones de la Fase II suele derivarse del radical endógeno que participa en la

Figura 33.4 • Expresión clásica de las Fases I y II de las enzimas metabolizantes de xenobióticos o de fármacos .



Aunque en la mayoría de los casos el resultado final es la detoxificación, hay algunos compuestos originales inertes que son potenciados por enzimas en el metabolismo de la Fase I, con lo que se reactivan productos intermedios que intervienen en la carcinogénesis, la mutagénesis y la toxicidad.

Figura 33.5 • Ejemplos de enzimas metabolizantes de fármacos.



conjugación: por ejemplo, N-acetiltransferasas cuando hay acetilación, sulfotransferasas cuando hay sulfatación, glutatión transferasas cuando se trata de conjugación con el glutatión y UDP-glucuroniltransferasas cuando se trata de glucuronación (Figura 33.5). Aunque el principal órgano del metabolismo de los fármacos es el hígado, algunas enzimas metabolizantes de fármacos se encuentran con niveles bastante altos en el tracto gastrointestinal, las gónadas, el pulmón, el cerebro y el riñón, y enzimas de ese tipo están sin duda presentes en cierto modo en todas las células vivas.

Las enzimas metabolizantes de xenobióticos: espadas de doble filo

A medida que se han ido conociendo mejor los procesos biológicos y químicos que provocan las anomalías de la salud humana se ha ido poniendo cada vez más de manifiesto que las enzimas metabolizantes de xenobióticos funcionan de una manera ambivalente (Figura 33.4). En la mayoría de los casos, las sustancias liposolubles se convierten en metabolitos hidrosolubles, más fáciles de excretar. Se ha comprobado, sin embargo, que en muchas ocasiones las mismas enzimas son capaces de transformar otras sustancias inertes en moléculas sumamente reactivas. Esos productos intermedios pueden interactuar después con macromoléculas celulares como las proteínas y el ADN. Así pues, en todas las sustancias químicas a las que están expuestos los seres humanos puede darse una competencia entre la ruta de *activación metabólica* y la de *detoxificación*.

Breves nociones de genética

En la genética humana, cada gen (*locus*) está situado en uno de los 23 pares de cromosomas. Los dos *alelos* (uno en cada cromosoma del par) pueden ser iguales, pero pueden ser también diferentes. Por ejemplo, los alelos *B* y *b*, en los que *B* (ojos marrones) es dominante sobre *b* (ojos azules): los individuos del fenotipo de ojos marrones pueden tener el genotipo *BB* o el *Bb*, mientras que los del fenotipo de ojos azules sólo pueden tener el genotipo *bb*.

Se habla de *polimorfismo* cuando dos o más fenotipos heredados de manera estable (rasgos) —derivados del mismo gen o los mismos genes— se mantienen en la población, muchas veces por

razones que no son necesariamente obvias. Para que un gen sea polimórfico el producto génico no tiene que ser esencial para el desarrollo, el vigor reproductivo u otro proceso vital crítico. De hecho, se suele hablar de “polimorfismo equilibrado”, en el que los heterozigotos tienen una clara ventaja de supervivencia sobre los homozigotos (por ejemplo, resistencia a la malaria frente a hemoglobina falciforme), para explicar el mantenimiento de un alelo en la población con unas frecuencias altas para las que no se conoce ninguna otra razón (González y Nebert 1990).

Polimorfismos humanos de las enzimas metabolizantes de xenobióticos

Hace más de cuatro decenios que se conocen diferencias genéticas en el metabolismo de diversos fármacos y sustancias químicas ambientales (Kalow 1962 y 1992). Esas diferencias suelen denominarse *polimorfismos farmacogenéticos* o, en un sentido más amplio, *ecogenéticos*. Estos polimorfismos consisten en variantes alélicas que se dan con una frecuencia relativamente alta en la población y están generalmente asociadas a aberraciones en la expresión o función enzimática. Antes los polimorfismos solían identificarse cuando se obtenían respuestas inesperadas a agentes terapéuticos. Más recientemente, la tecnología de recombinación del ADN ha permitido a los científicos identificar con precisión las alteraciones en los genes que son responsables de algunos de esos polimorfismos. Se han caracterizado así polimorfismos en muchas enzimas metabolizantes de fármacos —tanto de la Fase I como de la Fase II. A medida que se van identificando cada vez más polimorfismos se está comprobando con creciente certeza que cada individuo puede poseer su propio bagaje de enzimas metabolizantes de fármacos. Esa diversidad podría calificarse de “huella dactilar metabólica”. Es la compleja interacción de las diversas superfamilias de enzimas metabolizantes de fármacos en un individuo cualquiera lo que en última instancia determinará su respuesta particular a una determinada sustancia química (Kalow 1962 y 1992; Nebert 1988; González y Nebert 1990; Nebert y Weber 1990).

Expresión en cultivo celular de enzimas humanas metabolizantes de xenobióticos

¿Cómo podemos mejorar la predicción de las respuestas tóxicas humanas a las sustancias químicas? Los avances en la definición de la multiplicidad de enzimas metabolizantes de fármacos han de ir acompañados de un conocimiento preciso de qué enzimas determinan el destino metabólico de las distintas sustancias. Datos derivados de estudios de laboratorio con roedores han proporcionado sin duda una información útil. No obstante, las notables diferencias que presentan las enzimas metabolizantes de xenobióticos entre unas especies y otras obligan a ser prudentes a la hora de extrapolar los datos a las poblaciones humanas. Para resolver ese problema, muchos laboratorios han desarrollado sistemas con los que se pueden elaborar en cultivo diversas líneas celulares que producen enzimas humanas funcionales estables y en altas concentraciones (González, Crespi y Gelboin 1991). Se ha conseguido así producir satisfactoriamente enzimas humanas en diversas líneas celulares procedentes de fuentes como bacterias, levaduras, insectos y mamíferos.

Con miras a definir de una manera aún más precisa el metabolismo de las sustancias químicas se ha conseguido producir también *múltiples enzimas* en una única línea celular (González, Crespi y Gelboin 1991). Esas líneas celulares aportan una información valiosa sobre las enzimas concretas que intervienen en la metabolización de un determinado compuesto y de sus metabolitos probablemente tóxicos. Combinándolos después con los conocimientos relativos a la presencia y nivel de una enzima en los tejidos humanos, esos datos deben ser de gran utilidad para predecir la respuesta.

Citocromo P450

Historia y nomenclatura

El citocromo P450 es una de las superfamilias de enzimas metabolizantes de fármacos más estudiadas, pues presenta una enorme variabilidad individual en la respuesta a las sustancias químicas. “Citocromo P450” es una expresión genérica que se emplea por comodidad para describir una amplia superfamilia de enzimas que desempeñan un papel crucial en el metabolismo de innumerables sustratos endógenos y exógenos. La expresión se utilizó por vez primera en 1962 para describir un *pigmento* desconocido de las células que, cuando se reducía y unía al monóxido de carbono, producía un pico de absorción característico a 450 nm. Desde principios del decenio de 1980, la tecnología de clonación del ADN viene ofreciendo una importante información sobre las múltiples enzimas citocromo P450. Hasta la fecha se han identificado más de 400 genes distintos del citocromo P450 en animales, plantas, bacterias y levaduras. Se ha estimado que una especie cualquiera de mamíferos, como los humanos, puede poseer 60 o más genes P450 distintos (Nebert and Nelson 1991). Esa gran cantidad de genes P450 ha obligado a elaborar un sistema de nomenclatura (Nebert y cols. 1987; Nelson y cols. 1993). Propuesto por vez primera en 1987 y actualizado cada dos años, ese sistema de nomenclatura se basa en comparaciones de la evolución divergente de la secuencia de aminoácidos entre proteínas P450. Los genes P450 se dividen en familias y subfamilias: se agrupan en una familia las enzimas que presentan una similitud de aminoácidos superior al 40 %, y en una subfamilia las que presentan una similitud del 55 %. Los genes P450 se denominan con la raíz *CYP* seguido de un número arábigo que designa a la familia P450, una letra que indica la subfamilia y otro número arábigo que designa el gen de que se trate (Nelson y cols. 1993; Nebert y cols. 1991). Así, *CYP1A1* significa el gen P450 1 de la familia 1 y de la subfamilia A.

En febrero de 1995 había 403 genes *CYP* en la base de datos, integrada por 59 familias y 105 subfamilias. Entre ellas figuran ocho familias eucarióticas inferiores, 15 familias vegetales y 19 familias bacterianas. Las 15 familias de genes P450 humanos comprenden 26 subfamilias, en 22 de las cuales se ha trazado el mapa de localizaciones cromosómicas en la mayor parte del genoma. Algunas secuencias son claramente ortólogas en muchas especies —por ejemplo, se ha encontrado solamente un gen *CYP17* (17 α -hidroxilasa esteroidea) en todos los vertebrados examinados hasta la fecha; otras secuencias de una subfamilia están en cambio muy duplicadas, lo que hace imposible identificar pares ortólogos (por ejemplo, la subfamilia *CYP2C*). Es interesante que los humanos y las levaduras comparten un gen ortólogo en la familia *CYP51*. Los lectores interesados en más información sobre la superfamilia P450 disponen de amplia bibliografía al respecto (Nelson y cols. 1993; Nebert y cols. 1991; Nebert y McKinnon 1994; Guengerich 1993; González 1992).

El éxito de la nomenclatura del P450 ha hecho que se elaboraran sistemas terminológicos similares para las UDP-glucuroniltransferasas (Burchell y cols. 1991) y las flavin-monooxigenasas (Lawton y cols. 1994). Y se están elaborando sistemas de nomenclatura análogos basados en la evolución divergente para otras superfamilias de enzimas metabolizantes de fármacos (por ejemplo, sulfotransferasas, epoxihidrolasas y aldehído deshidrogenasas).

Recientemente se dividió la superfamilia de genes P450 de mamíferos en tres grupos (Nebert y McKinnon 1994): los que intervienen principalmente en el metabolismo de sustancias químicas extrañas, los que intervienen en la síntesis de diversas hormonas esteroideas y los que participan en otras funciones endógenas importantes. Para la predicción de la toxicidad, las

más importantes son las enzimas P450 metabolizantes de xenobióticos.

Enzimas P450 metabolizantes de xenobióticos

Las enzimas P450 que intervienen en el metabolismo de compuestos extraños y fármacos aparecen casi siempre en las familias *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* y *CYP4*. Estas enzimas P450 catalizan muchas reacciones metabólicas distintas, y es frecuente que una sola de ellas sea capaz de metabolizar numerosos compuestos diferentes. Además, muchas enzimas P450 pueden metabolizar un mismo compuesto en diferentes lugares. Asimismo, un compuesto puede ser metabolizado en el mismo y único lugar por varias enzimas P450, aunque a velocidades distintas.

Una propiedad muy importante de las enzimas P450 metabolizantes de fármacos es que muchos de estos genes son inducibles por las mismas sustancias que les sirven de sustrato. En cambio, otros genes P450 son inducidos por no sustratos. Este fenómeno de inducción enzimática es la base de muchas interacciones entre fármacos que son importantes desde el punto de vista terapéutico.

Aunque están presentes en muchos tejidos, en concreto, estas enzimas P450 se encuentran con niveles relativamente altos en el hígado, que es donde más se metabolizan los fármacos. Algunas de las enzimas P450 metabolizantes de xenobióticos muestran actividad hacia determinados sustratos endógenos (por ejemplo, el ácido araquídónico). No obstante, está extendida la idea de que, en su mayoría, esas enzimas P450 metabolizantes de xenobióticos no desempeñan funciones fisiológicas de importancia, aunque hasta el momento no se ha establecido experimentalmente. Es probable que la disruptión homozigótica selectiva, o “knock-out”, de determinados genes P450 metabolizantes de xenobióticos con métodos de “targeting” de genes (mutaciones dirigidas) en ratones ofrezca pronto información inequívoca sobre las funciones fisiológicas de los P450 metabolizantes de xenobióticos (véase un análisis de esta técnica en Capecci 1994).

En contraste con las familias que codifican enzimas P450 que participan básicamente en procesos fisiológicos, las que codifican enzimas P450 metabolizantes de xenobióticos presentan una notable especificidad de especie y suelen contener muchos genes activos por subfamilia (Nelson y cols. 1993; Nebert y cols. 1991). Dada la aparente ausencia de sustratos fisiológicos, es posible que las enzimas P450 de las familias *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* y *CYP4* que han aparecido a lo largo de los últimos cientos de millones de años se hayan desarrollado como un medio de detoxificar sustancias químicas extrañas presentes en el medio ambiente y en la dieta. La evolución de las P450 metabolizantes de xenobióticos se habría producido claramente a lo largo de un período de tiempo muy anterior al de la síntesis de la mayoría de las sustancias químicas sintéticas a las que los seres humanos se hallan expuestos en la actualidad. Es posible que los genes de esas cuatro familias se desarrollaran y diferenciaran en los animales debido a su exposición a metabolitos vegetales durante los últimos 1.200 millones de años —en el proceso que gráficamente se ha denominado “la guerra entre los animales y las plantas” (González y Nebert 1990). En esa guerra las plantas desarrollaron nuevas sustancias químicas (fitoalexinas) como mecanismo de defensa para impedir su ingestión por animales, y éstos a su vez respondieron desarrollando nuevos genes P450 para adaptarse a esa diversificación de los sustratos. Han hecho más plausible esta hipótesis los ejemplos que se han descrito recientemente de guerra química entre plantas e insectos y entre plantas y hongos, con detoxificación de sustratos tóxicos por el citocromo P450 (Nebert 1994).

Figura a continuación una breve introducción a varios de los polimorfismos de las enzimas P450 humanas metabolizantes de

xenobióticos en los que se cree que los determinantes genéticos de la respuesta tóxica tienen una gran importancia. Hasta hace poco tiempo, se pensaba en polimorfismos P450 cuando se producía una variación inesperada en las respuestas de los pacientes a los agentes terapéuticos que se les habían administrado. Incluso varios polimorfismos P450 se bautizaron con el nombre de los fármacos con los que se identificaron por vez primera. Las investigaciones más recientes se han centrado en cambio en la identificación de las enzimas P450 concretas que intervienen en el metabolismo de sustancias químicas en las que se observa variación y en la caracterización precisa de los genes P450 que intervienen. Como se ha señalado antes, la actividad mensurable de una enzima P450 hacia una sustancia química modelo puede denominarse fenotipo. Las diferencias alélicas en un gen P450 respecto de cada individuo es lo que se llama el genotipo P450. A medida que se va perfeccionando el análisis de los genes P450 se están conociendo mejor las bases moleculares precisas de fenómenos de variación fenotípica documentados con anterioridad.

La subfamilia CYP1A

La subfamilia *CYP1A* comprende dos enzimas presentes en los humanos y en todos los demás mamíferos: en la nomenclatura P450 normalizada se denominan CYP1A1 y CYP1A2. Estas enzimas son muy interesantes, pues intervienen en la activación metabólica de muchos procarcinógenos y son inducidas también por varios compuestos de interés toxicológico, como la dioxina. Por ejemplo, la CYP1A1 activa metabólicamente a muchos compuestos presentes en el humo de los cigarrillos. La CYP1A2 activa metabólicamente a muchas arilaminas —asociadas con el cáncer de vejiga urinaria— que se utilizan en la industria de los colorantes químicos. La CYP1A2 también activa metabólicamente a la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butana (NNK), que es una nitrosamina derivada del tabaco. La CYP1A1 y la CYP1A2 presentan asimismo niveles altos en los pulmones de los fumadores de cigarrillos, debido a su inducción por los hidrocarburos policíclicos contenidos en el humo. Por consiguiente, se estima que los niveles de actividad de la CYP1A1 y la CYP1A2 son importantes determinantes de la respuesta individual a muchas sustancias químicas potencialmente tóxicas.

El interés toxicológico por la subfamilia *CYP1A* se intensificó considerablemente en 1973 al publicarse un informe en el que se establecía una correlación entre el nivel de inducibilidad de la CYP1A1 en los fumadores de cigarrillos y la susceptibilidad individual al cáncer de pulmón (Kellermann, Shaw y Luyten-Kellermann 1973). Numerosos laboratorios se han centrado en determinar las bases moleculares de la inducción de la CYP1A1 y la CYP1A2.

El proceso de inducción está mediado por una proteína, denominada receptor Ah, a la que se unen dioxinas y otras sustancias estructuralmente afines. El nombre *Ah* se deriva de que muchos inductores de la CYP1A son aril hidrocarburos. Es interesante que las diferencias en el gen que codifica el receptor Ah entre varias estirpes de ratones tengan como resultado notables diferencias en materia de respuesta química y toxicidad. También en los humanos parece que hay un polimorfismo en el gen del receptor Ah: aproximadamente una décima parte de la población muestra una elevada inducción de CYP1A1 y puede tener un riesgo mayor que el de las otras nueve décimas partes de desarrollar determinados tipos de cáncer inducidos por sustancias químicas. El papel del receptor Ah en el control de las enzimas de la subfamilia *CYP1A* y su función como determinante de la respuesta humana a la exposición química han sido objeto recientemente de varios trabajos (Nebert, Petersen y Puga 1991; Nebert, Puga y Vasiliou 1993).

¿Hay otros polimorfismos que pudieran controlar el nivel de proteinas CYP1A en una célula? Se ha identificado también un polimorfismo en el gen *CYP1A1*, que parece que influye en el riesgo de cáncer de pulmón entre los fumadores de cigarrillos japoneses, aunque ese mismo polimorfismo no parece afectar al riesgo en otros grupos étnicos (Nebert y McKinnon 1994).

CYP2C19

Hace muchos años que están bien documentadas las variaciones de la velocidad con que los individuos metabolizan el fármaco anticonvulsivo (S)-mefenitoína (Guengerich 1989). Entre el 2 % y el 5 % de los caucásicos y hasta el 25 % de los asiáticos presentan una deficiencia de esta actividad y pueden tener un riesgo mayor de toxicidad al administrárseles este fármaco. Se sabe hace mucho tiempo que en esta deficiencia enzimática interviene un miembro de la subfamilia *CYP2C* humana, pero la base molecular precisa de este fenómeno ha sido objeto de considerable controversia. La razón principal de la dificultad era la existencia de seis o más genes en esa subfamilia. No obstante, recientemente se ha demostrado que la causa principal de la deficiencia es una mutación de una sola base en el gen *CYP2C19* (Goldstein y de Morais 1994). Se ha elaborado asimismo un sencillo método, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el ADN, para identificar rápidamente esta mutación en las poblaciones humanas (Goldstein y de Morais 1994).

CYP2D6

La variación de genes P450 que mejor se ha caracterizado es probablemente la que se refiere al *CYP2D6*. Se han descrito más de una docena de ejemplos de mutaciones, reordenaciones y delecciones que afectan a este gen (Meyer 1994). Sugirió por vez primera la existencia de este polimorfismo, hace veinte años, la variabilidad clínica de la respuesta de los pacientes a un agente hipotensor, la debrisoquina. Por eso a las alteraciones del gen *CYP2D6* que afectan a la actividad enzimática se las conoce colectivamente como *polimorfismo de la debrisoquina*.

Antes de que se empezaran a realizar estudios basados en el ADN se clasificaba a las personas, conforme a las concentraciones del metabolito en las muestras de orina, en las que son grandes metabolizadoras de bradisoquina y en las que son poco metabolizadoras (PM y EM en inglés). Hoy está claro que las alteraciones del gen *CYP2D6* tienen como resultado no sólo que hay unos individuos que metabolizan ampliamente la debrisoquina y otros que la metabolizan de manera escasa, sino también que otros realizan esa función de manera ultrarrápida. Las alteraciones del gen *CYP2D6* están relacionadas en su mayoría con una deficiencia parcial o total de la función enzimática; no obstante, recientemente se ha descrito a individuos de dos familias que poseen múltiples copias funcionales del gen *CYP2D6*, lo que da lugar a un metabolismo ultrarrápido de los sustratos *CYP2D6* (Meyer 1994). Este notable descubrimiento arroja una luz nueva sobre el amplio espectro de actividad de la enzima *CYP2D6* observado anteriormente en estudios sobre poblaciones. Las alteraciones en la función de la *CYP2D6* son de especial importancia porque esta enzima metaboliza más de 30 fármacos que se prescriben habitualmente. Por consiguiente, la función *CYP2D6* de un individuo determina de manera importante su respuesta tanto terapéutica como tóxica al tratamiento administrado. Incluso se ha sostenido recientemente que para utilizar sin riesgos los fármacos psiquiátricos y cardiovasculares es necesario tener en cuenta la condición del paciente respecto al *CYP2D6*.

También se ha estudiado con detalle el papel del polimorfismo *CYP2D6* como determinante de la susceptibilidad individual a enfermedades humanas como el cáncer de pulmón y la enfermedad de Parkinson (Nebert y McKinnon 1994; Meyer

1994). Aunque es difícil establecer conclusiones por haberse empleado diversos protocolos, la mayoría de los estudios parece indicar que existe una asociación entre los que son grandes metabolizadores de debrisoquina (fenotipo EM) y el cáncer de pulmón. No están claras por el momento las razones de esa asociación. No obstante, se ha comprobado que la enzima CYP2D6 metaboliza la NNK, que es una nitrosamina derivada del tabaco.

Se espera que con el perfeccionamiento de los ensayos basados en el ADN —que permitirán valorar de una manera más precisa la condición de una persona respecto al CYP2D6— se pueda aclarar la relación exacta que existe entre la CYP2D6 y el riesgo de enfermedad. Mientras que el gran metabolizador puede estar vinculado a la susceptibilidad al cáncer de pulmón, el escaso metabolizador (fenotipo PM) parece estar asociado con la enfermedad de Parkinson de causa desconocida. Aunque estos estudios son también difíciles de comparar, parece que los individuos que tienen menos capacidad de metabolizar los sustratos de la CYP2D6 (como la debrisoquina) poseen un riesgo de 2 a 2,5 veces mayor de desarrollar la enfermedad de Parkinson.

CYP2E1

El gen *CYP2E1* codifica una enzima que metaboliza muchas sustancias químicas, como fármacos y numerosos carcinógenos de bajo peso molecular. Esta enzima es interesante también porque es muy inducible por el alcohol y puede tener que ver con la lesión hepática inducida por sustancias como el cloroformo, el cloruro de vinilo y el tetracloruro de carbono. La enzima se halla básicamente en el hígado, y su nivel presenta notables variaciones entre unos individuos y otros. Un minucioso análisis del gen *CYP2E1* ha llevado a identificar varios polimorfismos (Nebert and McKinnon 1994). En algunos estudios se ha notificado una relación entre la presencia de determinadas variaciones estructurales en el *CYP2E1* y una aparente reducción del riesgo de cáncer de pulmón; no obstante, hay claras diferencias interétnicas que obligan a clarificar esa posible relación.

Subfamilia CYP3A

Debido a su similitud en la secuencia de aminoácidos, se han identificado cuatro enzimas humanas como miembros de la subfamilia *CYP3A*. Las enzimas CYP3A metabolizan muchos fármacos de uso habitual, como la eritromicina y la ciclosporina. También es un sustrato de la CYP3A la aflatoxina B1, que es un contaminante alimentario carcinógeno. Uno de los miembros de la subfamilia humana *CYP3A*, la *CYP3A4*, es la principal enzima P450 en el hígado humano y está presente también en el tracto gastrointestinal. Como ocurre con muchas otras enzimas P450, el nivel de CYP3A4 varía mucho entre unos individuos y otros. Una segunda enzima, la CYP3A5, se encuentra sólo en alrededor del 25 % de los hígados, por razones genéticas que aún no conocemos. Todavía no se ha establecido la importancia de la variabilidad de la CYP3A4 y la CYP3A5 como factor genético determinante de la respuesta tóxica (Nebert y McKinnon 1994).

Polimorfismos de otras enzimas (no P450)

Existen también numerosos polimorfismos en otras superfamilias de enzimas metabolizantes de xenobióticos (por ejemplo, glutatión transferasas, UDP-glucuroniltransferasas, paraoxonasas, deshidrogenasas, N-acetiltransferasas y flavín-monooxigenasas). Como en última instancia la toxicidad de cualquier producto intermedio generado por enzimas P450 depende de la eficiencia de las reacciones ulteriores de detoxificación de la Fase II, el papel que desempeña la combinación de múltiples polimorfismos enzimáticos es importante para determinar la susceptibilidad a enfermedades inducidas por sustancias químicas. Por

consiguiente, es probable que el equilibrio metabólico entre las reacciones de la Fase I y la Fase II (Figura 33.4) sea un factor importante en las enfermedades humanas inducidas por sustancias químicas y en los determinantes genéticos de la respuesta tóxica.

Polimorfismo del gen *GSTM1*

Un ejemplo muy estudiado de polimorfismo en una enzima de la Fase II es el que se refiere a un miembro de la superfamilia de enzimas glutatión S-transferasas, designado como GST mu o *GSTM1*. Esta enzima es de gran interés toxicológico porque al parecer interviene en la detoxificación ulterior de los metabolitos tóxicos que produce la enzima CYP1A1 a partir de sustancias químicas presentes en el humo de los cigarrillos. El polimorfismo identificado en este gen de glutatión transferasa consiste en la ausencia total de enzima funcional en nada menos que la mitad del total de caucásicos estudiados. Parece que esta falta de una enzima de la Fase II está asociada a una mayor susceptibilidad al cáncer de pulmón. Al agrupar a los individuos sobre la base tanto de los genes *CYP1A1* variantes como de la delección o presencia de un gen *GSTM1* funcional, se ha demostrado que el riesgo de contraer cáncer de pulmón inducido por el hábito de fumar varía de manera significativa (Kawajiri, Watanabe y Hayashi 1994). En concreto, los individuos que mostraban una única y rara alteración del gen *CYP1A1* y además ausencia del gen *GSTM1* presentaban un riesgo más alto (hasta nueve veces mayor) de contraer cáncer de pulmón cuando estaban expuestos a un nivel relativamente bajo de humo de cigarrillos. Es interesante que aparentemente hay diferencias interétnicas en la importancia de los genes variantes, lo que hace necesario proseguir los estudios para determinar el papel exacto de esas alteraciones en la susceptibilidad a la enfermedad (Kalow 1962; Nebert y McKinnon 1994; Kawajiri, Watanabe y Hayashi 1994).

Efecto sinérgico de dos o más polimorfismos sobre la respuesta tóxica

Una respuesta tóxica a un agente ambiental puede verse muy exacerbada por la combinación de dos deficiencias farmacogenéticas en un mismo individuo, por ejemplo los efectos combinados del polimorfismo de la N-acetiltransferasa (NAT2) y el de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

La exposición profesional a arilaminas constituye un grave riesgo de cáncer de la vejiga urinaria. Desde los refinados estudios de Cartwright en 1954 se sabe que la condición del sujeto con respecto a los N-acetiladores es un determinante del cáncer de vejiga inducido por azocolorantes. Hay una correlación muy significativa entre el fenotipo de acetilador lento y la presencia de cáncer de vejiga, así como con el grado de invasibilidad de este cáncer en la pared de la vejiga. Por el contrario, hay una asociación significativa entre el fenotipo de acetilador rápido y la incidencia de carcinoma colorectal. Se han clonado y secuenciado los genes de la N-acetiltransferasa (*NAT1*, *NAT2*), y gracias a los ensayos basados en el ADN es posible hoy detectar las más de una docena de variantes alélicas que explican el fenotipo de acetilador lento. El gen *NAT2* es polimórfico y responsable de la mayor parte de la variabilidad observada en la respuesta tóxica a sustancias químicas (Weber 1987; Grant 1993).

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzima crítica en la generación y el mantenimiento del NADPH. La actividad baja o nula de la G6PD puede producir hemólisis grave inducida por fármacos o xenobióticos, debido a la ausencia de niveles normales de glutatión reducido (GSH) en los glóbulos rojos de la sangre. La deficiencia de G6PD afecta al menos a trescientos millones de personas en todo el mundo. Más del 10 % de los varones afroamericanos presentan el fenotipo

menos grave, mientras que algunas comunidades de Cerdeña presentan el “tipo mediterráneo”, que es más grave, con una frecuencia de nada menos que una de cada tres personas. El gen G6PD se ha clonado y localizado en el cromosoma X, y el gran número de mutaciones puntuales distintas explica el alto grado de heterogeneidad fenotípica que se observa en los individuos con deficiencia de G6PD (Beutler 1992).

Se ha comprobado que la tiozalsulfona, que es un fármaco sulfarilámico, provoca una distribución bimodal de anemia hemolítica en la población tratada. Cuando se les trata con determinados fármacos, los individuos en los que a la deficiencia de G6PD se suma el fenotipo de acetilador lento se ven más afectados que los que presentan sólo la deficiencia de G6PD o sólo el fenotipo de acetilador lento. Los individuos que reúnen ambas condiciones son al menos 40 veces más susceptibles a la hemólisis inducida por la tiozalsulfona que los acetiladores rápidos con niveles normales de G6PD.

Influencia de los polimorfismos genéticos en la evaluación de la exposición

Para la evaluación y control biológico de la exposición (Figura 33.2) se precisa también información sobre la constitución genética de cada individuo. Dada una exposición idéntica a una sustancia química peligrosa, el nivel de aductos de hemoglobina (o de otros biomarcadores) podría variar en dos o tres órdenes de magnitud entre unas personas y otras en función de la “huella dactilar metabólica” de cada una de ellas.

Se ha estudiado la misma farmacogenética combinada en trabajadores de una fábrica de productos químicos de Alemania (Tabla 33.3). Los aductos de hemoglobina entre trabajadores expuestos a anilina y acetanilida presentaban niveles mucho más altos en los acetiladores lentos con deficiencia de G6PD que en los individuos con los otros posibles fenotipos farmacogenéticos combinados. Este estudio tiene importantes consecuencias para la evaluación de la exposición. Los datos obtenidos en él demuestran que, aunque dos individuos puedan estar expuestos al mismo nivel ambiental de sustancias químicas peligrosas en el lugar de trabajo, la cantidad de exposición (a través de biomarcadores como los aductos de hemoglobina) puede estimarse en dos o más órdenes de magnitud menos debido a la predisposición genética subyacente del individuo. Análogamente, el riesgo resultante de un efecto adverso sobre la salud puede variar en dos o más órdenes de magnitud.

Diferencias genéticas tanto en las uniones como en el metabolismo

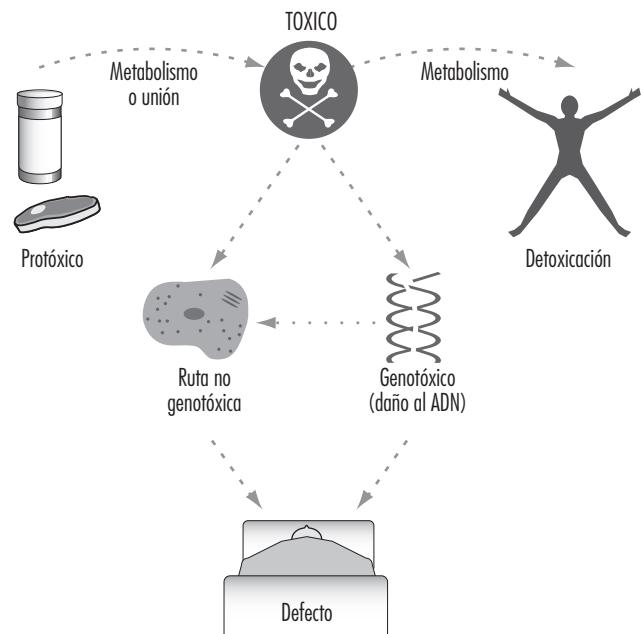
Hay que hacer hincapié en que lo que se ha dicho aquí sobre el metabolismo es aplicable también a las uniones. Las diferencias hereditarias de unión de los agentes ambientales afectan considerablemente a la respuesta tóxica. Por ejemplo, las diferencias en el gen cdm del ratón pueden influir profundamente en la

Tabla 33.3 • Aductos de hemoglobina en trabajadores expuestos a anilina y acetanilida.

Tipo de acetilador		Deficiencia de G6PD		
Rápido	Lento	No	Sí	Aductos de Hgb
+		+		2
+			+	30
	+	+		20
	+		+	100

Fuente: Adaptado de Lewalter y Korallus 1985.

Figura 33.6 • Procesos generales de la toxicidad.



sensibilidad individual a la necrosis testicular inducida por cadmio (Taylor, Heiniger y Meier 1973). Las diferencias en la afinidad de unión del receptor Ah afectan probablemente a la toxicidad y el cáncer inducidos por la dioxina (Nebert, Petersen y Puga 1991; Nebert, Puga y Vasiliou 1993).

En la Figura 33.6 se resume el papel que desempeñan el metabolismo y las uniones en la toxicidad y el cáncer. Los agentes tóxicos, tal como existen en el medio ambiente o tras su metabolismo o unión, provocan sus efectos bien por una ruta genotóxica (en la cual se produce un daño para el ADN), bien por una ruta no genotóxica (en la que el daño para el ADN y la mutagénesis no se producen necesariamente). Es interesante que se haya comprobado recientemente que los agentes “clásicos” que dañan al ADN pueden operar a través de una ruta de transducción de una señal de transducción no genotóxica que es GSH-dependiente y que se inicia en la superficie de la célula o cerca de ella en ausencia de ADN y fuera del núcleo celular (Devary y cols. 1993). No obstante, las diferencias genéticas en materia de metabolismo y de uniones siguen siendo los factores que más determinan el control de las diferentes respuestas tóxicas individuales.

Enzimas metabolizantes de fármacos y función celular

Las variaciones de origen genético en el funcionamiento de las enzimas metabolizantes de fármacos son de gran importancia para determinar la respuesta individual a las sustancias químicas. Esas enzimas son esenciales para el destino y el curso temporal de una sustancia química extraña tras la exposición.

Como se indica en la Figura 33.6, la importancia de las enzimas metabolizantes de fármacos para la susceptibilidad individual a la exposición química puede ser de hecho una cuestión mucho más compleja de lo que cabe deducir de este sencillo análisis del metabolismo de los xenobióticos. En otras palabras, a lo largo de los dos últimos decenios se ha hecho mucho hincapié en los mecanismos genotóxicos (mediciones de los aductos de ADN y de proteínas). No obstante, ¿y si los

mecanismos no genotóxicos fueran al menos tan importantes como los genotóxicos en la producción de las respuestas tóxicas?

Como se ha señalado anteriormente, no se han definido con precisión las funciones fisiológicas de muchas enzimas metabolizantes de fármacos que intervienen en el metabolismo de los xenobióticos. Nebert (1994) ha propuesto que, habida cuenta de que están presentes en este planeta desde hace más de 3.500 millones de años, las enzimas metabolizantes de fármacos eran en su origen (y hoy lo siguen siendo esencialmente) responsables de la regulación de los niveles celulares de muchos ligandos no peptídicos importantes para la activación transcripcional de genes que afectan a las funciones de crecimiento, diferenciación, apoptosis, homeostasis y neuroendocrinas. Además, la mayoría de los agentes ambientales, si no todos, producen su toxicidad actuando de una manera *agonista* o *antagonista* sobre señal de transducción (Nebert 1994). Sobre la base de esta hipótesis, la variabilidad genética de las enzimas metabolizantes de fármacos puede tener efectos muy considerables sobre muchos procesos bioquímicos críticos que se desarrollan en la célula, provocando con ello importantes diferencias en la respuesta tóxica. Es posible sin duda que esta hipótesis pueda explicar muchas reacciones adversas idiosincrásicas que aparecen en pacientes a los que se les ha administrado fármacos de uso habitual.

Conclusiones

En el último decenio se ha avanzado notablemente en el conocimiento de la base genética de las diferencias de respuesta a las sustancias químicas presentes en los fármacos, los alimentos y los contaminantes ambientales. Las enzimas metabolizantes de fármacos influyen de manera profunda en la forma en que los humanos responden a las sustancias químicas. Como seguimos

ampliando nuestros conocimientos sobre la multiplicidad de las enzimas metabolizantes de fármacos, cada vez estamos más preparados para evaluar mejor el riesgo de toxicidad de muchos fármacos y sustancias químicas ambientales. El ejemplo más claro es probablemente el caso de la enzima CYP2D6, de la superfamilia citocromo P450. Mediante ensayos basados en el ADN que son de relativa sencillez es posible predecir la respuesta probable de cualquier fármaco que sea metabolizado predominantemente por esta enzima; y gracias a esa predicción se podrán utilizar de una manera más segura unos tratamientos que aunque valiosos son potencialmente tóxicos.

En el futuro asistiremos sin duda a una explosión de la identificación de nuevos polimorfismos (fenotipos) relacionados con las enzimas metabolizantes de fármacos. Esta información estará acompañada, con miras a identificar los fenotipos de las poblaciones humanas, de unos ensayos basados en el ADN que serán mejores y mínimamente invasivos.

Esos estudios deben ser particularmente útiles para evaluar el papel de las sustancias químicas en las muchas enfermedades ambientales cuyo origen hoy desconocemos. Es probable también que el análisis de las combinaciones de varios polimorfismos de estas enzimas (véase por ejemplo la Tabla 33.3) constituya un área de investigación especialmente fecunda. Esos estudios clarificarán la función de las sustancias químicas en el origen de los diversos tipos de cáncer. Gracias al conjunto de esa información se podrán formular consejos cada vez más individualizados sobre la forma de evitar sustancias químicas que tienen probabilidades de provocar problemas individuales. Es el campo de la toxicología preventiva. Y es indudable que ese asesoramiento ayudará en gran medida a todas las personas a hacer frente a la carga química cada vez mayor a la que estamos expuestos.

MECANISMOS DE LA TOXICIDAD

● INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS

Philip G. Watanabe

La toxicología mecanicista estudia cómo interactúan los agentes químicos o físicos con los organismos vivos para producir la toxicidad. Conocer el mecanismo de la toxicidad de una sustancia permite prevenirla mejor y diseñar sustancias químicas más deseables; es la base de la terapia en los casos de sobreexposición, y muchas veces permite comprender mejor procesos biológicos fundamentales. En el contexto de esta *Encyclopedia* se hará hincapié en el empleo de animales para predecir la toxicidad humana. La toxicología puede subdividirse en toxicología mecanicista, descriptiva, reguladora, forense y ambiental (Klaassen, Amdur y Doull 1991). Y en todas ellas es conveniente comprender los mecanismos fundamentales de la toxicidad.

Ventajas de comprender los mecanismos de la toxicidad

Comprender el mecanismo por el que una sustancia produce toxicidad ayuda de diversas maneras a las varias subdisciplinas de la toxicología. La información mecanicista ayuda a los organismos oficiales responsables de la regulación a establecer límites de seguridad de la exposición humana jurídicamente vinculantes. Ayuda a los toxicólogos a recomendar líneas de acción para limpiar o corregir lugares contaminados y, junto con las propiedades físicas y químicas de la sustancia o combinación de sustancias, puede utilizarse para determinar el equipo de

protección específico que se precisa. Los conocimientos mecanicistas son útiles también para establecer la base de la terapia y diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades humanas. En la toxicología forense, el mecanismo de la toxicidad explica muchas veces la forma en que un agente químico o físico puede producir la muerte o la incapacidad.

Si se comprende el mecanismo de la toxicidad, la toxicología descriptiva puede ser un instrumento útil para predecir los efectos tóxicos de sustancias químicas relacionadas. Es importante entender, no obstante, que la falta de información mecanicista no disuade a los profesionales de la salud de sus esfuerzos por proteger la salud humana. Para establecer unos niveles de exposición seguros se utilizan decisiones prudentes basadas en estudios con animales y en la experiencia humana. Tradicionalmente se ha venido estableciendo un margen de seguridad utilizando el “nivel sin efecto adverso” o un “nivel más bajo con efecto adverso” obtenidos en los estudios con animales (mediante modelos de exposiciones repetidas) y dividiendo ese nivel por un factor de 100 en la exposición profesional y de 1.000 en otros tipos de exposición ambiental humana. El éxito de este procedimiento se puede comprobar en los pocos casos de efectos adversos sobre la salud de los trabajadores que pueden atribuirse a la exposición química allí donde en el pasado se establecieron y respetaron unos límites de exposición adecuados. Además, la esperanza de vida humana sigue aumentando, y también la calidad de vida. En general, el empleo de datos sobre toxicidad ha permitido establecer controles obligatorios y voluntarios eficaces. El conocimiento pormenorizado de los mecanismos tóxicos

mejorará la predecibilidad de los nuevos modelos de riesgo que se están elaborando en la actualidad y tendrá como resultado un perfeccionamiento continuo.

Comprender los mecanismos ambientales es una cuestión compleja, y es necesario conocer previamente los fenómenos de perturbación y homeostasis (equilibrio) del ecosistema. Aunque esta cuestión no se examina en este artículo, una mejor comprensión de los mecanismos tóxicos y sus consecuencias últimas en un ecosistema ayudaría a los científicos a adoptar decisiones prudentes sobre el manejo de los materiales de desecho municipales e industriales. La gestión de los desechos es un ámbito de investigación cada vez más amplio, y seguirá teniendo mucha importancia en el futuro.

Técnicas para estudiar los mecanismos de la toxicidad

La mayoría de los estudios mecanicistas se inicia con una descripción toxicológica referida a animales o a observaciones clínicas en humanos. Idealmente, los estudios con animales comprenden cuidadosas observaciones clínicas y de comportamiento, un minucioso examen bioquímico de los elementos de la sangre y la orina en busca de signos de deterioro funcional en los principales sistemas biológicos del cuerpo, y una evaluación post-mortem de todos los sistemas orgánicos, mediante examen microscópico, para comprobar la lesión (véanse las directrices de ensayos de la OCDE; las directivas de la UE sobre evaluación química; las normas sobre ensayos de la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos, y la normativa sobre sustancias químicas del Japón). En los humanos, y con la excepción del examen post-mortem, todo ello equivale a un concienzudo examen físico que se realiza en un hospital a lo largo de dos o tres días.

Comprender los mecanismos de la toxicidad es el arte y la ciencia de la observación, de la creatividad en la selección de técnicas para ensayar diversas hipótesis y de la integración innovadora de signos y síntomas en una relación causal. Los estudios mecanicistas se inician con la exposición, hacen un seguimiento de la distribución temporal y el destino en el organismo (farmacocinética) y miden el efecto tóxico resultante a algún nivel del sistema y a algún nivel de dosis. Al provocar la toxicidad, sustancias diferentes pueden actuar a niveles diferentes del sistema biológico.

Exposición

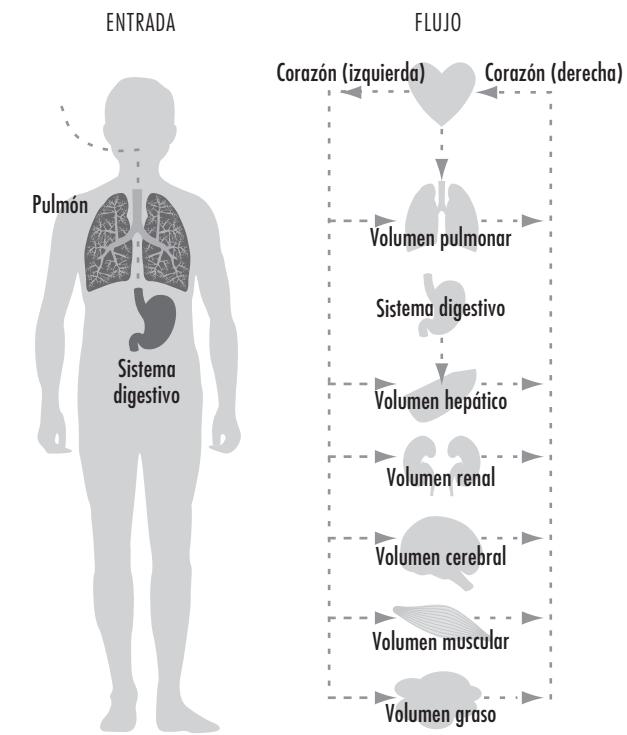
En los estudios mecanicistas, la ruta de exposición suele ser la misma que en la exposición humana. La ruta es importante porque puede haber efectos locales en el lugar de la exposición y además efectos sistémicos una vez que la sustancia ha sido absorbida en la sangre y distribuida por todo el cuerpo. Un ejemplo sencillo pero revelador de un efecto local sería la irritación y eventual corrosión de la piel tras la aplicación de soluciones ácidas o alcalinas fuertes como las que se emplean para limpiar superficies duras. Análogamente, puede producirse irritación y muerte celular en las células que revisten los orificios nasales y/o el pulmón tras la exposición a vapores o gases irritantes, como óxidos de nitrógeno u ozono. (Ambos están presentes en la contaminación atmosférica.) Tras la absorción de una sustancia química en la sangre a través de la piel, el pulmón o el tracto gastrointestinal, la concentración en cualquier órgano o tejido está controlada por muchos factores que determinan la farmacocinética de esa sustancia en el cuerpo. Como veremos más adelante, el cuerpo es capaz no sólo de detoxificar sino también de activar diversas sustancias químicas.

Farmacocinética y toxicidad

La farmacocinética describe el marco temporal de la absorción, distribución, metabolismo (transformaciones bioquímicas en el organismo) y eliminación o excreción de las sustancias químicas. Estas variables farmacocinéticas pueden tener mucha importancia en relación con los mecanismos de toxicidad, y en algunos casos pueden determinar si se produce o no toxicidad. Por ejemplo, si un material no se absorbe en cantidad suficiente no habrá toxicidad sistémica (en el interior del cuerpo). A la inversa, es posible que una sustancia química muy reactiva que se ha detoxificado rápidamente (en segundos o minutos) por la acción de enzimas digestivas o hepáticas no tenga tiempo para provocar toxicidad. Algunas sustancias y mezclas halogenadas polícicas, y también algunos metales como el plomo, no producirían una toxicidad significativa si su excreción fuera rápida; pero su acumulación hasta llegar a niveles suficientemente altos determina su toxicidad, pues la excreción no es rápida (a veces se mide en años). Afortunadamente, son muy pocas las sustancias químicas que se retienen durante tanto tiempo en el cuerpo. La acumulación de un material inocuo tampoco induce toxicidad. La velocidad con que una sustancia química se elimina del cuerpo y se detoxifica es lo que suele expresarse como su vida media, que es el tiempo que se necesita para que el 50 % de ella sea excretado o convertido en una forma no tóxica.

No obstante, si una sustancia química se acumula en una determinada célula u órgano, ello puede ser motivo para examinar más a fondo su toxicidad potencial en ese órgano. Más recientemente se han elaborado modelos matemáticos para extrapolar de los animales a los humanos variables farmacocinéticas. Tales modelos farmacocinéticos son sumamente útiles para generar hipótesis y determinar si el animal de experimentación puede ser un buen representante del ser humano. Sobre esta cuestión hay una amplia bibliografía (Gehring y cols. 1976; Reitz y cols. 1987; Nolan y cols. 1995). En la Figura 33.7 se muestra un ejemplo simplificado de modelo fisiológico.

Figura 33.7 • Modelo farmacocinético simplificado.



Possible afectación adversa de distintos niveles y sistemas

La toxicidad puede describirse a diferentes niveles biológicos. La lesión puede evaluarse en la totalidad de la persona (o animal), en los sistemas orgánicos, en las células o en las moléculas. Los sistemas orgánicos son los siguientes: inmunitario, respiratorio, cardiovascular, renal, endocrino, digestivo, musculoesquelético, sanguíneo, reproductivo y nervioso central. Son órganos decisivos el hígado, el riñón, el pulmón, el cerebro, la piel, los ojos, el corazón, los testículos u ovarios y otros órganos principales. Entre los efectos adversos a nivel celular/bioquímico figuran la interferencia de la función proteínica normal y de la función de los receptores endocrinos, la inhibición del metabolismo energético y la inhibición o inducción de enzimas por xenobióticos (sustancias extrañas). Entre los efectos adversos a nivel molecular figuran las alteraciones de la función normal de la transcripción ADN-ARN, de la unión de receptores específicos citoplasmáticos y nucleares, y de los genes o productos génicos. En última instancia, el deterioro funcional de un sistema orgánico importante suele deberse a alteraciones moleculares en determinadas células diana de ese órgano. Sin embargo, no siempre es posible, ni tampoco necesario, determinar en el nivel molecular el origen de un mecanismo. Se puede diseñar una intervención y una terapia sin conocer por completo la diana molecular. No obstante, conocer el mecanismo concreto de toxicidad incrementa el valor predictivo y la fiabilidad de las extrapolaciones a otras sustancias. La Figura 33.8 es un diagrama de los diversos niveles en los que se puede detectar una interferencia de los procesos fisiológicos normales. Las flechas indican que las consecuencias para un individuo pueden determinarse de arriba abajo (de la exposición y la farmacocinética a la toxicidad en el sistema/órgano) o de abajo arriba (del cambio molecular y el efecto celular/químico a la toxicidad en el sistema/órgano).

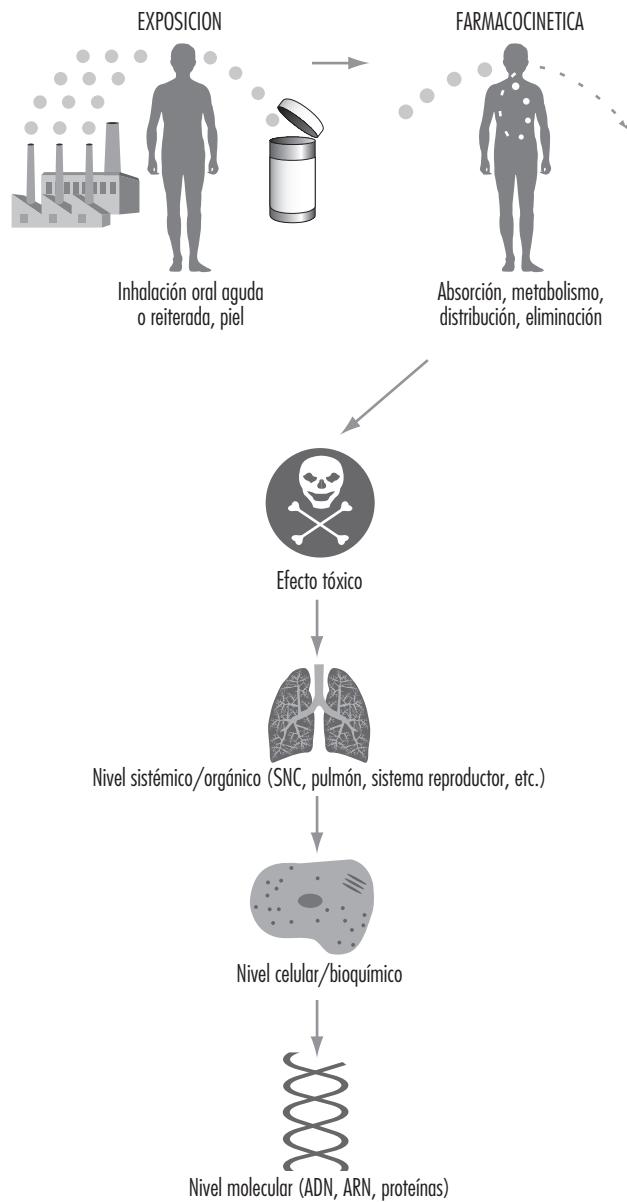
Ejemplos de mecanismos de la toxicidad

Hay mecanismos de la toxicidad que son directos y sencillos, pero también otros que son muy complejos. Son frecuentes las diferencias de tipo y mecanismo de la toxicidad y de nivel de efecto en función de que los efectos adversos se deban a una dosis única, alta y aguda (como una intoxicación accidental) o a la exposición repetida a una dosis más baja (exposición profesional o ambiental). En los ensayos, el procedimiento clásico es administrar una dosis única y alta mediante intubación directa en el estómago de un roedor o mediante exposición a una atmósfera de gases o vapores durante un período de dos a cuatro horas, según cual sea la forma que más se asemeje a la exposición humana. Se observa a los animales durante un período de dos semanas a partir de la exposición y después se examinan sus principales órganos externos e internos para comprobar las lesiones. Los ensayos a base de dosis repetidas pueden durar desde meses hasta años. En el caso de las especies de roedores se considera que dos años es un plazo suficiente para el estudio crónico (toda la vida) de evaluación de la toxicidad y carcinogenicidad, mientras que en el caso de los primates no humanos dos años se consideraría un plazo de estudio subcrónico (menos que toda la vida) para evaluar la toxicidad debida a dosis repetidas. Tras la exposición se realiza un examen completo de todos los tejidos, órganos y fluidos para determinar si se han producido efectos adversos.

Mecanismos de la toxicidad aguda

Los ejemplos que figuran a continuación son específicos de los efectos agudos por dosis altas, que pueden desembocar en la muerte o en una incapacidad grave. No obstante, en algunos casos la intervención puede producir efectos transitorios y totalmente reversibles. El resultado estará determinado por la dosis o por la gravedad de la exposición.

Figura 33.8 • Representación de los mecanismos de la toxicidad.



Asfixiantes simples. En el caso de los gases inertes y algunas otras sustancias no reactivas, el mecanismo de toxicidad es la falta de oxígeno (anoxia). Estas sustancias químicas, que hacen que el sistema nervioso central (SNC) se vea privado de oxígeno, se denominan *asfixiantes simples*. Cuando una persona entra en un espacio cerrado que contiene nitrógeno sin oxígeno suficiente, en su cerebro se agota inmediatamente el oxígeno, lo que lleva a la pérdida de conciencia y finalmente a la muerte si no se la saca rápidamente de allí. En casos extremos (oxígeno casi cero), la pérdida de conciencia puede sobrevenir a los pocos segundos. La salvación de la persona depende del rápido traslado a un entorno oxigenado. Cuando ese traslado se demora, la persona puede sobrevivir pero con un daño cerebral irreversible debido a la muerte de neuronas, que no se regeneran.

Asfixiantes químicos. El monóxido de carbono (CO) compite con el oxígeno por unirse a la hemoglobina (en los glóbulos rojos de la sangre) y por lo tanto priva a los tejidos del oxígeno necesario

para el metabolismo energético; la consecuencia puede ser la muerte celular. La intervención consiste en alejar a la persona de la fuente de CO y administrarle oxígeno. El uso directo de oxígeno está basado en la acción tóxica del CO. Otro potente asfixiante químico es el cianuro. El ion cianuro interfiere el metabolismo celular y la utilización de oxígeno para obtener energía.

El tratamiento con nitrito de sodio hace que la hemoglobina de los glóbulos rojos se transforme en metahemoglobina. Esta tiene una mayor afinidad de unión por el ion cianuro que la diana celular del cianuro. En consecuencia, la metahemoglobina se une al cianuro y lo mantiene alejado de las células diana. Esta es la base de la terapia con antídotos.

Depresores del sistema nervioso central (SNC). En el caso de diversas sustancias que como algunos disolventes son reactivas o que se transforman en productos intermedios reactivos, la toxicidad aguda se caracteriza por sedación o pérdida de la conciencia. Se ha formulado la hipótesis de que la sedación/anestesia se debe a una interacción del disolvente con las membranas celulares del SNC, que reduce su capacidad de transmitir señales eléctricas y químicas. Aunque la sedación pueda considerarse como una forma leve de toxicidad y fuera la base del desarrollo de los primeros anestésicos, hay que recordar que “la dosis hace al veneno”. Si se administra por ingestión o inhalación una dosis suficiente, el animal puede morir por parada respiratoria. Cuando no se produce muerte anestésica, este tipo de toxicidad suele ser fácilmente reversible cuando se aleja al sujeto de la exposición o la sustancia se redistribuye o se elimina del cuerpo.

Efectos cutáneos. Los efectos adversos en la piel pueden ir, según la sustancia que los causa, desde la irritación hasta la corrosión. Las soluciones ácidas y alcalinas fuertes son incompatibles con el tejido vivo y son corrosivas, por lo que producen quemaduras químicas y posible cicatrización. La formación de la cicatriz se debe a la muerte de células de la capa profunda de la dermis, que es la responsable de la regeneración. Con concentraciones más bajas el efecto puede limitarse a irritación de la primera capa de la piel.

Otro mecanismo tóxico específico de la piel es el de la sensibilización química. Veamos un ejemplo. Se produce sensibilización cuando el 2,4-dinitroclorobenceno se une a proteínas naturales de la piel y el sistema inmunitario reconoce como material extraño ese complejo proteico alterado. Al responder a ese material extraño, el sistema inmunitario activa unas células especiales para eliminar la sustancia extraña liberando unos mediadores (citoquinas) que provocan una erupción o dermatitis (véase “Inmunotoxicología”). Es la misma reacción del sistema inmunitario que se produce en la exposición a la planta llamada “zumaque venenoso” (género *Rhus*). La sensibilización inmunitaria es muy específica de cada sustancia química, y se precisan al menos dos exposiciones para que se desencadene la respuesta. La primera exposición sensibiliza (hace que las células reconozcan la sustancia), y las exposiciones ulteriores ponen en marcha la respuesta inmunitaria. Para tratar a personas sensibilizadas suele ser eficaz interrumpir el contacto y aplicar una terapia sintomática con cremas antiinflamatorias que contienen esteroides. En casos graves o rebeldes se utiliza junto con el tratamiento tópico un inmunosupresor que actúa a nivel sistémico, como la prednisona.

Sensibilización pulmonar. El diisocianato detolueno (TDI) provoca una respuesta de sensibilización inmunitaria, pero su diana es el pulmón. La sobreexposición a TDI en individuos susceptibles provoca edema pulmonar (acumulación de líquido), constricción bronquial y dificultad respiratoria. Es una enfermedad grave, que requiere alejar al individuo de otras posibles exposiciones ulteriores. El tratamiento es sobre todo sintomático. La sensibilización cutánea y pulmonar está relacionada con la

dosis. Exceder el nivel establecido de exposición profesional puede producir efectos adversos.

Efectos oculares. Las lesiones oculares van desde el enrojecimiento de la capa exterior (típico de las piscinas) hasta la formación de cataratas en la córnea y lesiones en el iris (parte coloreada del ojo). Cuando se estima que no se van a producir lesiones graves se realizan ensayos de irritación ocular. Muchos de los mecanismos que provocan corrosión cutánea pueden producir también lesiones oculares. Las sustancias corrosivas para la piel, como ácidos y álcalis fuertes (pH inferior a 2 y superior a 11,5 respectivamente), no se ensayan en los ojos de animales porque en la mayoría de los casos provocarían corrosión y ceguera debido a un mecanismo similar al que produce la corrosión cutánea. También los agentes tensoactivos como los detergentes y surfactantes pueden producir lesiones oculares, desde irritación hasta corrosión. Un grupo de sustancias que exige prudencia es el de los surfactantes de carga positiva (catiónicos), que pueden producir quemaduras, opacidad permanente de la córnea y vascularización (formación de vasos sanguíneos). Otra sustancia química, el dinitrofenol, tiene un efecto específico de formación de cataratas. Parece que está relacionado con la concentración de esta sustancia en el ojo, que es un ejemplo de especificidad en la distribución farmacocinética.

Con esta relación de ejemplos, en modo alguno exhaustiva, se ha pretendido ofrecer al lector un panorama de los diversos mecanismos de la toxicidad aguda.

Mecanismos de la toxicidad subcrónica y crónica

Cuando se administra una dosis única y elevada, algunas sustancias químicas no presentan el mismo mecanismo de toxicidad que cuando se administran repetidamente en dosis bajas pero tóxicas. Cuando se administra una dosis única y elevada cabe siempre la posibilidad de que se supere la capacidad de la persona para detoxificar o excretar la sustancia, y ello puede provocar una respuesta tóxica distinta de la que se produce cuando se administran repetidamente dosis más bajas. Un buen ejemplo a este respecto es el alcohol. Dosis altas de alcohol producen efectos primarios en el sistema nervioso central, mientras que la repetición de dosis más bajas produce lesión hepática.

Inhibición de la acetilcolinesterasa. Los plaguicidas organofosforados, por ejemplo, tienen en su mayoría escasa toxicidad para los mamíferos hasta que son activados metabólicamente, sobre todo en el hígado. El principal mecanismo de acción de los organofosforados es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) en el cerebro y el sistema nervioso periférico. La AChE es la enzima que normalmente pone fin a la estimulación provocada por el neurotransmisor acetilcolina. La inhibición leve de la AChE a lo largo de un período prolongado no se ha asociado con efectos adversos. A niveles de exposición altos, la incapacidad de poner fin a esa estimulación neuronal produce una sobreestimulación del sistema nervioso colinérgico, lo que en última instancia provoca toda una serie de síntomas, como parada respiratoria a la que sigue la muerte si no se trata. El tratamiento fundamental consiste en administrar atropina, que bloquea los efectos de la acetilcolina, y cloruro de pralidoxima, que reactiva la AchE inhibida. Por consiguiente, tanto la causa como el tratamiento de la toxicidad por organofosforados se abordan desde el conocimiento de la base bioquímica de los mecanismos de toxicidad de estas sustancias.

Activación metabólica. Muchas sustancias químicas, como el tetracloruro de carbono, el cloroformo, el acetilaminofluoreno, las nitrosaminas y el paraquat, se activan metabólicamente liberando radicales libres u otros productos intermedios reactivos que inhiben o interfieren la función celular normal. A niveles de

exposición altos ello produce la muerte celular (véase “Lesión celular y muerte celular”). Aunque todavía desconocemos las interacciones y dianas celulares específicas, los sistemas orgánicos que poseen la capacidad de activar esas sustancias, como el hígado, el riñón y el pulmón, son todos dianas potenciales del efecto nocivo. Concretamente, determinadas células de un órgano tienen una mayor o menor capacidad de activar o detoxificar esos productos intermedios, y es esa capacidad lo que determina la susceptibilidad intracelular de un órgano. El metabolismo es una de las razones por las que el conocimiento de la farmacocinética, que describe esos tipos de transformaciones y la distribución y eliminación de esos productos intermedios, es importante para reconocer el mecanismo de acción de esas sustancias.

Mecanismos del cáncer. El cáncer es una multiplicidad de enfermedades, y, a pesar de que se está avanzando rápidamente en el conocimiento de determinados tipos de cáncer gracias a las muchas técnicas de biología molecular que se han desarrollado desde 1980, es aún mucho lo que queda por saber.

No obstante, está claro que el desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples fases, y que hay unos genes críticos que son la clave de distintos tipos de cáncer. Las alteraciones del ADN (mutaciones somáticas) en algunos de esos genes críticos pueden provocar una mayor susceptibilidad o lesiones cancerosas (véase “Toxicología genética”). Contribuye a las mutaciones somáticas la exposición a sustancias químicas, naturales (en alimentos cocinados como la carne de vaca y el pescado) o sintéticas (como la bencidina, que se utiliza como colorante), o a agentes físicos (la radiación ultravioleta del sol, el radón procedente del suelo, la radiación gamma de las técnicas médicas o la actividad industrial).

Sin embargo, hay sustancias naturales y sintéticas (como los antioxidantes) y procesos de reparación del ADN que desempeñan una función protectora y mantienen la homeostasis. Está claro que la genética es un factor importante en el cáncer, pues síndromes patológicos genéticos como el xeroderma pigmentoso, en el que el ADN no se repara como sería normal, incrementan radicalmente la susceptibilidad al cáncer de piel derivado de la exposición a la luz ultravioleta del sol.

Mecanismos de la toxicidad reproductiva. Al igual que en el caso del cáncer, se conocen muchos mecanismos de la toxicidad que afecta a la reproducción y/o el desarrollo, pero es mucho lo que aún queda por descubrir. Se sabe que determinados virus (como el de la rubéola), infecciones bacterianas y fármacos (como la talidomida y la vitamina A) afectan negativamente al desarrollo. En un trabajo reciente de Khera (1991) revisado por Carney (1994) se ha comprobado que las anomalías del desarrollo observadas en ensayos realizados con etilenglicol en animales son atribuibles a metabolitos ácidos del metabolismo de la madre. Esto ocurre cuando el etilenglicol se metaboliza a metabolitos ácidos como los ácidos glicólico y oxálico. Los efectos ulteriores en la placenta y el feto parecen deberse a ese proceso de intoxicación metabólica.

Conclusiones

En este artículo hemos pretendido ofrecer un panorama de varios mecanismos de la toxicidad que conocemos y subrayar la necesidad de proseguir los estudios. Es importante entender que los conocimientos mecanicistas no son absolutamente necesarios para proteger la salud humana o ambiental. Pero gracias a ellos el profesional podrá predecir y tratar mejor la toxicidad. Las técnicas que actualmente se utilizan para elucidar un mecanismo concreto dependen del conocimiento colectivo de los científicos y de la opinión de los encargados de adoptar decisiones en el ámbito de la salud humana.

LESION CELULAR Y MUERTE CELULAR

**Benjamin F. Trump
e Irene K. Berezsky**

Prácticamente todos los esfuerzos de la medicina se dedican a impedir la muerte celular, en enfermedades como el infarto de miocardio, los accidentes cerebrovasculares, los traumatismos y el shock, o a provocarla, como en el caso de las enfermedades infecciosas y el cáncer. Es por consiguiente esencial comprender la naturaleza de los mecanismos que intervienen en ese proceso. La muerte celular se ha dividido en “accidental”, es decir, causada por agentes tóxicos, isquemia, etc., y “programada”, que es la que se produce en el desarrollo embrionario, como por ejemplo la formación de los dedos o la resorción de la cola en el renacuajo.

La lesión celular y la muerte celular tienen por ello importancia tanto fisiológica como patofisiológica. La muerte fisiológica de la célula es sumamente importante durante la embriogénesis y el desarrollo embrionario. El estudio de la muerte celular durante el desarrollo ha permitido obtener información nueva y de gran importancia sobre los procesos de genética molecular, gracias especialmente al análisis del desarrollo en los animales invertebrados. En esos animales se ha estudiado minuciosamente la localización precisa y la significación de las células que están destinadas a morir, y mediante las técnicas mutagenéticas clásicas se han identificado ya varios de los genes que intervienen en ese proceso. En los órganos adultos, el equilibrio entre la muerte celular y la proliferación celular controla el tamaño de los órganos. En algunos órganos, como la piel y el intestino, la renovación celular es continua. En la piel, por ejemplo, las células se van diferenciando al llegar a la superficie hasta que llegan a la fase de diferenciación terminal y a la muerte celular a medida que avanza la queratinización, con la formación de las llamadas “capas plegadas en zigzag”.

Son muchas las clases de sustancias tóxicas que pueden inducir una lesión celular aguda y después la muerte. Tenemos así la anoxia y la isquemia, con sus análogos químicos como el cianuro de potasio; los carcinógenos químicos, que forman electrófilos que se unen con enlaces covalentes a proteínas de los ácidos nucleicos; sustancias oxidantes, que provocan la formación de radicales libres y lesión oxidativa; la activación del complemento, y diversos ionóforos de calcio. La muerte celular es también un importante componente de la carcinogénesis química; muchos carcinógenos químicos completos, a dosis carcinógenas, producen necrosis aguda e inflamación seguidas de regeneración y preneoplasia.

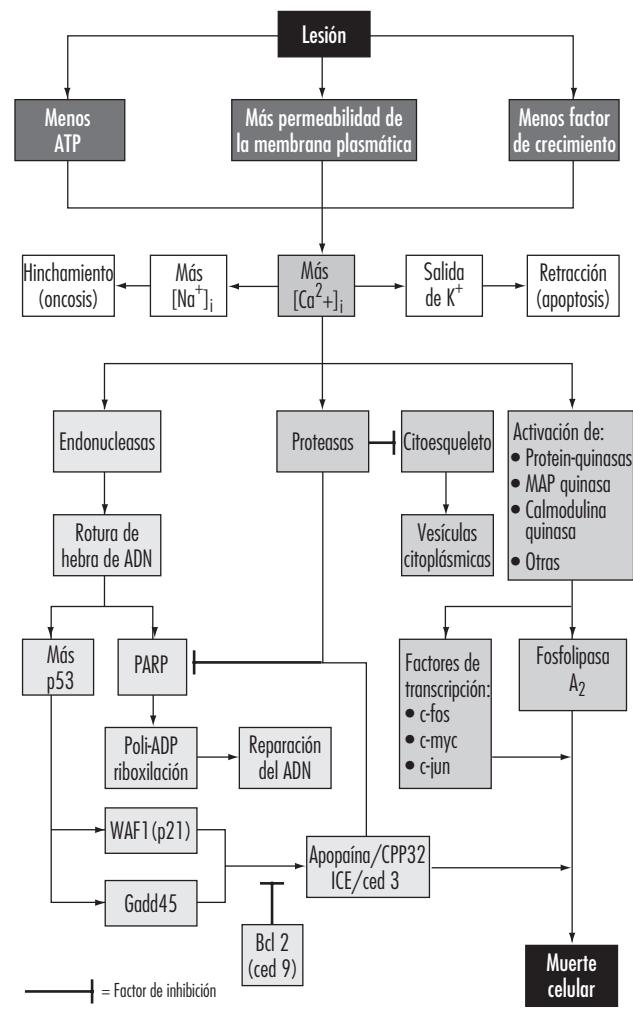
Definiciones

Lesión celular

La lesión celular se define como un hecho o estímulo, por ejemplo una sustancia química tóxica, que perturba la homeostasis normal de la célula, lo que hace que se produzcan diversos acontecimientos (Figura 33.9). Las dianas principales de la lesión letal que figura en el ejemplo son la inhibición de la síntesis del ATP, la interrupción de la continuidad de la membrana plasmática y la supresión de factores esenciales para el crecimiento.

Las lesiones letales acaban en la muerte de la célula al cabo de un período de tiempo variable, que depende de la temperatura, el tipo de célula y el estímulo; pero también pueden producirse lesiones subletales o crónicas —que provocan un estado de alteración de la homeostasis que, aunque anómalo, no desemboca en la muerte de la célula (Trump y Arstila 1971; Trump y Berezsky 1992; Trump y Berezsky 1995; Trump, Berezsky y Osornio-Vargas 1981). En los casos de lesión letal se observa

Figura 33.9 • Lesión celular.



antes de la muerte celular lo que se llama la “fase preletal”. Si durante ese tiempo se elimina el estímulo causante, la anoxia por ejemplo, la célula se recupera; sin embargo, llega un momento (el “punto sin retorno” o punto de muerte celular) en el que a pesar de eliminarse la causa de la lesión la célula no puede recuperarse, sino que pasa por un proceso de degradación e hidrólisis hasta llegar finalmente al equilibrio fisiocoquímico con el entorno. Es la fase que se conoce como necrosis. Durante la fase preletal se producen principalmente dos tipos de alteraciones, dependiendo de la célula y del tipo de lesión. Esos dos tipos de alteraciones se denominan apoptosis y oncosis.

Apoptosis

Este término se deriva del griego *apo*, “lejos de”, y *ptosis*, “caer”. Se eligió este nombre porque, durante este fase de alteración preletal, la célula se retrae y se forman en su periferia numerosas vesículas que después se desprenden y se alejan flotando. La apoptosis se da en diversos tipos de células a consecuencia de diversos tipos de lesión tóxica (Wyllie, Kerr y Currie 1980). Es especialmente pronunciada en los linfocitos, donde es el principal mecanismo de reposición de clones linfocíticos. Los fragmentos resultantes se convierten en los cuerpos basófilos que se observan en el interior de los macrófagos en los ganglios linfáticos. En otros órganos, la apoptosis se produce típicamente en células aisladas que se eliminan rápidamente, antes y después de la muerte, al

fagocitar sus fragmentos células parenquimales vecinas o macrófagos. Cuando se produce en células aisladas con la fagocitosis subsiguiente, la apoptosis no suele provocar inflamación. Antes de morir, las células apoptóticas muestran un citosol muy denso con las mitocondrias normales o condensadas. El retículo endoplásmico (RE) es normal o está sólo ligeramente dilatado. La cromatina del núcleo está claramente acumulada a lo largo de la envoltura y alrededor del nucleolo. El contorno del núcleo es también irregular, y hay fragmentación nuclear. La condensación de la cromatina está asociada con una fragmentación del ADN que, en muchos casos, se produce entre nucleosomas, lo que explica el característico aspecto de escalera en la electroforesis.

En la apoptosis, el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ puede estimular el flujo de salida de K^+ , que hace que la célula se retraje, probablemente con necesidad de ATP. Por consiguiente, es más probable que deriven en apoptosis las lesiones que inhiben totalmente la síntesis de ATP. El incremento sostenido del $[Ca^{2+}]_i$ tiene diversos efectos deletéreos, como la activación de proteasas, endonucleasas y fosfolipasas. La activación de las endonucleasas provoca roturas sencillas y dobles del ADN, lo cual estimula a su vez un aumento de los niveles de p53, y poli-ADP riboxilación, así como de proteínas nucleares que son esenciales para la reparación del ADN. La activación de las proteasas modifica una serie de sustratos, como la actina y proteínas conexas, lo que lleva a la formación de vesículas. Otro sustrato importante es la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), que inhibe la reparación del ADN. El aumento del $[Ca^{2+}]_i$ está asociado también a la activación de una serie de protein-quinasas, como la MAP quinasa, la calmodulina quinasa y otras. Esas quinasas participan en la activación de factores de transcripción que inician la transcripción de genes inmediatos, como por ejemplo c-fos, c-jun y c-myc, y en la activación de la fosfolipasa A₂, que tiene como resultado la permeabilización de la membrana plasmática y de las membranas intracelulares, como las membranas interiores de las mitocondrias.

Oncosis

Este tipo de alteración preletal se denominó oncosis, derivado del griego *onkos*, “hincharse”, porque la célula empieza a aumentar de tamaño casi inmediatamente después de la lesión (Majno y Joris 1995). Y se hincha porque aumentan los cationes en el agua intracelular. El cation más responsable de que esto ocurra es el sodio, que normalmente está regulado para mantener el volumen celular. Sin embargo, en ausencia de ATP o cuando se inhibe la Na-ATPasa de la membrana plasmática, se pierde el control del volumen debido a la proteína intracelular, y siguen aumentando los cationes de sodio en el agua. Entre las primeras manifestaciones de la oncosis están por lo tanto un aumento del $[Na^+]$ i, que hace que la célula se hinche, y un aumento también del $[Ca^{2+}]_i$ debido bien a la entrada de espacio extracelular, bien a la liberación de depósitos intracelulares. Ello hace que se hinchen el citosol, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y que se formen vesículas acuosas en torno a la superficie de la célula. Las mitocondrias se condensan al principio, pero después se hinchan también, y considerablemente, al estar dañada la membrana mitocondrial interior. En este tipo de alteración preletal, la cromatina se condensa y en última instancia se degrada; no se observa sin embargo la configuración en escalera que es característica de la apoptosis.

Necrosis

Con el término necrosis se designa una serie de alteraciones que se producen después de la muerte celular, cuando la célula se convierte en detritos que son típicamente eliminados por la respuesta inflamatoria. Cabe distinguir dos tipos: la necrosis oncotómica y la necrosis apoptótica. La necrosis oncotómica suele darse

en zonas amplias, por ejemplo en un infarto de miocardio, o regionalmente en un órgano que ha sufrido toxicidad química, como el túbulo proximal del riñón tras la administración de $HgCl_2$. Se ven afectadas amplias zonas del órgano, y las células necróticas incitan rápidamente a una reacción inflamatoria, al principio aguda y después crónica. Si el organismo sobrevive, en muchos órganos siguen a la necrosis la eliminación de las células muertas y la regeneración, por ejemplo en el hígado o en el riñón después de una toxicidad química. La necrosis apoptótica, en cambio, se desarrolla típicamente a nivel de células individuales, y los detritos necróticos se forman en el interior de los fagocitos o macrófagos o de las células parenquimales vecinas. Entre las primeras manifestaciones de la necrosis celular están las interrupciones de la continuidad de la membrana plasmática y la aparición de densidades floculentas, que son proteínas desnaturalizadas dentro de la matriz mitocondrial. En algunas formas de lesión que inicialmente no interfieren la acumulación de calcio en las mitocondrias, se observan en el interior de éstas depósitos de fosfato de calcio. También se fragmentan de manera análoga otros sistemas membranosos, como el RE, los lisosomas y el aparato de Golgi. Al final, la cromatina del núcleo sufre una lisis resultado del ataque de hidrolasas lisosómicas. Tras la muerte celular, las hidrolasas lisosómicas desempeñan un papel importante en la eliminación de los detritos con el concurso de catepsinas, nucleolasas y lipasas, pues éstas tienen un pH ácido óptimo y pueden sobrevivir al pH bajo de las células necróticas mientras que otras enzimas celulares se han desnaturalizado y desactivado.

Mecanismos

Estímulo inicial

En el caso de las lesiones letales, las más comunes de las interacciones iniciales que desembocan en muerte celular son las que consisten en una interferencia del metabolismo de la energía, como en el caso de la anoxia, la isquemia o los inhibidores de la respiración, o en una glicólisis, como en el caso del cianuro de potasio, el monóxido de carbono, yodo-acetatos, etc. Como se ha señalado anteriormente, es característico que las dosis altas de compuestos que inhiben el metabolismo de la energía desembocuen en oncosis. El otro tipo frecuente de lesión inicial que deriva en muerte celular aguda es la modificación de la función de la membrana plasmática (Trump y Arstila 1971; Trump, Berezesky y Osornio-Vargas 1981). Puede consistir bien en un daño directo con permeabilización, como en los casos de trauma o de activación del complejo C5b-C9 del complemento, bien en un daño mecánico a la membrana celular, bien en la inhibición de la bomba de sodio-potasio (Na^+-K^+) por glicóxidos como la ouabaína. También producen lesión letal aguda ionóforos de calcio como la ionomicina o el A23187, que transportan rápidamente $[Ca^{2+}]$ por el gradiente hasta la célula. En algunos casos, la alteración preletal sigue la pauta de la apoptosis; en otros, la de la oncosis.

Rutas de señalización

En muchos tipos de lesión se ven afectadas rápidamente la respiración y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. En algunas células, ello estimula la glicolisis anaeróbica, que es capaz de mantener el ATP, el cual sin embargo se inhibe cuando las lesiones son numerosas. La falta de ATP tiene como resultado que no se aporta energía a diversos e importantes procesos homeostáticos, sobre todo al control de la homeostasis iónica intracelular (Trump y Berezesky 1992; Trump, Berezesky y Osornio-Vargas 1981). Esto hace que aumente rápidamente el $[Ca^{2+}]_i$, y el incremento de $[Na^+]$ y $[Cl^-]$ hace que la célula se hinche. El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ activa otros mecanismos de señalización que examinaremos más adelante, entre ellos una serie de quinasas, lo

que puede provocar un incremento de la transcripción de genes inmediatos. El aumento del $[Ca^{2+}]_i$ modifica asimismo la función citoesquelética, con formación de vesículas y activación de endonucleasas, proteasas y fosfolipasas. Parece que éstas desencadenan muchos de los importantes efectos que hemos visto anteriormente, como el daño a la membrana por activación de las proteasas y lipasas, la degradación directa del ADN por activación de las endonucleasas y la activación de quinasas como la MAP quinasa y la calmodulina quinasa, que actúan como factores de transcripción.

Gracias a los numerosos trabajos dedicados al desarrollo en los invertebrados *C. elegans* y *Drosophila*, así como en células humanas y animales, se ha identificado una serie de genes "promuerte". Se ha comprobado asimismo que algunos de esos genes de invertebrados tienen análogos en los mamíferos. El gen *ced-3*, por ejemplo, que es esencial para la muerte celular programada en *C. elegans*, presenta actividad proteásica y una marcada homología con la enzima convertidora de interleucinas (ICE) de los mamíferos. Recientemente se ha descubierto un gen muy relacionado con aquél, llamado apopáina o *pICE*, en el que la homología es aún mayor (Nicholson y cols. 1995). En la *Drosophila* parece que el gen "cosechador" interviene en una señal que conduce a la muerte celular programada. Otros genes "promuerte" son la proteína de la membrana Fas y el *p53*, importante gen supresor de tumores que está ampliamente conservado. El *p53* se induce al nivel proteico una vez que el ADN ha resultado dañado, y al fosforilarse actúa como factor de transcripción para otros genes como el *gadd45* y el *waf-1*, que intervienen en la señalización de la muerte celular. Parece que intervienen asimismo en algunos sistemas otros genes inmediatos-tempranos como *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*.

Al mismo tiempo hay genes "antimuerte" cuya función es aparentemente la de contrarrestar a los genes "promuerte". El primero que se identificó de este grupo fue el *ced-9* en *C. elegans*, que es homólogo del *bcl-2* de los humanos. Esos genes actúan de una manera que aún desconocemos para impedir que toxinas genéticas o químicas maten a las células. Algunos datos recientes indican que el *bcl-2* puede actuar como antioxidante. Se están dedicando hoy muchos esfuerzos a tratar de conocer los genes que intervienen y a encontrar la forma de activarlos o inhibirlos según los casos.

TOXICOLOGIA GENETICA

**R. Rita Misra
y Michael P. Waalkes**

La toxicología genética es, por definición, el estudio de la forma en que agentes químicos o físicos afectan al complejo proceso de la herencia. Las sustancias químicas genotóxicas son compuestos capaces de modificar el material hereditario de las células vivas. La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende inevitablemente de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de ésta una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas críticas de las células. La probabilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula de reparar o amplificar el daño genético, la oportunidad de expresar cualquier alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes.

Figura 33.10 • Organización de la información hereditaria en los seres humanos: a) primaria, b) secundaria y c) terciaria.

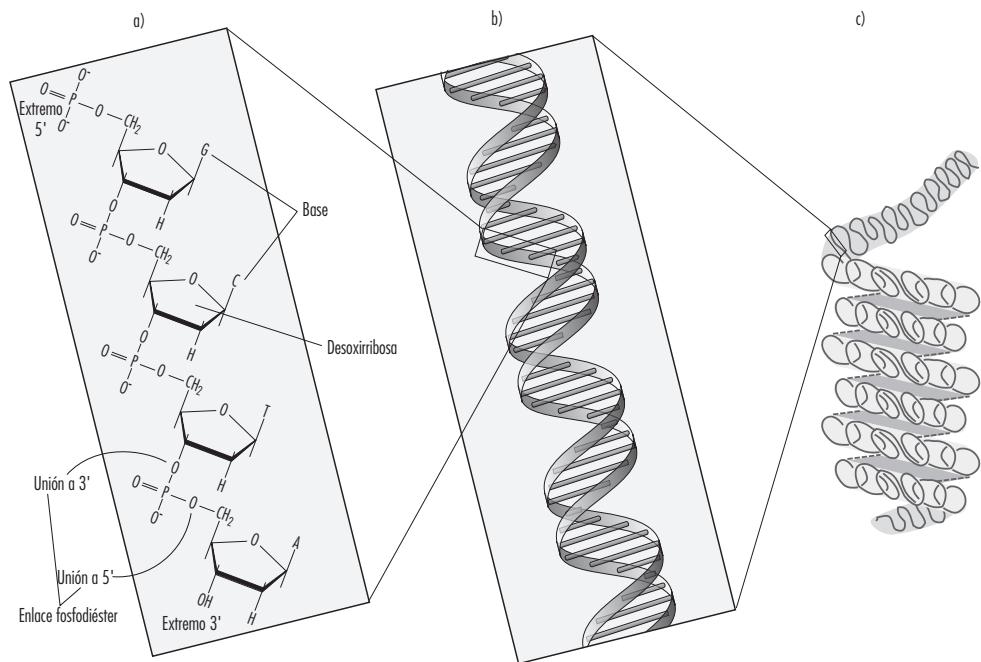


Figura 33.11 • Bioactivación de a) benzo(a)pireno y b) N-nitrosodimetilamina.

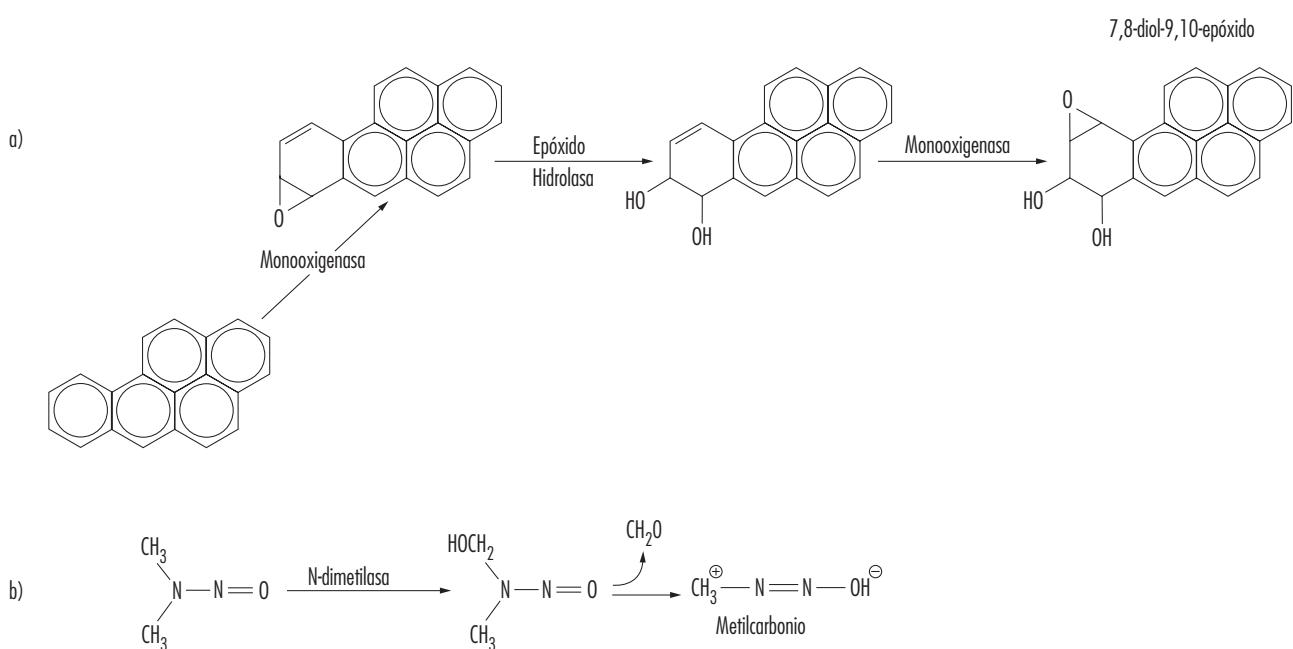
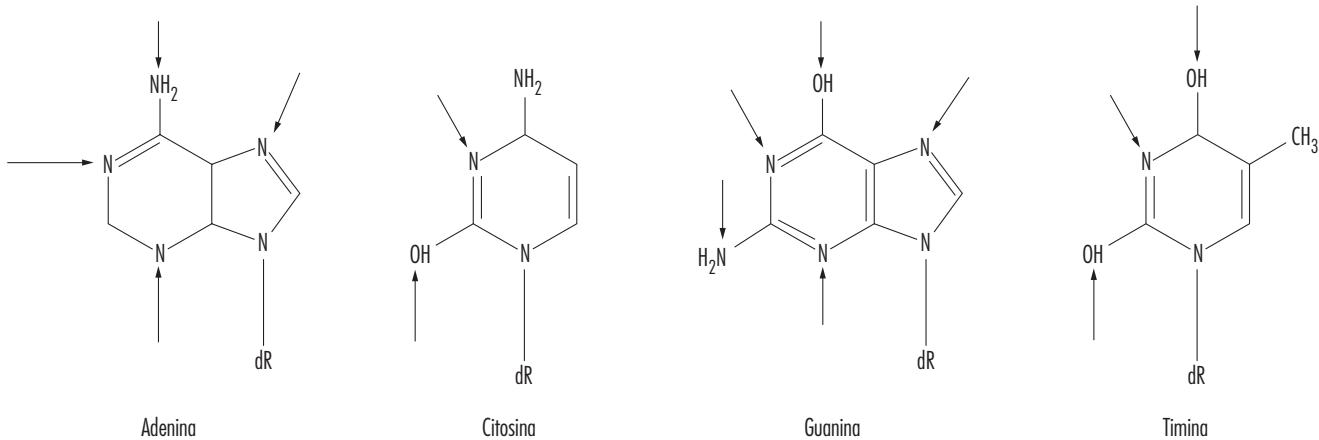


Figura 33.12 • Principales localizaciones del daño al ADN inducido por sustancias químicas.



En los organismos superiores, la información hereditaria está organizada en cromosomas. Los cromosomas son unas hebras muy condensadas de ADN asociado a proteínas. Dentro de cada cromosoma, cada molécula de ADN está configurada como un par de largas cadenas no ramificadas de subunidades de nucleótidos unidas por enlaces fosfodiéster que unen el carbono 5 de una unidad desoxirribosa al carbono 3 de la siguiente (Figura 33.10). Además, una de las cuatro bases de nucleótidos diferentes (adenina, citosina, guanina o timina) está unida a cada subunidad de desoxirribosa como las cuentas de un collar. En el sentido tridimensional, cada par de hebras de ADN forma una doble hélice en la que todas las bases están orientadas hacia el interior de la espiral. Dentro de la hélice, cada base de una hebra está asociada a su base complementaria de la otra hebra; el enlace hidrógeno impone un apareamiento fuerte y no covalente de la adenina con la timina y de la guanina con la citosina (Figura 33.10). Como la secuencia de bases de nucleótidos es complementaria a todo lo largo de la doble molécula de ADN, ambas hebras llevan esencialmente la misma información genética. De hecho, durante la replicación del ADN cada hebra sirve como molde para la producción de otra hebra nueva y equivalente.

Utilizando el ARN y una serie de proteínas, la célula acaba por descifrar la información codificada por la secuencia lineal de bases dentro de regiones específicas del ADN (genes) y produce proteínas que son esenciales para su supervivencia básica y para el crecimiento y diferenciación normales. En esencia, los nucleótidos funcionan como un alfabeto biológico que se utiliza para codificar la producción de aminoácidos, que son los componentes básicos de las proteínas.

Cuando se insertan nucleótidos incorrectos o se pierden nucleótidos, o cuando se añaden nucleótidos innecesarios durante la síntesis del ADN, el error se denomina mutación. Se ha estimado que se produce menos de una mutación por cada 10^9 nucleótidos que se incorporan durante la replicación celular normal. Aunque las mutaciones no son necesariamente nocivas, las alteraciones que provocan una desactivación o una expresión excesiva de genes importantes pueden desembocar en diversos trastornos, como el cáncer, enfermedades hereditarias, anomalías del desarrollo, esterilidad y muerte embrionaria o perinatal. En muy raras ocasiones una mutación puede incrementar las posibilidades de supervivencia; esos casos son la base de la selección natural.

Aunque algunas sustancias químicas reaccionan directamente con el ADN, en la mayoría de ellas se precisa una activación

metabólica. En estos casos, son productos intermedios electrófilos, como los epóxidos o iones carbonio, los que en última instancia inducen las lesiones en diversos lugares nucleófilos del material genético (Figura 33.11). En otros casos, la genotoxicidad está mediada por productos secundarios de la interacción del compuesto con lípidos, proteínas u oxígeno intracelulares.

Figura 33.13 • Diversos tipos de daño al complejo ADN-proteína.

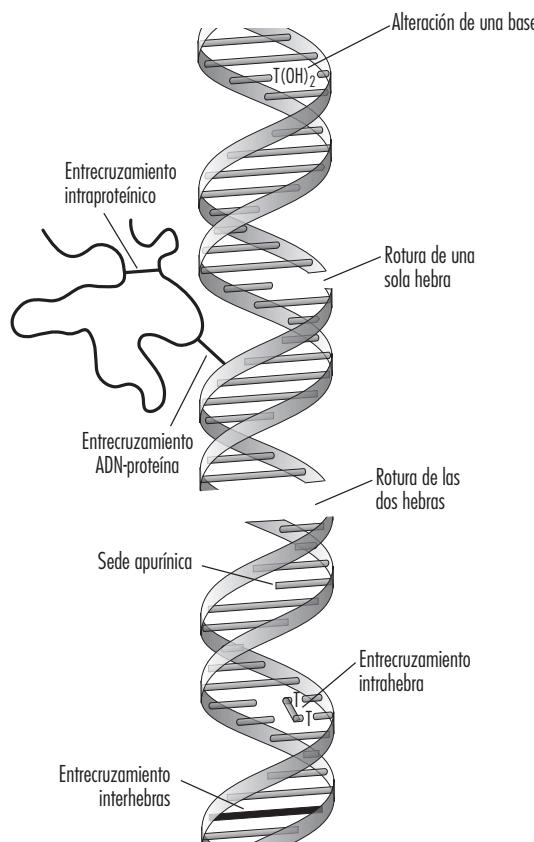


Tabla 33.4 • Trastornos hereditarios con propensión al cáncer en los que parece intervenir una reparación defectuosa del ADN.

Síndrome	Síntomas	Fenotipo celular
Ataxia telangiectasia	Deterioro neurológico Imunodeficiencia Alta incidencia de linfoma	Hipersensibilidad a la radiación ionizante y a algunos agentes alquilantes Réplica mal regulada de ADN dañado (puede indicar menos tiempo para la reparación del ADN)
Síndrome de Bloom	Anomalías del desarrollo Lesiones en la piel expuesta Alta incidencia de tumores del sistema inmunitario y del tracto gastrointestinal	Alta frecuencia de aberraciones cromosómicas Sellado defectuoso de roturas asociadas a la reparación del ADN
Anemia de Fanconi	Retraso del crecimiento Alta incidencia de leucemia	Hipersensibilidad a agentes de entrecruzamiento Alta frecuencia de aberraciones cromosómicas Reparación defectuosa de entrecruzamientos en el ADN
Cáncer de colon hereditario sin poliposis	Alta incidencia de cáncer de colon	Reparación defectuosa del desemparejamiento del ADN (cuando se, inserta durante la replicación, un nucleótido equivocado)
Xeroderma pigmentoso	Alta incidencia de epiteloma en las zonas de piel expuestas Deterioro neurológico (en muchos casos)	Hipersensibilidad a la luz UV y a muchos carcinógenos químicos Defectos en la reparación de excisión y/o reproducción de ADN dañado

Debido a su relativa abundancia en las células, las proteínas son la diana más frecuente de la interacción tóxica. No obstante, preocupa más la modificación del ADN por la importante misión de éste como regulador del crecimiento y la diferenciación a lo largo de múltiples generaciones de células.

Al nivel molecular, los compuestos electrófilos tienden a atacar al oxígeno y el nitrógeno del ADN. En la Figura 33.12 se indican los lugares que más se prestan a la modificación. Aunque también son dianas de la modificación química los oxígenos de los grupos fosfato del esqueleto del ADN, se estima que tiene más importancia biológica el daño a las bases, ya que estos grupos están considerados como los elementos primarios de información de la molécula de ADN.

Es característico que los compuestos que contienen un sola unidad electrófila causen la genotoxicidad produciendo monoadductos en el ADN. Análogamente, los compuestos que contienen dos o más unidades reactivas pueden reaccionar con dos centros nucleófilos distintos y de esa manera producir entrecruzamientos (crosslinks) intra o intermoleculares en el material genético (Figura 33.13). Los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína pueden ser especialmente citotóxicos, pues pueden formar bloques completos para la replicación del ADN. Por razones obvias, la muerte de la célula elimina la posibilidad de que sufra una mutación o una transformación neoplásica. Los agentes

genotóxicos pueden actuar también induciendo roturas en el esqueleto fosfodiéster, o entre bases y azúcares del ADN (produciendo lugares abásicos). Esas roturas pueden deberse directamente a reactividad química en el lugar del daño, o pueden producirse durante la reparación de uno de los tipos de lesión del ADN antes mencionados.

En los últimos treinta o cuarenta años se han desarrollado diversas técnicas para determinar el tipo de daño genético inducido por diversas sustancias químicas. Esos ensayos se describen con detalle en otro lugar de este capítulo y de la *Enciclopedia*.

La replicación errónea de "microlesiones", como masa de aductos, lugares abásicos o roturas de una sola hebra, puede acabar produciendo sustituciones de pares de bases de nucleótidos, o la inserción o supresión de cortos fragmentos de polinucleótidos en el ADN cromosómico. En cambio, las "macrolesiones", como masa de aductos, entrecruzamientos o roturas de las dos hebras, pueden desencadenar la adición, pérdida o reorganización de fragmentos cromosómicos relativamente grandes. En cualquier caso, las consecuencias pueden ser devastadoras para el organismo, pues cualquiera de esos hechos puede producir muerte celular, pérdida de función o transformación maligna de las células. Sabemos poco de la forma exacta en que el daño sufrido por el ADN provoca el cáncer. Actualmente se piensa que una parte del proceso puede ser la activación

Tabla 33.5 • Ejemplos de sustancias químicas que muestran genotoxicidad en células humanas.

Clase de sustancia	Ejemplo	Fuente de la exposición	Lesión genotóxica probable
Aflatoxinas	Aflatoxina B1	Alimentos contaminados	Aductos de ADN abultados
Aminas aromáticas	2-Acetilaminofluoreno	Ambiental	Aductos de ADN abultados
Aziridina quinonas	Mitomicina C	Quimioterapia por cáncer	Monoadductos, entrecruzamientos interhebras y roturas monohebra en el ADN.
Hidrocarburos clorados	Cloruro de vinilo	Ambiental	Monoadductos en el ADN
Metales y compuestos metálicos	Cisplatina	Quimioterapia por cáncer	Entrecruzamientos intra e interhebras en el ADN
	Compuestos de níquel	Ambiental	Monoadductos y roturas monohebra en el ADN
Mostazas nitrogenadas	Ciclofosfamida	Quimioterapia por cáncer	Monoadductos y entrecruzamientos interhebras en el ADN
Nitrosaminas	N-Nitrosodimetilamina	Alimentos contaminados	Monoadductos en el ADN
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Benz(a)pireno	Ambiental	Aductos de ADN abultados

inadecuada de protooncogenes como el myc y el ras, y/o la desactivación de genes supresores de tumores que se han identificado recientemente, como el p53. La expresión anómala de uno u otro tipo de gen anula los mecanismos con que normalmente las células controlan la proliferación y/o diferenciación celular.

La mayoría de los datos experimentales indica que el desarrollo del cáncer tras exposición a compuestos electrófilos es relativamente infrecuente. Ello puede explicarse en parte por la capacidad intrínseca de la célula de reconocer y reparar el ADN dañado o por la imposibilidad de sobrevivir que tienen las células cuyo ADN está dañado. Durante la reparación se elimina el nucleótido de la lesión y otros nucleótidos contiguos y (utilizando la otra hebra como molde) se sintetiza un nuevo fragmento de ADN que se coloca en su lugar. Para que sea eficaz, la reparación del ADN debe producirse de manera muy precisa con anterioridad a la división celular, antes de que la mutación pueda propagarse.

Los estudios clínicos han demostrado que las personas con defectos heredados en su capacidad de reparar el ADN dañado suelen desarrollar cáncer y/o anomalías de desarrollo a una edad temprana (Tabla 33.4). Esos ejemplos proporcionan sólidos argumentos en el sentido de que la acumulación de daños al ADN está relacionada con la enfermedad humana. Análogamente, agentes que promueven la proliferación celular (como el acetato de tetradecanoilforbol) incrementan con frecuencia la carcinogénesis. En el caso de esos compuestos, la mayor probabilidad de transformación neoplásica puede ser una consecuencia directa del menor tiempo de que dispone la célula para llevar a cabo la adecuada reparación del ADN.

Las primeras teorías sobre la forma en que las sustancias químicas interactúan con el ADN se remontan a los estudios que se realizaron durante el desarrollo del gas mostaza con fines bélicos. Se amplió después el conocimiento de estos procesos cuando se trató de identificar agentes anticarcinógenos que detuvieran selectivamente la replicación de células tumorales en rápida división. La mayor preocupación de la opinión pública por los peligros ambientales ha impulsado nuevas investigaciones sobre los mecanismos y consecuencias de la interacción de sustancias químicas y material genético. En la Tabla 33.5 figuran ejemplos de diversos tipos de sustancias químicas que causan genotoxicidad.

Cuando el sistema inmunitario actúa como diana pasiva de las agresiones químicas, el resultado puede ser una reducción de la resistencia a las infecciones y a determinadas formas de neoplasia, o una desregulación/estimulación inmunitaria que puede agravar la alergia o la autoinmunidad. Cuando el sistema inmunitario responde a la especificidad antigenica del xenobiótico o del antígeno del huésped modificado por el compuesto, la toxicidad puede ponerse de manifiesto en forma de alergias o enfermedades autoinmunitarias.

Se han desarrollado modelos animales para investigar la inmunosupresión inducida por sustancias químicas, y algunos de esos métodos se han validado (Burleson, Munson y Dean 1995; IPCS 1996). Para la realización de ensayos se adopta un enfoque en tres niveles a fin de hacer una selección adecuada entre el enorme número de pruebas de que se dispone. En general, el objetivo del primer nivel es identificar los inmunotóxicos potenciales. Si se identifica una inmunotoxicidad potencial, se realizan ensayos de un segundo nivel para confirmar y caracterizar mejor los cambios observados. Las investigaciones de tercer nivel comprenden estudios especiales sobre el mecanismo de acción del compuesto. En esos estudios con animales de laboratorio se han identificado varios xenobióticos como inmunotóxicos que producen inmunosupresión.

La base de datos sobre los trastornos de la función inmunitaria en los humanos por efecto de sustancias químicas ambientales es limitada (Descotes 1986; National Research Council, Subcommittee on Immunotoxicology 1992). En los estudios clínicos y epidemiológicos encaminados a investigar el efecto de esas sustancias sobre la salud humana se han utilizado poco los marcadores de inmunotoxicidad. Como esos estudios tampoco han sido frecuentes, su interpretación no suele permitir extraer conclusiones inequívocas, debido por ejemplo al carácter no controlado de la exposición. Por esa razón, en la actualidad las decisiones sobre peligros y riesgos se basan en evaluaciones de la inmunotoxicidad en roedores que después se extrapolan a los seres humanos.

Las reacciones de hipersensibilidad, en especial el asma alérgico y la dermatitis por contacto, son importantes problemas de salud laboral en los países industrializados (Vos, Younes y Smith 1995). El fenómeno de la sensibilización por contacto se investigó en primer lugar en la cobaya (Andersen y Maibach 1985), que hasta hace poco ha sido la especie preferida para los ensayos de predicción. Hay muchos métodos de ensayo con cobayas, y los más utilizados son el ensayo de maximización y la prueba de oclusión de Buehler. Estos ensayos con cobayas y los nuevos métodos que se han desarrollado en los ratones, como las pruebas de inflamación de la oreja y el ensayo de ganglios linfáticos locales, proporcionan al toxicólogo los instrumentos necesarios para evaluar el peligro de sensibilización cutánea. Muy distinta es la situación en lo que se refiere a la sensibilización del tracto respiratorio: no hay por el momento métodos bien validados o ampliamente aceptados para identificar los alergenos respiratorios químicos, aunque en la cobaya y el ratón se ha avanzado en el desarrollo de modelos animales para la investigación de la alergia respiratoria de origen químico.

Los datos sobre seres humanos indican que los agentes químicos, en particular los fármacos, pueden causar enfermedades autoinmunitarias (Kammüller, Bloksma y Seinen 1989). Hay algunos modelos de enfermedades autoinmunitarias humanas que se basan en la experimentación con animales. Esos modelos comprenden tanto la patología espontánea (por ejemplo el lupus eritematoso sistémico en el ratón negro de Nueva Zelanda) como fenómenos de autoinmunidad inducidos por inmunización experimental con un autoantígeno de reacción cruzada (por ejemplo, la artritis inducida por el coadyuvante H37Ra en las ratas de la estirpe Lewis), y se aplican en la

● INMUNOTOXICOLOGIA

Joseph G. Vos y Henk van Loveren

Las funciones del sistema inmunitario son proteger al cuerpo de agentes infecciosos invasores y realizar una labor de vigilancia inmunitaria frente a la aparición de células tumorales. El sistema inmunitario consta de una primera línea de defensa que es no específica, y que puede iniciar directamente reacciones de efectores, y de una parte específica adquirida en la que los linfocitos y anticuerpos poseen la capacidad específica de reconocer el antígeno y reaccionar a él.

Se ha definido la immunotoxicología como "la disciplina que estudia los hechos que pueden desembocar en efectos no deseados como resultado de la interacción de los xenobióticos con el sistema inmunitario. Esos hechos no deseados pueden deberse a 1) un efecto directo y/o indirecto del xenobiótico (y/o de su producto de biotransformación) sobre el sistema inmunitario, o 2) una respuesta immunológica del huésped al compuesto y/o su o sus metabolitos, o a antígenos del huésped modificados por el compuesto o sus metabolitos" (Berlin y cols. 1987).

evaluación preclínica de fármacos inmunosupresores. Se han estudiado muy poco las posibilidades de que esos modelos sirvan para evaluar si un xenobiótico intensifica la autoinmunidad inducida o congénita. Prácticamente no hay modelos animales adecuados para investigar la capacidad de las sustancias químicas de inducir enfermedades autoinmunitarias. Un modelo que se usa de manera limitada es el ensayo de ganglios linfáticos popliteales en el ratón. Al igual que en los humanos, los factores genéticos desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria en los animales de laboratorio, lo que limita el valor predictivo de esos ensayos.

El sistema inmunitario

La función principal del sistema inmunitario es defender al organismo de las bacterias, los virus, los parásitos, los hongos y las células neoplásicas. Se encargan de esa defensa, de una manera perfectamente sintonizada, diversos tipos de células y sus mediadores solubles. El sistema de defensa del huésped puede dividirse en general en resistencia no específica o innata e inmunidad específica o adquirida, ésta mediada por los linfocitos (Roitt, Brostoff y Male 1989).

Hay componentes del sistema inmunitario por todo el cuerpo (Jones y cols. 1990). El compartimento linfocítico se halla en los órganos linfoides (Figura 33.14). Se consideran órganos linfoides principales o centrales la médula ósea y el timo; los secundarios o periféricos son los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfático presente en las superficies secretoras como las de los tractos gastrointestinal y respiratorio, que es el llamado tejido linfático asociado a mucosa (TLAM). Casi la mitad de los linfocitos del cuerpo se hallan en algún momento en el TLAM. Además, la piel es un importante órgano de inducción de respuestas inmunitarias a los antígenos presentes en ella. Destacan en ese proceso las células de Langerhans, en la epidermis, que desempeñan una función de presentación de antígenos.

En los órganos linfoides y también en lugares extraganglionares hay células fagocíticas del linaje monocitos/macrófagos, lo que se llama el sistema fagocítico mononuclear; entre los fagocitos extraganglionares figuran las células de Kupffer en el hígado, los macrófagos alveolares en el pulmón, los macrófagos mesangiiales en el riñón y las células gliales en el cerebro. Los leucocitos polimorfonucleares están presentes sobre todo en la sangre y la médula ósea, pero se acumulan en los lugares en que se produce una inflamación.

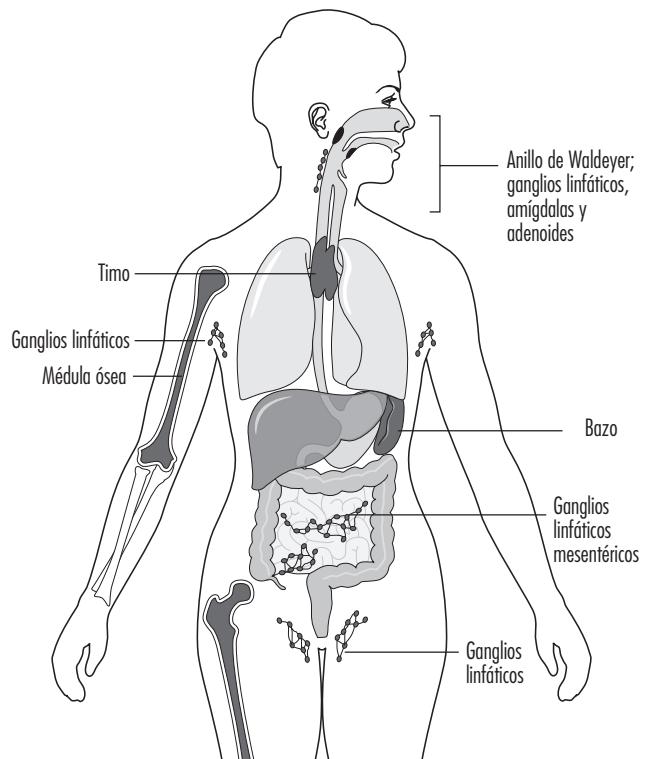
Defensa no específica

Una primera línea de defensa contra los microorganismos es la constituida por una barrera física y química, como ocurre en la piel, el tracto respiratorio y el tracto digestivo. Esta barrera cuenta con la ayuda de mecanismos protectores no específicos entre los que figuran células fagocíticas, como los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, que son capaces de destruir agentes patógenos, y células agresoras o “asesinas” naturales (NK), que pueden destruir por lisis células tumorales y células infectadas por virus. También participan en la respuesta no específica el llamado “sistema de complemento” y algunos inhibidores microbianos (como por ejemplo la lisozima).

Inmunidad específica

Tras el contacto inicial del huésped con el patógeno se inducen respuestas inmunitarias específicas. Lo más característico de esta segunda línea de defensa es el reconocimiento específico de los determinantes —los llamados antígenos o epítopos— de los patógenos por parte de receptores situados en la superficie celular de los linfocitos B y T. Una vez producida la interacción con el antígeno específico, se estimula a la célula que porta el receptor a

Figura 33.14 • Órganos y tejidos primarios y secundarios del sistema linfático.



proliferar y diferenciarse, con lo que produce un clon de células hijas que son específicas para ese antígeno. Las respuestas inmunitarias específicas ayudan a la defensa no específica presentada a los patógenos estimulando la eficacia de las respuestas no específicas. Una característica fundamental de la inmunidad específica es que se desarrolla una memoria. El contacto secundario con ese mismo antígeno provoca una respuesta más rápida y más vigorosa, aunque no por ello menos regulada.

El genoma no tiene capacidad para contener los códigos de un número de receptores de antígenos suficiente para reconocer todos los antígenos distintos que pueden aparecer. El repertorio de especificidad se desarrolla mediante un proceso de reordenación de genes. Es un proceso aleatorio, durante el cual se producen diversas especificidades. Entre ellas figuran especificidades para autocomponentes, que no son deseables. Entra entonces en funcionamiento, para suprimir esas especificidades no deseables, un proceso de selección que se desarrolla en el timo (células T) o en la médula ósea (células B).

El funcionamiento normal de los efectores inmunitarios y la regulación homeostática de la respuesta inmunitaria dependen de una serie de productos solubles, agrupados bajo el nombre colectivo de citoquinas, que son sintetizados y segregados por los linfocitos y por otros tipos de células. Las citoquinas tienen efectos pleiotrópicos sobre las respuestas inmunitarias e inflamatorias. La respuesta inmunitaria precisa de la cooperación entre diferentes poblaciones de células —la regulación de las respuestas de los anticuerpos, la acumulación de células y moléculas inmunitarias en los lugares de inflamación, la puesta en marcha de respuestas agudas, el control de la función citotóxica de los macrófagos y muchos otros procesos que son esenciales para la resistencia del huésped. Esos procesos están influidos por

las citoquinas, que actúan individualmente o de manera concertada, y en muchos casos dependen de ellas.

Se han determinado dos tipos de inmunidad específica: la inmunidad humoral y la inmunidad celular o mediada por células.

Inmunidad humoral. En el tipo humoral de inmunidad se estimulan los linfocitos B tras ser reconocido el antígeno por los receptores situados en la superficie de la célula. Los receptores de antígenos son en este caso las inmunoglobulinas (Ig). Las células B maduras (células plasmáticas) inicián la producción de inmunoglobulinas antigenoespecíficas que actúan como anticuerpos en el suero o en las superficies de mucosa. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: 1) la IgM, Ig pentamérica que posee una capacidad de aglutinación óptima y que es la primera que se produce tras la estimulación antigenica; 2) la IgG, que es la más importante Ig en circulación y que puede atravesar la placenta; 3) la IgA, que es una Ig secretora que protege las superficies de mucosa; 4) la IgE, que se fija a los mastocitos o a los granulocitos basófilos que intervienen en las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y 5) la IgD, cuya función principal es actuar como receptor en los linfocitos B.

Inmunidad mediada por células. El tipo celular del sistema inmunitario específico está mediado por los linfocitos T. Estas células tienen también receptores de antígenos en sus membranas. Reconocen el antígeno cuando se lo presentan las células presentadoras de antígenos en el contexto de antígenos de histocompatibilidad. Esta es otra limitación de estas células además de su especificidad antigenica. Las células T funcionan como células colaboradoras de diversas respuestas inmunitarias (incluidas las humorales), actúan de mediadoras en el reclutamiento de células inflamatorias y, como células T citotóxicas, pueden matar células diana tras el reconocimiento antigenoespecífico.

Mecanismos de inmunotoxicidad

Inmunosupresión

La eficacia de la resistencia del huésped depende de que el sistema inmunitario funcione en su integridad, lo que a su vez exige que se disponga, en número suficiente y en forma operativa, de las células y moléculas componentes que orquestan las respuestas inmunitarias. En los seres humanos, las inmunodeficiencias congénitas suelen caracterizarse por defectos en determinadas líneas celulares precursoras, lo que tiene como resultado una producción menor o nula de células inmunitarias. Por analogía con las enfermedades de inmunodeficiencia humana tanto congénitas como adquiridas, la inmunosupresión inducida por sustancias químicas puede deberse simplemente a que hay pocas células funcionales (IPCS 1996). La ausencia o el menor número de linfocitos pueden tener efectos más o menos profundos sobre la condición inmunitaria. Algunos estados de inmunodeficiencia y la inmunosupresión intensa, como por ejemplo en la terapia para trasplantes o citostática, se han asociado en particular con una mayor incidencia de infecciones oportunistas y de algunas enfermedades neoplásicas. Las infecciones pueden ser por bacterias, virus, hongos o protozoos, y el tipo predominante de infección depende de cuál sea la inmunodeficiencia asociada. Parece lógico que la exposición a sustancias inmunosupresoras presentes en el medio ambiente produzca formas más sutiles de inmunosupresión, que pueden ser difíciles de detectar. Por ejemplo, pueden llevar a una mayor incidencia de infecciones como la gripe o el resfriado común.

Habida cuenta de la complejidad del sistema inmunitario, con su amplia variedad de células, mediadores y funciones que forman una red compleja e interactiva, los compuestos

inmunotóxicos encuentran muchas oportunidades para producir sus efectos. Aunque no se conoce bien la naturaleza de las lesiones iniciales inducidas por muchas sustancias químicas inmunotóxicas, cada vez se dispone de más información, derivada sobre todo de estudios con animales de laboratorio, sobre los cambios inmunobiológicos que tienen como resultado una depresión de la función inmunitaria (Dean y cols. 1994). Podrían producirse efectos tóxicos en las funciones críticas siguientes (se indican asimismo algunos ejemplos de compuestos inmunotóxicos que afectan a esas funciones):

- El desarrollo y expansión de diferentes poblaciones de células precursoras (el benceno tiene efectos inmunotóxicos a este nivel de células que provocan linfocitopenia).
- La proliferación de diversas células linfoides y mieloides así como de tejidos de sostén en los que esas células maduran y funcionan (los compuestos inmunotóxicos de organotina suprimen la actividad proliferativa de los linfocitos en el córtex del timo mediante citotoxicidad directa; la acción timotóxica de la 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD) y otros compuestos conexos no se debe probablemente tanto a la toxicidad directa en los timocitos como a un deterioro de la función de las células epiteliales del timo).
- La captación, procesamiento y presentación de antígenos por los macrófagos y otras células que presentan antígenos (una de las dianas del 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) y del plomo es la presentación de antígenos por los macrófagos; una diana de la radiación ultravioleta son las células de Langerhans, que también presentan antígenos).
- La función reguladora de las células T-colaboradoras y T-supresoras (la función de las T-colaboradoras se ve afectada por las organotinas, el aldicarb, los bifenilos policlorados (PCB), la TCDD y el DMBA; la función de las T-supresoras se ve reducida por los tratamientos con ciclofosfamidas a dosis bajas).
- La producción de diversas citoquinas o interleucinas (el benzo(a)pireno (BP) suprime la producción de interleucina-1; la radiación ultravioleta altera la producción de citoquinas por los queratinocitos).
- La síntesis de diversas clases de inmunoglobulinas IgM e IgG, que se ve suprimida tras tratamiento con PCB y óxido de tribultitina (TBT) e incrementada tras exposición a hexaclorobenceno (HCB).
- La regulación y activación del complemento (por TCDD).
- La función citotóxica de las células T (el 3-metilcolantreno (3-MC), el DMBA y la TCDD suprimen la actividad citotóxica de las células T).
- La función de las células agresoras o “asesinas” naturales (NK) (el ozono suprime la actividad de las NK pulmonares; el níquel reduce la actividad de las NK del bazo).
- Las funciones quimiotácticas y citotóxicas de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (el ozono y el dióxido de nitrógeno reducen la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares).

Alergia

La *alergia* puede definirse como los efectos adversos para la salud debidos a que se inducen y provocan respuestas inmunitarias específicas. Cuando se producen reacciones de hipersensibilidad sin intervención del sistema inmunitario se habla de *pseudoalergia*. En el contexto de la inmunotoxicología, la alergia es el resultado de una respuesta inmunitaria específica a determinadas sustancias químicas y fármacos. La capacidad de sensibilizar a un individuo que posee una sustancia está generalmente relacionada con su capacidad de unirse covalentemente a proteínas del organismo. Las reacciones alérgicas pueden adoptar diversas formas, que presentan diferencias con respecto tanto a los mecanismos

inmunológicos que están en su base como a la velocidad de la reacción. Se han determinado cuatro tipos principales de reacciones alérgicas: las reacciones de hipersensibilidad del tipo I, que se deben a anticuerpos IgE y en las que los síntomas se manifiestan a los pocos minutos de que comience la exposición del individuo sensibilizado. Las reacciones de hipersensibilidad del tipo II se deben al daño o destrucción de células del huésped por la acción de anticuerpos. En este caso los síntomas aparecen en el plazo de unas horas. Las reacciones de hipersensibilidad del tipo III, o de Arthus, están también mediadas por anticuerpos, pero contra antígenos solubles, y se derivan de la acción local o sistémica de complejos inmunitarios. Las reacciones de hipersensibilidad del tipo IV, o retardada, se deben a los linfocitos T, y los síntomas suelen aparecer en un plazo de 24-48 horas después de la exposición del individuo sensibilizado.

Los dos tipos de alergia química que más interesan desde el punto de vista de la salud en el trabajo son la sensibilidad por contacto o alergia cutánea y la alergia del trato respiratorio.

Hipersensibilidad por contacto. Son muchas las sustancias químicas que pueden causar sensibilización cutánea. Tras la exposición tópica de un individuo susceptible a un alergeno químico, se induce una respuesta de los linfocitos T en los ganglios linfáticos de drenaje. En la piel, el alergeno interactúa directa o indirectamente con las células de Langerhans de la epidermis, que transportan la sustancia a los ganglios linfáticos y la presentan en forma inmunogénica a los linfocitos T sensibles. Proliferan entonces los linfocitos T activados por el alergeno, con el resultado de una expansión clonal. El individuo está ya sensibilizado y responderá a una segunda exposición cutánea a esa misma sustancia química con una respuesta inmunitaria más agresiva, que producirá una dermatitis alérgica por contacto. La reacción inflamatoria de la piel que caracteriza a la dermatitis alérgica por contacto es secundaria al reconocimiento del alergeno en la piel por linfocitos T específicos. Esos linfocitos se activan, liberan citoquinas y producen una acumulación local de otros leucocitos mononucleares. Los síntomas aparecen entre 24 y 48 horas después de la exposición del individuo sensibilizado, y por ello la dermatitis alérgica por contacto es una forma de hipersensibilidad retardada. Entre los agentes que suelen provocar la dermatitis alérgica por contacto figuran sustancias químicas orgánicas (como el 2,4-dinitroclorobenceno), metales (como el níquel y el cromo) y productos vegetales (como el urusiol de plantas del género *Rhus*).

Hipersensibilidad respiratoria. La hipersensibilidad respiratoria suele considerarse una reacción del Tipo I. No obstante, en las reacciones de fase tardía y en los síntomas más crónicos asociados con el asma pueden intervenir procesos inmunitarios mediados por células (Tipo IV). Los síntomas agudos asociados a la alergia respiratoria se deben al anticuerpo IgE, que se produce tras la exposición del individuo susceptible al alergeno químico inductor. El anticuerpo IgE se distribuye sistémicamente y se une, a través de los receptores de las membranas, a mastocitos de los tejidos vascularizados, entre ellos los del tracto respiratorio. Tras la inhalación de esa misma sustancia química se producirá una reacción de hipersensibilidad respiratoria. El alergeno se asocia con proteínas y se une al anticuerpo IgE-mastocitos entrecruzándose con él. Ello produce a su vez la desgranulación de los mastocitos, liberándose mediadores inflamatorios contenidos en sus gránulos, como histamina y leucotrienos. Esos mediadores producen broncoconstricción y vasodilatación, con el resultado de los síntomas de la alergia respiratoria: asma y/o rinitis. Entre las sustancias químicas que se sabe que producen hipersensibilidad respiratoria en los seres humanos figuran los anhídridos ácidos (como el anhídrido trimelítico), algunos diisocianatos (como el diisocianato detolueno), sales de platino y algunos colorantes reactivos. Está

demostrado que también la exposición crónica al berilio produce hipersensibilidad pulmonar.

Autoinmunidad

La *autoinmunidad* puede definirse como la estimulación de respuestas inmunitarias específicas que se dirigen contra "autoantígenos" endógenos. La autoinmunidad inducida puede tener su origen bien en alteraciones del equilibrio de los linfocitos T reguladores, bien en la asociación de un xenobiótico con componentes tisulares normales de manera que los hace inmunógenos ("autoalterados"). Los fármacos y sustancias químicas que sabemos que en ocasiones inducen o exacerbان efectos como los de la enfermedad autoinmunitaria en individuos susceptibles son compuestos de bajo peso molecular (de peso molecular 100 a 500), que por lo general no están considerados inmunógenos en sí mismos. Es muy poco lo que se sabe del mecanismo de la enfermedad autoinmunitaria debida a exposición química. La enfermedad puede producirse directamente por medio de anticuerpos circulantes, indirectamente mediante la formación de complejos inmunitarios o como consecuencia de una inmunidad mediada por células, aunque lo más probable es que se produzca por una combinación de varios mecanismos. Se conoce mejor la patogénesis en el caso de los trastornos hemolíticos inmunitarios inducidos por fármacos:

- El fármaco puede unirse a la membrana del glóbulo rojo e interactuar con un anticuerpo farmacoespecífico.
- El fármaco puede alterar la membrana del glóbulo rojo de modo que el sistema inmunitario considera la célula como extraña.
- El fármaco y su anticuerpo específico forman complejos inmunitarios que se adhieren a la membrana del glóbulo rojo para producir la lesión.
- El glóbulo rojo se sensibiliza debido a la producción de autoanticuerpos de los propios glóbulos rojos.

Se ha comprobado que diversas sustancias químicas y fármacos, en particular estos últimos, inducen respuestas similares a las de la enfermedad autoinmunitaria (Kamüller, Bloksma y Seinen 1989). La exposición profesional a sustancias químicas puede producir en ocasiones síndromes similares a los de esta enfermedad. La exposición a cloruro de vinilo monomérico, tricloroetileno, percloroetileno, resinas epoxidas y polvo de silice puede inducir síndromes similares a los de la esclerodermia. Se ha descrito un síndrome parecido al lupus eritematoso sistémico tras exposición a hidrazina. La exposición a diisocianato de tolueno se ha asociado a la inducción de púrpura trombocitopénica. Y se ha relacionado a metales pesados como el mercurio con algunos casos de glomerulonefritis inmunitaria compleja.

Evaluación del riesgo para los seres humanos

La evaluación del estado inmunitario de los seres humanos se realiza principalmente utilizando sangre periférica para analizar sustancias humorales como las inmunoglobulinas y el complemento, así como los leucocitos de la sangre para determinar su composición de subconjuntos y la funcionalidad de las subpopulaciones. Suelen ser los mismos métodos que se utilizaban para investigar la inmunidad humoral y mediada por células, así como la resistencia no específica de pacientes en los que se sospechaba una inmunodeficiencia congénita. Para los estudios epidemiológicos (por ejemplo, de poblaciones con exposición profesional), los parámetros deben seleccionarse sobre la base de su valor predictivo en poblaciones humanas, de modelos animales validados y de los mecanismos biológicos en que se basan los

Tabla 33.6 • Clasificación de los ensayos con arreglo a los marcadores inmunitarios.

Categoría del ensayo	Características	Ensayos específicos
Básico — general Debe incluirse con paneles generales	Indicadores del estado de salud general y de los sistemas orgánicos	Nitrógeno ureico en sangre, glucosa en sangre, etc.
Básico — inmunitario Debe incluirse en paneles generales	Indicadores generales del estado inmunitario Coste relativamente bajo Normalización de los métodos de ensayo entre laboratorios Pueden interpretarse clínicamente los resultados que están fuera de los intervalos de referencia	Recuentos sanguíneos completos Niveles de IgG, IgA e IgM en suero Fenotipos con marcadores de superficie para los principales subconjuntos de linfocitos
Centrado/reflejo Deben incluirse cuando se indican por datos clínicos, sospechas de exposición, o resultados de ensayos anteriores	Indicadores de funciones/hechos inmunitarios específicos Coste variable Normalización de los métodos de ensayo entre laboratorios Pueden interpretarse clínicamente los resultados que están fuera de los intervalos de referencia	Genotipo de histocompatibilidad Anticuerpos a agentes infecciosos IgE total en suero IgE alergenoespecífica Autoanticuerpos Pruebas de hipersensibilidad cutánea Estallido oxidativo de granulocitos Histopatología (biopsia tisular)
Investigación Debe incluirse únicamente con poblaciones controladas y con un cuidadoso diseño del estudio	Indicadores de funciones/hechos inmunitarios generales o específicos Coste variable, aunque suele ser alto En general, no normalización de los métodos de ensayo entre laboratorios En general, no pueden interpretarse clínicamente los resultados que están fuera de los intervalos de referencia	Ensayos de estimulación <i>in vitro</i> Marcadores de superficie de la activación celular Concentraciones de citoquinas en suero Ensayos de clonalidad (de anticuerpos, celular, genética) Ensayos de citotoxicidad

marcadores (véase la Tabla 33.6). La estrategia con que se debe plantear la detección de efectos inmunotóxicos tras una exposición (accidental) a contaminantes ambientales u otros tóxicos depende en gran medida de las circunstancias, como por ejemplo del tipo de inmunodeficiencia que cabe esperar, del tiempo transcurrido entre la exposición y la evaluación del estado inmunitario, del grado de exposición y del número de individuos expuestos. El proceso de evaluar el riesgo inmunotóxico de un determinado xenobiótico en los humanos es sumamente difícil y muchas veces imposible, debido en gran parte a la presencia de diversos factores de confusión, de origen endógeno o exógeno, que influyen en la respuesta de los individuos al daño tóxico. Así sucede principalmente en los estudios que investigan el papel de la exposición química en las enfermedades autoinmunitarias, donde los factores genéticos desempeñan un papel decisivo.

Como raras veces se dispone de datos suficientes sobre los seres humanos, la evaluación del riesgo de inmunosupresión inducida por sustancias químicas se basa en la mayoría de los casos en estudios sobre animales. La identificación de los xenobióticos inmunotóxicos potenciales se realiza principalmente en estudios controlados con roedores. Los estudios de exposición *in vivo* constituyen a este respecto el planteamiento óptimo para estimar el potencial inmunotóxico de un compuesto, pues el sistema inmunitario y sus respuestas tienen un carácter multifactorial y complejo. Los estudios *in vivo* son cada vez más valiosos para determinar los mecanismos de la inmunotoxicidad. Además, al investigar los efectos del compuesto utilizando células de origen animal y humano pueden generarse datos para establecer comparaciones entre especies, que pueden utilizarse en el llamado “enfoque de paralelogramo” para mejorar el proceso de evaluación del riesgo: si se dispone de datos correspondientes a las tres esquinas del paralelogramo (animal *in vivo* y animal y humano *in vitro*) puede ser más fácil predecir el resultado en la esquina restante, es decir, el riesgo en los seres humanos.

Cuando la evaluación del riesgo de inmunosupresión inducida por sustancias químicas ha de basarse únicamente en datos de

estudios con animales, puede plantearse la extrapolación al hombre aplicando factores de incertidumbre al nivel sin efecto adverso observable (NOAEL). Este nivel puede basarse en parámetros determinados en modelos pertinentes, como ensayos de resistencia del huésped y evaluación *in vivo* de reacciones de hipersensibilidad y producción de anticuerpos. Idealmente, la utilidad de este enfoque de la evaluación del riesgo exige una confirmación en estudios sobre humanos. Esos estudios deben combinar la identificación y medición del tóxico, datos epidemiológicos y evaluaciones del estado inmunitario.

Para predecir la hipersensibilidad por contacto se dispone de modelos con cobayas que vienen utilizándose en la evaluación del riesgo desde el decenio de 1970. Aunque sensibles y reproducibles, esos ensayos tienen limitaciones en la medida en que dependen de una evaluación subjetiva; este inconveniente puede superarse mediante métodos más recientes y más cuantitativos desarrollados en el ratón. En cuanto a la hipersensibilidad química inducida por inhalación o ingestión de alergenos, deben elaborarse y evaluarse ensayos desde el punto de vista de su valor predictivo para el hombre. En cuanto al establecimiento de niveles seguros de exposición profesional a alergenos potenciales, se ha de tener en cuenta la naturaleza bifásica de la alergia: la fase de sensibilización y la fase de reacción. La concentración necesaria para provocar una reacción alérgica en un individuo previamente sensibilizado es bastante más baja que la concentración necesaria para inducir la sensibilización en un individuo inmunológicamente intacto pero susceptible.

Como prácticamente no hay modelos animales para predecir la autoinmunidad inducida por sustancias químicas, se ha de insistir en la elaboración de tales modelos. Para ello es necesario avanzar en nuestro conocimiento de la inmunidad inducida por sustancias químicas en los humanos, incluido el estudio de marcadores genéticos y del sistema inmunitario con los que identificar a los individuos susceptibles. Ofrecen esa oportunidad los individuos que están expuestos a fármacos que inducen la autoinmunidad.

● TOXICOLOGIA DE ORGANOS DIANA

Ellen K. Silbergeld

El estudio y la caracterización de las sustancias químicas y otros agentes para determinar sus propiedades tóxicas suele realizarse sobre la base de determinados órganos y sistemas orgánicos. En este capítulo se estudian en profundidad dos dianas concretas: el sistema inmunitario y el gen. Se han elegido estos ejemplos porque son representativos de una diana que es un sistema orgánico complejo y de otra que es molecular y se halla dentro de la célula.

Para un análisis más completo de la toxicología de órganos diana el lector puede remitirse a textos de referencia en toxicología como los de Casarett y Doull, y Hayes. El Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS) ha publicado asimismo varios documentos sobre criterios de la toxicología de órganos diana, presentados por sistemas orgánicos.

Los estudios de toxicología de órganos diana suelen basarse en información que indica el potencial de efectos tóxicos específicos que tiene una sustancia, bien a partir de datos epidemiológicos, bien a partir de estudios sobre toxicidad general aguda o crónica, o basados también en el interés especial en proteger determinadas funciones orgánicas, como la reproducción o el desarrollo del feto.

En algunos casos, las autoridades reguladoras imponen expresamente la realización de ensayos específicos de toxicidad en órganos diana, como los ensayos de neurotoxicidad a que obliga la legislación estadounidense sobre plaguicidas (véase "El enfoque estadounidense de la evaluación del riesgo de los tóxicos para la reproducción y agentes neurotóxicos") y los de mutagenicidad a que obliga en el Japón la Ley de control de las sustancias químicas (véase "Principios de la identificación de los peligros: el enfoque japonés").

Como se ha indicado en "Órgano diana y efectos críticos", la identificación de un órgano crítico se basa en la detección del órgano o sistema orgánico que primero presenta una respuesta adversa o que la presenta a las dosis o exposiciones más bajas. Esa información se utiliza después para diseñar investigaciones toxicológicas específicas o ensayos de toxicidad más definidos encaminados a obtener indicaciones más sensibles de la intoxicación en el órgano diana.

Los estudios de toxicología de órganos diana pueden utilizarse también para determinar los mecanismos de acción, que son de utilidad para evaluar el riesgo (véase "El enfoque estadounidense de la evaluación del riesgo de los tóxicos para la reproducción y agentes neurotóxicos").

Métodos de los estudios de toxicidad en órganos diana

Los órganos diana pueden estudiarse exponiendo organismos intactos y analizando detalladamente la función e histopatología en el órgano diana, o mediante la exposición *in vitro* de células, rodajas de tejido u órganos enteros mantenidos en cultivo durante períodos más o menos largos (véase "Introducción y conceptos" en "Mecanismos de la toxicidad"). En algunos estudios se dispone asimismo de tejidos de sujetos humanos, que pueden permitir validar hipótesis de extrapolación entre especies. No obstante, hay que tener en cuenta que esos estudios no ofrecen información sobre la toxicocinética relativa.

En general, los estudios de toxicidad en órganos diana tienen en común las características siguientes: examen histopatológico detallado del órgano diana, incluido el examen *post mortem*, pesaje de los tejidos y examen de los tejidos fijados; estudios bioquímicos de rutas críticas en el órgano diana, como por ejemplo importantes sistemas enzimáticos; estudios funcionales de la capacidad del órgano y de los componentes celulares para realizar las funciones metabólicas y de otro tipo que se espera de ellos, y análisis de los biomarcadores de la exposición y de efectos tempranos en las células del órgano diana.

En los estudios sobre órganos diana se integran a veces conocimientos pormenorizados de la fisiología del órgano, de su bioquímica y de su biología molecular. Por ejemplo, como la síntesis y secreción de proteínas de bajo peso molecular es un aspecto importante de la función renal, en los estudios de nefrotoxicidad se suele prestar especial atención a esos parámetros (IPCS 1991). Como la comunicación célula-célula es un proceso fundamental del funcionamiento del sistema nervioso, los estudios de neurotoxicidad sobre órganos diana pueden incluir mediciones neuroquímicas y biofísicas detalladas de la síntesis, captación, almacenamiento, liberación y unión a receptores de los neurotransmisores, así como la medición electrofisiológica de los cambios que se producen en el potencial de la membrana relacionados con esos procesos. En la toxicología de órganos diana se está haciendo mucho hincapié en el desarrollo de métodos *in vitro* como medio de sustituir el empleo de animales completos o reducirlo. Se han conseguido notables progresos en este ámbito en el caso de los tóxicos en la reproducción (Heindel y Chapin 1993).

En resumen, los estudios de toxicidad en órganos diana suelen realizarse como ensayos de orden superior para determinar la toxicidad. La selección de determinados órganos diana para ulteriores evaluaciones depende de los resultados de los ensayos a nivel de detección, como los ensayos de toxicidad aguda o subcrónica que utilizan la OCDE y la Unión Europea; algunos órganos y sistemas orgánicos diana pueden ser *a priori* candidatos para una investigación especial por el interés en prevenir determinados tipos de efectos nocivos sobre la salud.

METODOS DE ENSAYO EN TOXICOLOGIA

● BIOMARCADORES

Philippe Grandjean

El término *biomarcador*, o *marcador biológico* en forma desarrollada, se define como un hecho que se produce en un sistema biológico, el cuerpo humano por ejemplo, y que puede medirse. Ese hecho se interpreta después como reflejo, o marcador, de un estado más general del organismo o de su esperanza de vida. En el ámbito de la salud en el trabajo, los biomarcadores suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o del riesgo de enfermedad.

Se utilizan biomarcadores en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que pueden incluir a seres humanos. Los marcadores biológicos se clasifican por lo general en tres tipos concretos. Aunque algunos de ellos pueden ser difíciles de clasificar, suelen separarse en biomarcadores de la exposición, biomarcadores del efecto y biomarcadores de la susceptibilidad (véase la Tabla 33.7).

Dado un grado aceptable de validez, los biomarcadores pueden emplearse con varios fines. A nivel individual, un biomarcador puede utilizarse para apoyar o rechazar el diagnóstico de un determinado tipo de intoxicación o de otro efecto

Tabla 33.7 • Ejemplos de biomarcadores de la exposición o del efecto que se emplean en los estudios toxicológicos relacionados con la salud en el trabajo.

Muestra	Medición	Objeto
Biomarcadores de la exposición		
Tejido adiposo	Dioxina	Exposición a dioxina
Sangre	Plomo	Exposición a plomo
Hueso	Aluminio	Exposición a aluminio
Aire espirado	Tolueno	Exposición a tolueno
Pelo	Mercurio	Exposición a metilmercurio
Suero	Benceno	Exposición a benceno
Orina	Fenol	Exposición a benceno
Biomarcadores del efecto		
Sangre	Carboxihemoglobina	Exposición a monóxido de carbono
Glóbulos rojos	Zinc-protoporfirina	Exposición a plomo
Suero	Colinesterasa	Exposición a organofosforados
Orina	Microglobulinas	Exposición a nefrotóxicos
Glóbulos blancos	Aductos de ADN	Exposición a mutágenos

adverso inducido por sustancias químicas. En un sujeto sano, un biomarcador puede reflejar también una hipersusceptibilidad individual a determinadas exposiciones químicas y por consiguiente puede tomarse como base para la predicción del riesgo y el asesoramiento. En grupos de trabajadores expuestos pueden aplicarse algunos biomarcadores de la exposición para valorar el grado de cumplimiento con las normas de reducción de la contaminación o la eficacia de las medidas preventivas en general.

Biomarcadores de la exposición

Un biomarcador de la exposición puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) que se introduce en el cuerpo, un producto interactivo entre el compuesto (o metabolito) y un componente endógeno, o cualquier otro hecho relacionado con la exposición. Lo más habitual es que los biomarcadores de exposiciones a compuestos estables, como los metales, comprendan mediciones de las concentraciones del metal en muestras apropiadas, como la sangre, el suero o la orina. En el caso de las sustancias volátiles puede evaluarse su concentración en el aire espirado (tras la inhalación de aire libre de contaminación). Si el compuesto se metaboliza en el cuerpo, pueden elegirse uno o varios metabolitos como biomarcadores de la exposición; los metabolitos suelen determinarse en muestras de orina.

Los métodos de análisis modernos permiten en ocasiones separar los isómeros de los compuestos orgánicos, y determinar la especiación de los compuestos metálicos o coeficientes isotópicos de determinados elementos. Análisis más complejos permiten determinar los cambios que se producen en la estructura del ADN u otras macromoléculas por la unión con sustancias químicas reactivas. Esas técnicas avanzadas adquirirán sin duda mucha más importancia en las aplicaciones de los estudios con biomarcadores, y es probable que al rebajarse los límites de detección y mejorarse la validez analítica los biomarcadores sean aún más útiles.

Se han producido avances especialmente prometedores en los biomarcadores de la exposición a sustancias químicas

mutágenas. Se trata de compuestos reactivos que pueden formar aductos con macromoléculas, como proteínas o el ADN. Los aductos de ADN pueden detectarse en los leucocitos o en biopsias tisulares, y determinados fragmentos de ADN pueden excretarse en la orina. Por ejemplo, la exposición a óxido de etileno produce reacciones con bases del ADN, y tras la excisión de la base dañada, la N-7-(2-hidroxietil)guanina se elimina en la orina. Hay aductos que no se refieren directamente a una determinada exposición. Por ejemplo la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina indica que el ADN ha sufrido un daño oxidativo, pero esta reacción puede haber sido desencadenada por varios compuestos químicos, la mayoría de los cuales inducen también peroxidación lipídica.

Hay otras macromoléculas que también pueden modificarse por formación de aductos u oxidación. De especial interés, esos compuestos reactivos pueden generar aductos de hemoglobina que pueden utilizarse como biomarcadores de la exposición a los compuestos. La ventaja es que de una muestra de sangre pueden obtenerse grandes cantidades de hemoglobina y, dado que los glóbulos rojos tienen una vida de cuatro meses, los aductos formados con los aminoácidos de la proteína indican la exposición total durante ese período.

Los aductos pueden determinarse mediante técnicas sensibles como la cromatografía de lípidos de alta resolución, y también mediante algunos métodos inmunológicos. En general, los métodos analíticos son recientes y costosos, y precisan de más desarrollo y validación. Puede conseguirse una mayor sensibilidad utilizando el ensayo de postetiquetado ^{32}P , que es una indicación no específica de que el ADN ha sufrido un daño. Todas esas técnicas son potencialmente útiles para la vigilancia biológica y se vienen aplicando en un número creciente de estudios. No obstante, se precisan métodos analíticos más sencillos y sensibles. Habida cuenta de la limitada especificidad de algunos métodos a exposiciones bajas, el hábito de fumar u otros factores pueden afectar de manera significativa a los resultados de la medición, con la consiguiente dificultad de interpretación.

La exposición a compuestos mutágenos, o a compuestos que se metabolizan a mutágenos, puede determinarse también evaluando la mutagenicidad de la orina de un individuo expuesto. La muestra de orina se incuba con una cepa de bacterias en la que una mutación puntual específica se expresa de una manera que puede medirse fácilmente. Si en la muestra de orina están presentes sustancias mutágenas, en la bacteria aumentará la tasa de mutaciones.

Los biomarcadores de la exposición han de evaluarse con respecto a la variación temporal de la exposición y a la relación de ésta con diferentes compartimentos. Así, para interpretar el resultado es necesario determinar, a partir de datos toxicocinéticos, el marco o los marcos temporales representados por el biomarcador, es decir, el grado en que la medida del biomarcador refleja una exposición o exposiciones pasadas y/o la carga corporal acumulada. Hay que tener en cuenta en particular el grado en que el biomarcador indica la retención de la sustancia en determinados órganos diana. Aunque en los estudios con biomarcadores suelen utilizarse muestras de sangre, la sangre periférica no se considera en general un compartimento propiamente dicho, aunque actúa como medio de transporte entre compartimentos. El grado en que la concentración en sangre refleja los niveles existentes en diferentes órganos varía considerablemente según la sustancia química de que se trate, y por lo general depende también de la duración de la exposición y del tiempo transcurrido desde ésta.

En ocasiones se utilizan datos de este tipo para clasificar a un biomarcador como indicador de la dosis absorbida (total) o de la dosis efectiva (es decir, de la cantidad que ha llegado al tejido diana). Por ejemplo, la exposición a un determinado disolvente

puede evaluarse a partir de datos sobre la concentración real del disolvente en la sangre en un determinado momento después de la exposición. Esta medida reflejará la cantidad de disolvente que se ha absorbido en el cuerpo. Parte de la cantidad absorbida se exhalará debido a la presión de vapor del disolvente. Mientras está en circulación con la sangre, el disolvente interactuará con diversos componentes del cuerpo, y en última instancia será objeto de una descomposición enzimática. El resultado de los procesos metabólicos puede valorarse determinando los ácidos mercaptúricos específicos que se han producido por conjugación con el glutatión. La excreción acumulada de ácidos mercaptúricos puede reflejar mejor así la dosis efectiva que la concentración en sangre.

Acontecimientos de la vida como la reproducción y la senectud pueden afectar a la distribución de una sustancia química. La distribución de las sustancias en el cuerpo se ve notablemente afectada por el embarazo, y muchas de ellas pueden atravesar la barrera placentaria, con la consiguiente exposición del feto. La lactancia puede producir una excreción de sustancias químicas liposolubles, lo que se traduce en una menor retención en la madre y una mayor absorción en el niño. En las situaciones de pérdida de peso o en la osteoporosis pueden liberarse sustancias almacenadas, que producen después una nueva y prolongada exposición "endógena" de órganos diana. Hay otros factores que pueden afectar a la absorción, metabolismo, retención y distribución de compuestos químicos en un individuo, y existen algunos biomarcadores de la biosusceptibilidad (véase más adelante).

Biomarcadores del efecto

Los marcadores del efecto pueden ser componentes endógenos o medidas de la capacidad funcional, o cualquier otro indicador del estado o equilibrio del cuerpo o de un sistema orgánico afectado por la exposición. Suelen utilizarse como indicadores preclínicos de anomalías.

Los biomarcadores del efecto pueden ser específicos o no específicos. Los específicos son útiles porque indican un efecto biológico de una exposición concreta, por lo que aportan datos que pueden ser valiosos de cara a la prevención. Los biomarcadores no específicos no indican una causa individual del efecto, pero pueden reflejar el efecto total integrado debido a una exposición combinada. Por consiguiente, los dos tipos de biomarcadores pueden ser de considerable utilidad en el ámbito de la salud en el trabajo.

No hay una distinción clara entre biomarcadores de la exposición y del efecto. Por ejemplo, podría decirse que la formación de aductos refleja más un efecto que la exposición. No obstante, los biomarcadores del efecto suelen indicar cambios en las funciones de las células, de los tejidos o del cuerpo en su conjunto. Algunos investigadores incluyen entre los biomarcadores del efecto los cambios muy visibles, como un aumento del peso del hígado en animales de laboratorio expuestos o un defecto de crecimiento en los niños. En el contexto de la salud en el trabajo, los biomarcadores del efecto deben limitarse a los que indican cambios bioquímicos subclínicos o reversibles, como la inhibición de enzimas. El que se utiliza con más frecuencia es probablemente la inhibición de la colinesterasa motivada por determinados insecticidas (organofosforados y carbamatos). En la mayoría de los casos este efecto es totalmente reversible, y la inhibición de esta enzima refleja la exposición total a ese grupo concreto de insecticidas.

Algunas exposiciones no producen una inhibición de la enzima, sino por el contrario un aumento de su actividad. Así ocurre con varias enzimas pertenecientes a la familia P450 (véase "Determinantes genéticos de la respuesta tóxica"), que

pueden inducirse por la exposición a determinados disolventes e hidrocarburos poliaromáticos. Como esas enzimas se expresan principalmente en tejidos de los que puede ser difícil obtener material para biopsia, la actividad enzimática se determina indirectamente *in vivo* administrando un compuesto que es metabolizado por esa enzima concreta, y después se mide en la orina o el plasma el producto de descomposición.

Otras exposiciones pueden inducir la síntesis de una proteína protectora en el organismo. El mejor ejemplo es probablemente la metalotioneína, que se une al cadmio y fomenta la excreción de este metal; la exposición al cadmio es uno de los factores que contribuyen a una mayor expresión del gen de la metalotioneína. Puede que haya otras proteínas protectoras similares, pero hasta ahora no se han estudiado lo suficiente para aceptarlas como biomarcadores. Entre las candidatas a su posible utilización como biomarcadores están las llamadas "proteínas de estrés", antes llamadas proteínas de shock térmico, que son generadas por diversos organismos en respuesta a determinadas exposiciones adversas.

El daño oxidativo puede valorarse determinando la concentración de malondialdehído en el suero o la exhalación de etano. Análogamente, la excreción en la orina de proteínas de bajo peso molecular, como la albúmina, puede utilizarse como biomarcador precoz de daño renal. También pueden ser útiles como biomarcadores diversos parámetros que se emplean habitualmente en la práctica clínica (por ejemplo, los niveles hormonales o enzimáticos en el suero). No obstante, es posible que muchos de esos parámetros no sean lo suficientemente sensibles para detectar precozmente el problema.

Otro grupo de parámetros de este tipo es el que se refiere a los efectos genotóxicos (cambios en la estructura de los cromosomas). Esos efectos pueden detectarse examinando al microscopio glóbulos blancos en división celular. El daño grave a los cromosomas —aberraciones cromosómicas o formación de micronúcleos— puede observarse al microscopio. Se puede observar asimismo mediante la tinción de las células durante la división celular. La exposición a un agente genotóxico puede visualizarse después como un incremento del intercambio del colorante entre las dos cromatidas de cada cromosoma (intercambio entre cromatidas hermanas).

Las aberraciones cromosómicas están relacionadas con un aumento del riesgo de cáncer, pero no está tan clara la significación de esa tasa mayor de intercambio entre cromatidas hermanas.

Una evaluación más compleja de la genotoxicidad es la que se basa en determinadas mutaciones puntuales en células somáticas —glóbulos blancos de la sangre o células epiteliales tomadas de la mucosa de la boca. Una mutación en un locus determinado puede hacer que las células sean capaces de crecer en un cultivo que contiene una sustancia química por lo demás tóxica (como la 6-tioguanina).

Otra posibilidad es valorar un determinado producto génico (por ejemplo, las concentraciones en suero o en tejido de oncoproteínas codificadas por determinados oncogenes). Evidentemente, esas mutaciones reflejan el daño genotóxico total producido y pueden no indicar nada sobre la exposición causante.

Estos métodos aún no están lo suficientemente desarrollados para utilizarlos en la vigilancia de la salud en el trabajo, pero los rápidos avances que se están produciendo en esta línea de investigación sugieren que podrán emplearse dentro de no muchos años.

Biomarcadores de la susceptibilidad

Un marcador de la susceptibilidad, sea heredada o inducida, es un indicador de que el individuo es especialmente sensible al efecto

de un xenobiótico o a los efectos de un grupo de xenobióticos. Se ha hecho hincapié sobre todo en la susceptibilidad genética, aunque hay otros factores que pueden tener al menos la misma importancia. La hipersusceptibilidad puede deberse a un rasgo heredado, a la constitución del individuo o a factores ambientales.

La capacidad de metabolizar determinadas sustancias químicas es variable y está determinada genéticamente (véase "Determinantes genéticos de la respuesta tóxica"). Parece que algunas enzimas de interés a este respecto están controladas por un único gen. Por ejemplo, la oxidación de sustancias químicas extrañas la realiza principalmente una familia de enzimas pertenecientes a la familia P450. Otras enzimas hacen los metabolitos más hidrosolubles por conjugación (por ejemplo, la N-acetiltransferasa y la μ -glutación-S-transferasa). La actividad de esas enzimas está controlada genéticamente y presenta considerables variaciones. Como ya se ha señalado, la actividad puede determinarse administrando una pequeña dosis de un fármaco y determinando después la cantidad de metabolito presente en la orina. Ya se han caracterizado algunos genes, y se dispone de técnicas para determinar el genotipo. Estudios importantes sugieren que el riesgo de desarrollar determinadas formas de cáncer está relacionado con la capacidad de metabolizar compuestos extraños. Todavía hay que dar respuesta a muchas preguntas, lo que por el momento limita el empleo de estos biomarcadores de la susceptibilidad potencial en el ámbito de la salud en el trabajo.

Hay otros rasgos heredados, como las deficiencias de alfa₁-antitripsina o de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, que también reducen los mecanismos de defensa del cuerpo provocando de esa manera una hipersusceptibilidad a determinadas exposiciones.

La mayor parte de la investigación relacionada con la susceptibilidad se ha dedicado a la predisposición genética. Pero hay otros factores que también intervienen y que han quedado en cierto modo relegados. Por ejemplo, los individuos que padecen una enfermedad crónica pueden ser más sensibles a una exposición profesional. Asimismo, cuando un proceso patológico o una exposición anterior a sustancias tóxicas ha provocado un daño orgánico subclínico es probable que se haya reducido la capacidad de soportar una nueva exposición al tóxico. En ese caso pueden utilizarse como biomarcadores de la susceptibilidad indicadores bioquímicos de la función del órgano. El mejor ejemplo de esta hipersusceptibilidad es probablemente el que se refiere a las respuestas alérgicas. Si un individuo se ha sensibilizado a una determinada exposición, en su suero se pueden detectar anticuerpos específicos. Aun cuando el individuo no se haya sensibilizado, otras exposiciones actuales o pasadas pueden incrementar el riesgo de un efecto adverso relacionado con una exposición profesional.

Un problema importante es el de determinar el efecto conjunto de exposiciones combinadas en el lugar de trabajo. Además, la susceptibilidad puede ser mayor en los individuos que tienen determinados hábitos y toman fármacos. El humo del tabaco, por ejemplo, suele contener una cantidad considerable de cadmio. Así, con una exposición profesional al cadmio, una persona que fuma mucho y que ya ha acumulado cantidades sustanciales de este metal en el cuerpo tiene un mayor riesgo de contraer nefropatías relacionadas con el cadmio.

Aplicaciones en el ámbito de la salud en el trabajo

Los biomarcadores son sumamente útiles en la investigación toxicológica, y muchos de ellos pueden tener aplicación en la vigilancia biológica. No obstante, hay que reconocer también sus limitaciones. Hasta el momento muchos biomarcadores se han estudiado únicamente en animales de laboratorio. Es posible que

las pautas toxicocinéticas de otras especies no sean necesariamente un reflejo de la situación en los humanos, y para extraerlo puede ser necesario realizar estudios de confirmación con voluntarios humanos. Hay que tener en cuenta asimismo las variaciones individuales debidas a factores genéticos o constitucionales.

En algunos casos, es posible que los biomarcadores de la exposición no sean viables en absoluto (por ejemplo, en el caso de sustancias de vida corta *in vivo*). Otras sustancias pueden almacenarse en órganos o afectar a órganos a los que no se puede acceder por los procedimientos habituales, como el sistema nervioso. La ruta de exposición puede afectar asimismo a la pauta de distribución y por consiguiente también a la medición del biomarcador y a su interpretación. Por ejemplo, es probable que las mediciones efectuadas con biomarcadores de la exposición no detecten la exposición directa del cerebro a través del nervio olfativo. En cuanto a los biomarcadores del efecto, muchos de ellos no son nada específicos, y el cambio puede deberse a múltiples causas, entre ellas factores relacionados con el tipo de vida del sujeto. Quizás especialmente en el caso de los biomarcadores de la susceptibilidad, la interpretación ha de ser muy prudente por el momento, pues sigue habiendo muchas incertidumbres sobre la significación global que tienen para la salud los genotipos individuales.

En el ámbito de la salud en el trabajo, el biomarcador ideal debe reunir varios requisitos. Ante todo, la muestra se ha de obtener y analizar de manera sencilla y fiable. Para conseguir la óptima calidad analítica es necesario normalizar los procedimientos, pero las necesidades concretas son muy variables. Son a ese respecto cuestiones importantes la preparación del individuo, el procedimiento de obtención de la muestra y la manipulación de ésta, y el procedimiento de medición; este último comprende factores técnicos, como métodos de calibración y garantía de la calidad, y factores humanos, como la formación y capacitación de los operadores.

Para que la documentación tenga validez analítica y un seguimiento adecuado en el futuro, los materiales de referencia han de basarse en matrices aplicables, con concentraciones adecuadas de sustancias tóxicas o de sus metabolitos a los niveles apropiados. Para que los biomarcadores se utilicen en vigilancia biológica o con fines de diagnóstico, los laboratorios responsables han de utilizar procedimientos analíticos bien documentados con características de rendimiento definidas, y deben dar acceso a su documentación para poder verificar los resultados. Al mismo tiempo, no obstante, hay que tener en cuenta las consecuencias económicas de caracterizar y utilizar materiales de referencia que complementen los procedimientos generales de garantía de la calidad. Así, la calidad posible de los resultados, y los fines con que éstos se utilizan, han de equilibrarse con el aumento de costes que comporta el control de la calidad, incluidos materiales de referencia, mano de obra e instrumental.

Otro requisito es que el biomarcador ha de ser específico, al menos en las circunstancias del estudio, respecto de un determinado tipo de exposición, con una relación claramente definida con el grado de exposición. De lo contrario es posible que el resultado de la medición del biomarcador sea demasiado difícil de interpretar. Para interpretar adecuadamente la medida que da un biomarcador de la exposición ha de conocerse la validez del diagnóstico (es decir, la traducción del valor del biomarcador a la magnitud de posibles riesgos para la salud). En esta esfera los metales son un paradigma de la investigación en materia de biomarcadores. Estudios recientes han puesto de manifiesto la complejidad y sutileza de las relaciones dosis-respuesta —la considerable dificultad de identificar niveles sin efecto y por lo tanto de definir las exposiciones tolerables. No obstante, estos estudios han puesto de manifiesto también los tipos de

investigación y las mejoras que se necesitan para llegar a obtener la información que se precisa. En el caso de la mayoría de los compuestos orgánicos no se dispone aún de asociaciones cuantitativas entre las exposiciones y los efectos adversos sobre la salud correspondientes; en muchos casos ni siquiera se sabe con seguridad cuál es el principal órgano diana. Además, la evaluación de los datos de toxicidad y de las concentraciones del biomarcador suele verse complicada por el hecho de que no hay exposición a un compuesto único en ese momento, sino a una combinación de sustancias.

Antes de aplicar el biomarcador en el ámbito de la salud en el trabajo son necesarias algunas consideraciones adicionales. En primer lugar, el biomarcador ha de reflejar únicamente un cambio subclínico y reversible. En segundo lugar, como los resultados del biomarcador pueden interpretarse con respecto a riesgos para la salud, deben adoptarse medidas preventivas que han de ser realistas en el caso de que los datos del biomarcador sugieran la necesidad de reducir la exposición. En tercer lugar, ha de haber un acuerdo general en que el empleo del biomarcador en la práctica es aceptable desde el punto de vista ético.

Las mediciones de higiene industrial pueden compararse con los límites de exposición aplicables. Análogamente, los resultados obtenidos con biomarcadores de la exposición o del efecto pueden compararse con los límites de acción biológica, también llamados índices de exposición biológica. Esos límites han de basarse en el juicio de los clínicos y científicos de las disciplinas correspondientes, y los administradores encargados de "gestionar el riesgo" deben tener en cuenta los factores éticos, sociales, culturales y económicos pertinentes. La base científica

debe incluir, en lo posible, relaciones dosis-respuesta complementadas con información sobre las variaciones de la susceptibilidad dentro de la población de riesgo. En algunos países, trabajadores y miembros de la población general intervienen en el proceso normativo con valiosas aportaciones, especialmente cuando la cuestión está rodeada de considerables incertidumbres científicas.

Una de las principales incertidumbres es cómo definir un efecto adverso para la salud que debe prevenirse —por ejemplo, si la formación de aductos como biomarcador de la exposición es en sí misma un efecto adverso (es decir, un biomarcador del efecto) que debe prevenirse. Es probable que se planteen difíciles cuestiones a la hora de decidir si es éticamente defendible establecer, respecto del mismo compuesto, límites distintos para la exposición ocasional por una parte y para la exposición profesional por otra.

En general, la información que se obtiene de los biomarcadores debe transmitirse a los individuos examinados en el contexto de la relación médico-paciente. Hay que tener especialmente en cuenta las cuestiones éticas cuando se trata de análisis con biomarcadores muy experimentales a los que aún no se puede dar una interpretación detallada en términos de riesgos reales para la salud. La población general, por ejemplo, dispone actualmente de una orientación limitada con respecto a la interpretación de los biomarcadores de la exposición salvo en el caso de la concentración de plomo en sangre. También es importante la confianza en los datos generados (es decir, si el muestreo se ha realizado de la manera apropiada y si en el laboratorio que ha intervenido se han aplicado buenos procedimientos de control

Tabla 33.8 • Ventajas e inconvenientes de los actuales métodos de identificación del riesgo de cáncer humano.

	Ventajas	Inconvenientes
Estudios epidemiológicos	(1) los humanos son los indicadores últimos de la enfermedad; (2) evaluación de poblaciones sensibles o susceptibles; (3) cohortes de exposición profesional; (4) alertas de centinelas ambientales	(1) generalmente retrospectivos (certificados de defunción, sesgos de recuerdo, etc.); (2) poco sensibles, costosos, largos; (3) a veces no se dispone de datos de exposición fiables o son difíciles de obtener; (4) exposiciones combinadas, múltiples y complejas; falta de cohortes de control adecuadas; (5) no se realizan experimentos en seres humanos; (6) detección del cáncer, no prevención
Bioensayos <i>in vivo</i> de larga duración	(1) evaluaciones prospectivas y retrospectivas (validación); (2) excelente correlación con carcinógenos humanos identificados; (3) se conocen los niveles y condiciones de exposición; (4) se identifican la toxicidad química y los efectos de carcinogenicidad; (5) obtención de resultados relativamente rápida; (6) comparaciones cualitativas entre familias químicas; (7) sistemas biológicos integradores e interactivos muy relacionados con los humanos	(1) raras veces se multiplican, exigen muchos recursos; (3) pocas instalaciones adecuadas para experimentos de este tipo; (4) problema en la extrapolación a otra especie; (5) suelen emplearse niveles de exposición muy superiores a los que experimentan los humanos; (6) la exposición a una única sustancia no refleja las exposiciones humanas, que por lo general son a múltiples sustancias al mismo tiempo
Bioensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de media y corta duración	(1) más rápidos y baratos que otros ensayos; (2) muestras amplias que se multiplican con facilidad; (3) se miden parámetros biológicamente significativos (mutación, etc.); (4) pueden utilizarse como ensayos de detección selectiva para determinar qué sustancias van a someterse a bioensayos de larga duración	(1) los resultados <i>in vitro</i> no predicen totalmente los resultados <i>in vivo</i> ; (2) generalmente específicos de organismos o de órganos; (3) potencias no comparables a animales completos o a los humanos
Relaciones estructura química–actividad biológica	(1) relativamente fáciles, rápidas y baratas; (2) fiables para determinadas clases de sustancias (como nitrosaminas y colorantes de bencidina); (3) se establecen a partir de datos biológicos pero no dependen de experimentación biológica complementaria	(1) no "biológicas"; (2) numerosas excepciones a las reglas formuladas; (3) retrospectivas y raras veces prospectivas (aunque cada vez lo son más)
Inferencias mecanicistas	(1) razonablemente precisas en determinadas clases de sustancias; (2) permiten depurar las hipótesis; (3) pueden orientar las evaluaciones del riesgo a las poblaciones sensibles	(1) mecanismos de carcinogénesis química no definidos, múltiples y probablemente específicos de sustancia o de clase; (2) a veces no destacan las excepciones a los mecanismos generales

de la calidad). Otro ámbito que genera una especial preocupación es el de la hipersusceptibilidad individual. Todas estas cuestiones han de tenerse en cuenta al proporcionar la retroinformación del estudio.

Todos los sectores de la sociedad afectados por un estudio con biomarcadores, o relacionados con su realización, han de intervenir en el proceso de adopción de decisiones sobre la forma de manejar la información generada por el estudio. Deben elaborarse, en los marcos jurídicos y sociales de la región o el país de que se trate, procedimientos específicos para prevenir o resolver los inevitables conflictos éticos. No obstante, cada situación plantea distintas dificultades y escollos, y no es posible elaborar un procedimiento único para la participación del público que cubra todas las aplicaciones de los biomarcadores de la exposición.

● EVALUACION DE LA TOXICIDAD GENETICA

**David M. DeMarini
y James Huff**

Se trata de evaluar la capacidad que tienen los agentes de inducir cualquiera de los tres tipos generales de cambios (o mutaciones) que puede sufrir el material genético (ADN): cambios génicos, cromosómicos y genómicos. En organismos como los humanos, los genes se componen de ADN, que consta de una serie de unidades llamadas bases de nucleótidos. Los genes están organizados en estructuras físicas discretas que se denominan cromosomas. La genotoxicidad puede producir efectos importantes e irreversibles sobre la salud humana. El daño genotóxico es un paso crítico en la inducción del cáncer y puede intervenir también en la inducción de defectos de nacimiento y muerte fetal. Las tres clases de mutaciones que se han mencionado pueden producirse en cualquiera de los dos tipos de tejidos que poseen los organismos como el ser humano: los espermatozoídes y óvulos (células germinales) y el tejido restante (células somáticas).

Los ensayos que miden la mutación génica son los que detectan la sustitución, adición o supresión de nucleótidos en un gen. Los ensayos que miden la mutación cromosómica son los que detectan rupturas o reordenaciones cromosómicas en las que intervienen uno o varios cromosomas. Los ensayos que miden la mutación genómica son los que detectan cambios en el número de cromosomas, fenómeno que se denomina aneuploidía. La evaluación de la toxicidad genética ha cambiado mucho desde que Herman Muller desarrolló en 1927 el primer ensayo de detección de agentes genotóxicos (mutágenos). Desde entonces se han desarrollado más de 200 ensayos que miden las mutaciones del ADN; no obstante, no llegan a diez los que normalmente se utilizan hoy para evaluar la toxicidad genética. En esta sección se examinan los ensayos, se describe lo que esos ensayos miden y se estudia su papel en la evaluación de la toxicidad.

La identificación del riesgo de cáncer antes del desarrollo de la toxicología genética

La toxicología genética es hoy una parte más del proceso global de evaluación del riesgo, y en los últimos tiempos ha cobrado más importancia como instrumento para predecir de manera fiable la actividad carcinógena. No obstante, hasta que se desarrolló la toxicología genética (antes de 1970) se utilizaban otros métodos para identificar los riesgos potenciales de cáncer en los humanos,

métodos que siguen empleándose en la actualidad. Los métodos que se utilizan hoy para identificar los riesgos de cáncer humano pueden dividirse en seis categorías principales: estudios epidemiológicos, bioensayos *in vivo* de larga duración, bioensayos *in vivo* de duración media, bioensayos *in vivo* e *in vitro* de corta duración, inteligencia artificial (estructura-actividad) e inferencias mecanistas.

En la Tabla 33.8 se presentan las ventajas e inconvenientes de esos métodos.

Justificación y fundamento teórico de los ensayos de toxicología genética

Aunque los tipos exactos y el número de ensayos que se utilizan para evaluar la toxicidad genética están evolucionando constantemente y varían según los países, los más frecuentes son los que se emplean para determinar 1) mutaciones génicas en bacterias y/o células de mamíferos en cultivo y 2) mutaciones cromosómicas en células de mamíferos en cultivo y/o médula ósea en ratones vivos. Algunos de los ensayos de esta segunda categoría pueden detectar también la aneuploidía. Aunque no detectan las mutaciones que se producen en las células germinales, estos ensayos se utilizan sobre todo porque los que son específicos para esas células son más costosos y complejos. No obstante, se realizan ensayos con células germinales en ratones cuando se desea obtener información sobre los efectos en ellas.

Estudios sistemáticos realizados a lo largo de un período de 25 años (1970–1995), especialmente en el Programa Nacional de Toxicología (NTP) de los Estados Unidos en Carolina del Norte, han llevado a que se utilice un número limitado de ensayos para detectar la actividad mutágena de los agentes. El criterio para evaluar la utilidad de los ensayos se basaba en su capacidad de detectar agentes que provocan cáncer en roedores y de los que se sospecha que provocan cáncer en los humanos (es decir, los carcinógenos). Esto se debe a que estudios realizados en los últimos decenios han indicado que las células cancerosas contienen mutaciones en determinados genes y que muchos carcinógenos son también mutágenos. Así, se considera que las células cancerosas contienen mutaciones de células somáticas, y la carcinogénesis se considera como un tipo de mutagénesis de células somáticas.

Los ensayos de toxicidad genética que más se utilizan en la actualidad se han seleccionado no sólo porque cuentan con una base de datos amplia, cuestan relativamente poco y son fáciles de realizar, sino también porque se ha demostrado que detectan muchos carcinógenos de los roedores y, presumiblemente, de los humanos. En consecuencia, se emplean ensayos de toxicidad genética para predecir la carcinogenicidad potencial de los agentes.

Un importante avance conceptual y práctico de la toxicología genética fue comprobar que muchos carcinógenos eran modificados por enzimas en el cuerpo, creándose formas alteradas (metabolitos) que eran muchas veces la forma carcinógena y mutágena última de la sustancia química original. Para reproducir ese metabolismo en una placa petri, Heinrich Malling demostró que un preparado obtenido a partir de hígado de roedor contenía muchas de las enzimas necesarias para realizar esa conversión o activación metabólica. Por eso en muchos ensayos de toxicidad genética realizados en placas o tubos (*in vitro*) se añaden preparados enzimáticos similares. Los preparados simples se denominan mezcla S9, y los purificados se llaman microsomas. Gracias a la ingeniería genética se dispone hoy de algunas células de bacterias y mamíferos que contienen algunos de los genes de roedores o humanos que producen esas enzimas, lo que reduce la necesidad de añadir la mezcla S9 o microsomas.

Ensayos y técnicas de toxicología genética

Los principales sistemas bacterianos que se utilizan para detectar la toxicidad genética son el ensayo de mutagenicidad con *Salmonella* (Ames) y, en mucha menor medida, la cepa WP2 de *Escherichia coli*. Estudios realizados a mediados de la década de 1980 demostraron que sólo dos cepas del sistema *Salmonella* (TA98 y TA100) bastaban para detectar aproximadamente el 90 % de los mutágenos de *Salmonella* conocidos. Así pues, son esas dos cepas las que más se utilizan con fines de detección, aunque se pueden utilizar otras en ensayos más amplios.

Los ensayos se realizan de diversas maneras, pero dos procedimientos generales son la incorporación en placa y la suspensión en líquido. En el ensayo de incorporación en placa, las células, la sustancia química que es objeto de la prueba y (si se desea) el S9 se añaden a un agar licuado y se vierten en la superficie de una placa petri con agar. El agar de la parte superior se endurece en unos minutos, y la placa se incuba durante dos o tres días; al cabo de ese tiempo las células mutantes han crecido lo suficiente para formar racimos detectables visualmente que se llaman colonias y que después se cuentan. El medio de agar contiene agentes selectivos o está compuesto por ingredientes tales que sólo permiten crecer a las células que acaban de sufrir la mutación. El ensayo de incubación en líquido es similar, excepto en que las células, el agente que es objeto del ensayo y el S9 se incuban juntos en líquido que no contiene agar licuado, y después las células se lavan para quitarle el agente del ensayo y el S9 y se siembran en el agar.

En las células de mamífero en cultivo, las mutaciones se detectan sobre todo en uno de estos dos genes: *hprt* y *tk*. Análogamente a los ensayos con bacterias, las líneas celulares de mamíferos (obtenidas de células de roedores o humanas) se exponen al agente en placas o tubos de cultivo de plástico y después se siembran en placas de cultivo que contienen un medio con un agente selectivo que permite crecer sólo a las células mutantes. Entre los ensayos de este tipo figuran los denominados CHO/HPRT, TK6 y linfoma L5178Y/TK^{+/−} del ratón. Se utilizan también otras líneas celulares que contienen diversas mutaciones de la reparación del ADN y algunos genes humanos que intervienen en el metabolismo. Esos sistemas permiten recuperar las mutaciones que se han producido en el gen (mutación génica), así como las que han afectado a regiones del cromosoma contiguas al gen (mutación cromosómica). No obstante, este último tipo de mutación se recupera mucho mejor con los sistemas del gen tk que con los del gen *hprt* debido a la localización del primero.

Similares a los ensayos de incubación en líquido para detectar la mutagenicidad bacteriana, los ensayos de mutagenicidad en células de mamíferos suelen comprender la exposición de las células en placas o tubos de cultivo en presencia del agente del ensayo y de S9 durante varias horas. Después se lavan las células, se cultivan durante varios días más para que los productos génicos normales (tipo silvestre) puedan degradarse y se expresen y acumulen los nuevos productos mutantes, y después se siembran en un medio que contiene un agente selectivo que permite crecer solamente a las células mutantes. Como en los ensayos con bacterias, las células mutantes crecen formando colonias detectables visualmente que después se cuentan.

La mutación cromosómica se identifica básicamente mediante ensayos citogenéticos, que consisten en exponer roedores y/o células de roedores o humanas a la sustancia química en placas de cultivo, dejar que se produzcan una o varias divisiones celulares, teñir los cromosomas y después examinar visualmente los cromosomas al microscopio para detectar alteraciones en la estructura o el número de cromosomas. Aunque pueden buscarse diversos fenómenos, los dos actualmente aceptados por

los organismos de regulación como más significativos son las aberraciones cromosómicas y una subcategoría denominada micronúcleos.

Se requiere una sólida formación y considerable experiencia para contar las células con aberraciones cromosómicas, lo que hace que sea un procedimiento costoso en tiempo y en dinero. En cambio, la detección de los micronúcleos requiere poca formación, y puede automatizarse. Los micronúcleos se presentan como pequeños puntos dentro de la célula que son distintos del núcleo, que contiene los cromosomas. Los micronúcleos se producen por rotura del cromosoma o por aneuploidía. Por la facilidad de contar los micronúcleos en comparación con las aberraciones cromosómicas, y como estudios recientes indican que los agentes que inducen aberraciones cromosómicas en la médula ósea de ratones vivos inducen también por lo general micronúcleos en este tejido, hoy es habitual medir los micronúcleos como indicación de la capacidad de un agente para inducir mutaciones cromosómicas.

Aunque se utilizan con mucha menos frecuencia que los ensayos que se acaban de describir, los que se realizan con células germinales son indispensables para determinar si un agente comporta un riesgo de mutaciones en estas células, mutaciones que pueden tener efectos sobre la salud de generaciones futuras. Los ensayos con células germinales más utilizados se realizan en el ratón, y comprenden sistemas que detectan 1) las translocaciones (intercambios) heredables entre cromosomas (ensayo de translocación heredable), 2) las mutaciones génicas o cromosómicas que afectan a genes específicos (ensayos específicos de locus, visibles o bioquímicos) y 3) las mutaciones que afectan a la viabilidad (ensayo de factor letal dominante). Como en el caso de los que se realizan con células somáticas, en estos ensayos la hipótesis de trabajo es que los agentes que dan positivo en ellos se consideran mutágenos potenciales de las células germinales humanas.

Situación actual y perspectivas para el futuro

En estudios recientes sólo se han necesitado tres tipos de información para detectar aproximadamente el 90 % de una serie de 41 carcinógenos de roedores (es decir, carcinógenos y mutágenos de células somáticas supuestamente humanas). Esos tipos de información son: 1) el conocimiento de la estructura química del agente, especialmente si contiene unidades electrófilas (véase la sección sobre las relaciones estructura-actividad); 2) datos sobre la mutagenicidad en *Salmonella*, y 3) datos de un ensayo de toxicidad crónica de 90 días en roedores (ratones y ratas). De hecho, prácticamente todas las sustancias que la IARC ha declarado como carcinógenos humanos son detectables como mutágenos utilizando sólo el ensayo con *Salmonella* y el ensayo de micronúcleos en la médula ósea del ratón. La utilidad de estos ensayos de mutagenicidad para detectar carcinógenos humanos potenciales se ha confirmado aún más al comprobarse que en su mayoría los carcinógenos humanos lo son también en las ratas y los ratones (carcinógenos transespecies) y que los carcinógenos transespecies son en su mayoría mutágenos en *Salmonella* y/o inducen micronúcleos en la médula ósea del ratón.

Con los avances que se han producido en la tecnología del ADN, el proyecto del genoma humano y un mejor conocimiento del papel de la mutación en el cáncer, se están desarrollando nuevos ensayos de genotoxicidad que probablemente se incorporarán a los procedimientos de detección habituales. Entre ellos figura el empleo de células y roedores transgénicos. Los sistemas transgénicos son aquellos en los que se introduce en una célula u organismo un gen de otra especie. Por ejemplo, se están utilizando experimentalmente ratones transgénicos que permiten detectar la mutación en cualquier órgano o tejido del animal introduciendo en éste un gen bacteriano. Se dispone de células

bacterianas, como *Salmonella*, y de células de mamíferos (incluidas líneas celulares humanas) que contienen genes que intervienen en el metabolismo de agentes carcinógenos/mutágenos, como los genes P450. Puede realizarse hoy el análisis molecular de las mutaciones efectivas inducidas en el transgen de roedores transgénicos, o en genes nativos como *hprt* o en los genes diana de *Salmonella*, de manera que puede determinarse con exactitud la naturaleza de las mutaciones inducidas por las sustancias químicas, lo que arroja luz sobre el mecanismo de acción de la sustancia y permite establecer comparaciones con mutaciones en humanos supuestamente expuestos a ese agente.

Los avances de la citogenética molecular permiten hoy evaluar con más detalle las mutaciones cromosómicas. Entre esos avances figura el empleo de sondas (pequeños fragmentos de ADN) que se unen (hibridizan) a determinados genes. Puede comprobarse después la forma en que los genes se reordenan en el cromosoma mediante las nuevas localizaciones de las sondas, que son fluorescentes y se observan fácilmente como los sectores coloreados de los cromosomas. La electroforesis en gel sobre una sola célula para determinar la rotura del ADN (que es el ensayo que suele denominarse "cometa") permite comprobar ese fenómeno en células sueltas y puede ser un instrumento de suma utilidad en combinación con técnicas citogenéticas para detectar el daño cromosómico.

Tras muchos años de utilización y tras generarse una base de datos amplia y sistemática, la evaluación de la toxicidad genética puede realizarse hoy con un escaso número de ensayos de coste relativamente reducido y en un tiempo relativamente corto (unas semanas). Los datos obtenidos pueden utilizarse para predecir la capacidad que posee un gen de ser carcinógeno/mutágeno de células somáticas en los roedores y, presumiblemente, en el ser humano. Ello permite limitar la introducción en el medio ambiente de agentes mutágenos y carcinógenos y desarrollar otros agentes distintos no mutágenos. De los estudios que se realicen en el futuro se deben derivar métodos aún mejores y de mayor capacidad de predicción que los ensayos actuales.

muy costosa en tiempo y en dinero, si es que fuera posible realizarla.

Se plantean asimismo cuestiones sociales relacionadas con la salud y seguridad públicas, y hay una creciente preocupación pública acerca del empleo de animales en ensayos de seguridad de productos. En lo que se refiere a la seguridad humana, los grupos de defensa del interés público y del medio ambiente han presionado considerablemente a los organismos gubernamentales para que apliquen normas más estrictas en materia de sustancias químicas. Un ejemplo reciente ha sido la petición de algunos grupos de defensa del medio ambiente de los Estados Unidos de que se prohibieran el cloro y los compuestos que contienen cloro. Una de las razones de esta actitud extrema reside en el hecho de que la mayoría de esos compuestos no ha sido objeto de ensayos suficientes. Desde la perspectiva de la toxicología, la idea de prohibir toda una clase de sustancias químicas diversas sólo porque contienen cloro es científicamente poco sólida e irresponsable. Con todo, desde la perspectiva del público es comprensible la petición de que se den garantías de que las sustancias químicas que se liberan en el medio ambiente no comportan un riesgo importante para la salud. Esta situación subraya la necesidad de elaborar métodos de evaluación de la toxicidad que sean más eficientes y más rápidos.

La otra preocupación social que ha afectado al ámbito de los ensayos de toxicidad es el bienestar de los animales. Los grupos que en todo el mundo se dedican a la protección de los animales, cada vez más numerosos, han expresado una considerable oposición al empleo de animales completos en ensayos de seguridad de productos. Se han lanzado campañas activas contra los fabricantes de cosméticos, productos para el hogar y de cuidado personal y fármacos en un intento de detener los ensayos con animales. En Europa, ello hizo que se aprobara la sexta modificación de la Directiva 76/768/CEE (la llamada "directiva sobre cosméticos"). La directiva dispone que los productos cosméticos o ingredientes de cosméticos que se hayan ensayado en animales a partir del 1 de enero de 1998 no podrán comercializarse en la Unión Europea, a menos que no haya otros métodos alternativos suficientemente validados. Aunque la prohibición no es aplicable a la venta de tales productos en los Estados Unidos o en otros países, la directiva afectará notablemente a las empresas que tienen mercados internacionales en los que está incluida Europa.

El concepto de otros métodos alternativos, que constituye la base del desarrollo de ensayos distintos de los que se realizan con animales completos, se define por la regla de la triple R: *reducir* el número de animales empleados; *refinar* los protocolos, de manera que los animales sufran menos tensión o molestia, y *reemplazar* los actuales ensayos con animales por ensayos *in vitro* (es decir, ensayos realizados fuera del animal vivo), modelos informáticos o ensayos en especies de invertebrados o de vertebrados inferiores. La regla de la triple R se propuso en un libro que publicaron en 1959 dos científicos británicos, W.M.S. Russell y Rex Burch, y que se titulaba *The Principles of Humane Experimental Technique*. Russell y Burch mantenían que la única manera de conseguir resultados científicos válidos pasaba por el tratamiento humano de los animales, y pensaban que debían desarrollarse métodos para reducir y en última instancia sustituir el uso de animales. Pero los principios enunciados por Russell y Burch no tuvieron mucho eco en su día, y tuvieron que esperar a que a mediados del decenio de 1970 resurgiera el movimiento de defensa del bienestar de los animales. Hoy el concepto de las tres R está presente, y en primera línea, en las actividades de investigación, realización de ensayos y formación.

En resumen, puede afirmarse que en el desarrollo de los métodos de ensayo *in vitro* han convergido diversos factores a lo largo de los últimos 10-20 años. No es fácil saber si cualquiera

● ENSAYOS DE TOXICIDAD *IN VITRO*

Joanne Zurlo

La aparición de complejas tecnologías en la biología molecular y celular ha impulsado una evolución relativamente rápida en las ciencias de la vida, entre ellas la toxicología. En efecto, la toxicología no se está centrando tanto en animales completos y poblaciones de animales completos como en las células y moléculas de animales y seres humanos individuales. A mediados del decenio de 1980 los toxicólogos empezaron a aplicar estos nuevos métodos a la evaluación de los efectos de las sustancias químicas sobre los sistemas vivos. Como progresión lógica, esos métodos se están adaptando a los fines de los ensayos de toxicidad. Estos avances científicos han contribuido junto con factores sociales y económicos a modificar la evaluación de la seguridad de los productos y del riesgo potencial.

Los factores económicos están específicamente relacionados con el volumen de materiales que se ha de ensayar. Cada año se introducen en el mercado gran cantidad de nuevos cosméticos, fármacos, plaguicidas, sustancias químicas y productos para el hogar. Y ha de evaluarse la toxicidad potencial de todos ellos. Hay además un retraso acumulado, pues sustancias químicas que ya se están utilizando no se ensayaron suficientemente en su día. La inmensa tarea de obtener información detallada sobre la seguridad de todas esas sustancias químicas utilizando los métodos de ensayo tradicionales con animales completos sería

de esos factores por sí sólo hubiera tenido un efecto tan profundo sobre las estrategias de los ensayos de toxicidad.

Concepto de los ensayos de toxicidad *in vitro*

En esta sección nos ocuparemos únicamente de los métodos de evaluación de la toxicidad que se realizan *in vitro*, como una de las varias alternativas a los ensayos con animales completos. En otras secciones de este capítulo se examinan otras opciones distintas del uso de animales, como la elaboración de modelos informáticos y las relaciones estructura-actividad cuantitativas.

Los estudios *in vitro* se realizan generalmente en células o tejidos animales o humanos fuera del cuerpo. La expresión “*in vitro*” (“en vidrio”) se refiere a los procedimientos que se realizan sobre material vivo o componentes de material vivo en placas petri o en tubos de ensayo en unas condiciones definidas. Lo contrario son los estudios “*in vivo*”, es decir, realizados “en el animal vivo”. Aunque es difícil, si no imposible, proyectar los efectos de una sustancia química sobre un organismo complejo cuando las observaciones se limitan a un único tipo de células en una placa, los estudios *in vitro* sí que proporcionan una notable cantidad de información sobre la toxicidad intrínseca, así como sobre los mecanismos celulares y moleculares de la toxicidad. Además, ofrecen muchas ventajas sobre los estudios *in vivo*, sobre todo que son en general más baratos y que pueden controlarse mejor las condiciones en que se realizan. A ello hay que añadir que, pese a que sigue siendo necesario contar con algunos animales para obtener las células que se van a cultivar *in vitro*, estos métodos pueden considerarse como alternativas válidas en el sentido de la “reducción” (pues se emplean muchos menos animales que en los estudios *in vivo*) y del “refinamiento” (porque eliminan la necesidad de someter a los animales a las consecuencias tóxicas adversas inevitables en los experimentos *in vivo*).

Para interpretar los resultados de los ensayos de toxicidad *in vitro*, determinar su utilidad potencial en la evaluación de la toxicidad y relacionarlos con el proceso toxicológico general *in vivo*, es necesario comprender qué parte del proceso toxicológico se está examinando. El proceso toxicológico completo consiste en unos fenómenos que se inicián con la exposición del organismo a un agente físico o químico, prosiguen con las interacciones celulares y moleculares y acaban manifestándose en la respuesta del organismo completo. Los ensayos *in vitro* suelen limitarse a la parte del proceso toxicológico que se desarrolla al nivel celular y molecular. Los estudios realizados con este método pueden proporcionar información sobre por ejemplo las rutas metabólicas, la interacción de metabolitos activos con dianas celulares y moleculares y parámetros o “puntos finales” de la toxicidad que pueden medirse y que por lo tanto pueden utilizarse como biomarcadores moleculares de la exposición. Lo ideal sería conocer el mecanismo de toxicidad de todas las sustancias químicas, desde la exposición hasta la manifestación en el organismo, de tal manera que la información obtenida en los ensayos *in vitro* pudiera interpretarse y relacionarse íntegramente con la respuesta del organismo en su conjunto. Pero ello es prácticamente imposible, pues hasta el momento son relativamente pocos los mecanismos toxicológicos que se ha logrado elucidar en su totalidad. Por ello, los toxicólogos se enfrentan a una situación en la que los resultados de un ensayo *in vitro* no pueden utilizarse como una predicción totalmente exacta de la toxicidad *in vivo* porque se desconoce el mecanismo. No obstante, es frecuente que durante el proceso de desarrollo de un ensayo *in vitro* se logren comprender algunos componentes del mecanismo o mecanismos celulares y moleculares de la toxicidad.

Una de las cuestiones clave que están sin resolver en cuanto al desarrollo y realización de ensayos *in vitro* es la que se refiere a la consideración siguiente: ¿deben tener una base mecanicista, o basta con que sean descriptivos? Desde una perspectiva

científica es incontrovertiblemente mejor utilizar sólo ensayos de base mecanicista para sustituir a los ensayos *in vivo*. Pero, ante la ausencia de conocimientos mecanicistas completos, la posibilidad de desarrollar ensayos *in vitro* que sustituyan totalmente a los ensayos con animales enteros en el futuro próximo es casi nula. No obstante, ello no descarta la utilización de tipos de ensayos más descriptivos como instrumentos de detección precoz, como es el caso en la actualidad. Con esos métodos de detección se ha conseguido reducir notablemente el uso de animales. Por consiguiente, hasta que llegue el momento en que se genere más información mecanicista, puede ser necesario emplear de manera más limitada ensayos cuyos resultados simplemente tengan una buena correlación con los obtenidos *in vivo*.

Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

En esta sección se describirán varios ensayos *in vitro* que se han desarrollado para evaluar el potencial citotóxico de una sustancia química. Son en su mayoría ensayos fáciles de realizar, y el análisis puede automatizarse. Un ensayo de citotoxicidad *in vitro* que se utiliza habitualmente es el ensayo rojo neutro. Se realiza en células en cultivo, y en la mayoría de las aplicaciones las células pueden mantenerse en placas de cultivo que contienen 96 pocillos, cada uno de 6,4 mm de diámetro. Como cada pocillo puede utilizarse para una sola determinación, este sistema permite emplear múltiples concentraciones de la sustancia así como controles positivos y negativos con un número suficiente de repeticiones para cada caso. Tras el tratamiento de las células con diversas concentraciones de la sustancia que se ensaya, que abarcan al menos dos órdenes de magnitud (por ejemplo, de 0,01 mM a 1 mM), así como con sustancias de control positivo y negativo, las células se lavan y tiñen con rojo neutro, un colorante que puede absorber y retener únicamente las células vivas. La tinción puede realizarse nada más retirar la sustancia ensayada, y entonces se observan los efectos inmediatos, o puede realizarse también en diversos momentos posteriores para observar los efectos acumulados o retardados. La intensidad del color en cada pocillo corresponde al número de células vivas en ese pocillo. La intensidad del color se mide mediante un espectrofotómetro, que puede estar equipado con un lector de placas. El lector se programa para que proporcione mediciones individuales de cada uno de los 96 pocillos de la placa de cultivo. Esta metodología automatizada permite al investigador realizar rápidamente un experimento de concentración-respuesta y obtener datos útiles desde el punto de vista estadístico.

Otro ensayo de citotoxicidad relativamente sencillo es el que se realiza con la prueba MTT. El MTT (bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) es un colorante de tetrazolio que se reduce a color azul por la acción de enzimas mitocondriales. Sólo las células con mitocondrias viables conservan la capacidad de efectuar esa reacción; por lo tanto, la intensidad del color está directamente relacionada con el grado de integridad de las mitocondrias. Es un ensayo útil para detectar compuestos citotóxicos generales, así como los agentes que tienen a las mitocondrias como diana específica.

También se utiliza como ensayo de citotoxicidad de amplio espectro la medida de la actividad de la lática deshidrogenasa (LDH). Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas o moribundas que se han visto afectadas por un agente tóxico. Tras la aplicación de la sustancia ensayada a las células se retiran en diversos momentos pequeñas cantidades del medio de cultivo de las células para medir la cantidad de LDH liberada y determinar el curso temporal de la toxicidad. Aunque no permite más que una evaluación muy general de la citotoxicidad, el valor

del ensayo de liberación de LDH reside en que es fácil de hacer y en que puede realizarse en tiempo real.

Se están desarrollando muchos métodos nuevos de detectar el daño celular. Los más sofisticados emplean sondas fluorescentes para medir diversos parámetros intracelulares, como la liberación de calcio y las alteraciones del pH y del potencial de la membrana. En general, esas sondas son muy sensibles y pueden detectar cambios celulares más sutiles, con lo que se reduce la necesidad de utilizar la muerte celular como punto final de la toxicidad. Además, muchos de esos ensayos de fluorescencia pueden automatizarse utilizando placas de 96 pocillos y lectores de placas fluorescentes.

Una vez que se han acopiado datos sobre una serie de sustancias químicas utilizando uno de estos ensayos, pueden determinarse las toxicidades relativas. La toxicidad relativa de una sustancia química, tal como se determina en un ensayo *in vitro*, puede expresarse como la concentración que produce un efecto del 50 % en la respuesta de punto final en células no tratadas. Esta determinación se suele denominar CE₅₀ (concentración efectiva en el 50 % de las células) y puede utilizarse para comparar las toxicidades de diferentes sustancias químicas *in vitro*. (En las evaluaciones de la toxicidad relativa se utiliza también una expresión análoga, CI₅₀, que indica la concentración de una sustancia que provoca una inhibición del 50 % de un proceso celular, como por ejemplo la capacidad de absorber el rojo neutro.) No es fácil determinar si la toxicidad relativa *in vitro* de las sustancias químicas es comparable a sus toxicidades relativas *in vivo*, pues en el sistema *in vivo* intervienen muchos factores que crean confusión, como la toxicocinética, el metabolismo y los mecanismos de reparación y defensa. Además, como la mayoría de esos ensayos mide parámetros de la citotoxicidad general, no tienen una base mecanicista. Por consiguiente, la concordancia entre las toxicidades relativas *in vitro* e *in vivo* es meramente correlativa. Pese a los muchos problemas y dificultades que plantea la extrapolación de *in vitro* a *in vivo*, estos ensayos *in vitro* están resultando muy valiosos porque su realización es sencilla y poco costosa y porque pueden utilizarse como métodos de detección con los que seleccionar fármacos o compuestos muy tóxicos en las fases tempranas de su desarrollo.

Toxicidad en órganos diana

Suelen utilizarse también los ensayos *in vitro* para evaluar la toxicidad en órganos diana específicos. El diseño de estos ensayos plantea varios problemas, el principal de los cuales es que los sistemas *in vitro* no pueden mantener muchos de los rasgos del órgano *in vivo*. Muchas veces, cuando las células se extraen de animales y se ponen en cultivo, tienden a degenerar rápidamente y/o a desdiferenciarse, es decir, a perder sus especializaciones funcionales (como si fueran un órgano) y a hacerse más genéricas. Esto plantea un problema en el sentido de que en un breve período de tiempo, por lo general unos días, ya no sirven para evaluar los efectos orgañospecíficos de un tóxico.

Muchos de estos problemas se están resolviendo gracias a los recientes avances de la biología molecular y celular. La información que se obtiene sobre el entorno celular *in vivo* puede utilizarse para modular las condiciones del cultivo *in vitro*. Desde mediados del decenio de 1980 se han descubiertos nuevos factores de crecimiento y citoquinas, y muchos de ellos pueden conseguirse hoy en el mercado. Añadiendo esos factores a las células en cultivo se les ayuda a que conserven su integridad y a veces también a que mantengan durante más tiempo su diferenciación funcional. Gracias a otros estudios básicos se van conociendo mejor asimismo las necesidades nutricionales y hormonales de las células cultivadas, de manera que pueden formularse nuevos medios de cultivo. También se ha avanzado recientemente en la identificación de las matrices extracelulares,

tanto naturales como artificiales, en las que pueden cultivarse células. El cultivo de células en esas diversas matrices puede afectar profundamente tanto a su estructura como a su función. Una importante ventaja de estos avances es que se puede controlar de una manera compleja el entorno de las células en cultivo y examinar individualmente los efectos de esos factores sobre procesos celulares básicos y sobre las respuestas de las células a diferentes agentes químicos. En suma, esos sistemas pueden ser de gran utilidad para conocer los mecanismos orgañospecíficos de la toxicidad.

Muchos estudios de toxicidad en órganos diana se realizan en células primarias, que por definición son las extraídas directamente de un órgano, y que por lo general tienen una vida en cultivo limitada. Desde el punto de vista de la evaluación de la toxicidad, los cultivos primarios de un único tipo de célula de un órgano presentan muchas ventajas. Desde una perspectiva mecanicista, esos cultivos son útiles para estudiar dianas celulares específicas de una sustancia. En algunos casos pueden cultivarse juntos dos o más tipos de células de un órgano, lo que tiene la ventaja añadida de que se pueden observar las interacciones célula-célula en respuesta a un tóxico. Se han diseñado sistemas de cocultivo para la piel que forman una estructura tridimensional semejante a la de la piel *in vivo*. También se pueden cocultivar células de distintos órganos —por ejemplo el hígado y el riñón. Los cultivos de este tipo suelen ser útiles para evaluar los efectos que provoca específicamente en las células renales una sustancia que debe bioactivarse en el hígado.

Los instrumentos de la biología molecular han desempeñado también un papel importante en el desarrollo de líneas celulares continuas que pueden ser de utilidad en los ensayos de toxicidad en órganos diana. Esas líneas celulares se generan mediante la transfección de células primarias con ADN. En el procedimiento de transfección, las células y el ADN se tratan de tal manera que las primeras puedan absorber al segundo. El ADN, generalmente de un virus, posee uno o varios genes que, cuando se expresan, hacen posible que las células se inmortalicen (es decir, que sean capaces de vivir y crecer durante largo tiempo en el cultivo). También puede diseñarse el ADN de manera que su gen inmortalizador sea controlado por un promotor inducible. La ventaja de este tipo de construcción es que las células se dividen sólo cuando reciben el estímulo químico apropiado que permite expresarse al gen inmortalizador. Un ejemplo de estas construcciones es el gran gen antígeno T del Simian Virus 40 (SV40) (gen inmortalizador), que está precedido por la región promotora del gen de la metalotioneína, el cual es a su vez inducido por la presencia de un metal en el medio de cultivo. Así, una vez realizada la transfección de las células con el gen, éstas pueden tratarse con bajas concentraciones de zinc para estimular al promotor MT y poner en marcha la expresión del gen antígeno T. Bajo esas condiciones, las células proliferan. Cuando se retira el zinc del medio, las células dejan de dividirse y, en condiciones ideales, vuelven a un estado en el que expresan sus funciones tejidoespecíficas.

Junto con los avances de la tecnología de los cultivos celulares, la capacidad de generar células inmortalizadas ha contribuido en gran medida a que se hayan podido crear líneas celulares de muchos órganos distintos, entre ellos el cerebro, el riñón y el hígado. No obstante, antes de que esas líneas celulares puedan utilizarse como sustitutivos de los tipos genuinos han de caracterizarse con sumo cuidado para determinar hasta qué punto son realmente "normales".

Hay otros sistemas *in vitro* para estudiar la toxicidad de órganos diana que están adquiriendo cada vez más complejidad. A medida que los sistemas *in vitro* van haciéndose más complejos, del cultivo de una célula sola al cultivo de órganos completos, se van haciendo más comparables con el medio *in vivo* pero al

Tabla 33.9 • Comparación de sistemas *in vitro* empleados en estudios de hepatotoxicidad.

Sistema	Complejidad (nivel de interacción)	Capacidad de conservar funciones hepatoespecíficas	Duración potencial del cultivo	Capacidad de controlar el medio
Líneas celulares inmortalizadas	algo célula-célula (varía según la línea celular)	de escasa a buena (varía según la línea celular)	indefinida	excelente
Cultivos de hepatocitos primarios	célula-célula	de bastante buena a excelente (varía según las condiciones de cultivo)	de días a semanas	excelente
Cocultivos de células hepáticas	célula-célula (entre células del mismo tipo o de tipos distintos)	de buena a excelente	semanas	excelente
Rodajas de hígado	célula-célula (entre todos los tipos de células)	de buena a excelente	de horas a días	bueno
Hígado aislado perfundido	célula-célula (entre todos los tipos de células) e intraórgano	excelente	horas	bastante bueno

mismo tiempo, habida cuenta del mayor número de variables, va siendo cada vez más difícil controlarlos. Por consiguiente, lo que puede ganarse al pasar a un nivel superior de organización puede perderse por la incapacidad del investigador para controlar el entorno experimental. En la Tabla 33.9 se comparan algunas de las características de varios sistemas *in vitro* que se han utilizado para estudiar la hepatotoxicidad.

En los estudios toxicológicos se están utilizando cada vez más las capas de tejido obtenidas con corte de precisión. Se dispone hoy de nuevos instrumentos que permiten al investigador cortar rodajas de tejido uniformes en un entorno estéril. En comparación con los sistemas de cultivo celular, las rodajas tisulares tienen la ventaja de que están presentes todos los tipos de células del órgano y de que se mantienen la arquitectura y la comunicación intercelular de las condiciones *in vivo*. Así, pueden realizarse estudios *in vitro* para determinar el tipo de célula que es diana en un órgano y para investigar la toxicidad en órganos diana concretos. Un inconveniente de las capas es que degeneran rápidamente a partir de las 24 horas de cultivo, debido sobre todo a la escasa difusión de oxígeno a las células en su interior. No obstante, estudios recientes han indicado que puede conseguirse una oxigenación más eficiente mediante una suave rotación. Junto con el uso de un medio más complejo, se consigue así que las rodajas sobrevivan hasta 96 horas.

Los cultivos de tejido responden a un concepto similar al de las capas y pueden utilizarse también para determinar la toxicidad de sustancias químicas en órganos diana específicos. Los explantes tisulares se realizan extrayendo un pequeño trozo de tejido (o un embrión intacto en el caso de los estudios de teratogenicidad) y poniéndolo en cultivo para estudiarlo después. Los cultivos de tejidos han sido de utilidad en estudios sobre toxicidades de corta duración, como la irritación y erosión de la piel, estudios sobre los efectos del amianto en la tráquea y estudios de neurotoxicidad en el tejido cerebral.

Para evaluar la toxicidad en determinados órganos pueden utilizarse también órganos aislados perfundidos. Al igual que las capas y cultivos tisulares, en estos sistemas tienen la ventaja de que están presentes todos los tipos de células, pero sin que el tejido haya sufrido la tensión derivada de las manipulaciones a que obliga la preparación de las capas. Además, se mantienen las interacciones intraórgano. Un importante inconveniente es que se mantienen viables durante poco tiempo, lo que limita su uso en los ensayos de toxicidad *in vitro*. En cuanto a sus posibilidades de ser un método alternativo, estos cultivos pueden considerarse un paso adelante, pues los animales no sufren las consecuencias adversas del tratamiento *in vivo* con tóxicos. No obstante, su empleo no reduce significativamente el número de animales que se necesitan.

En resumen, existen varios tipos de sistemas *in vitro* para evaluar la toxicidad en órganos diana. Es posible obtener mucha información sobre los mecanismos de la toxicidad utilizando una o varias de esas técnicas. Pero sigue siendo difícil realizar extrapolaciones de un sistema *in vitro*, que representa una parte relativamente pequeña del proceso tóxico, al proceso completo tal como se produce *in vivo*.

Ensayos *in vitro* sobre irritación ocular

Desde la perspectiva del bienestar de los animales, el más discutido de los ensayos de toxicidad con animales completos es probablemente el ensayo de Draize sobre irritación ocular, que se realiza en conejos. Consiste en poner una pequeña dosis fija de una sustancia química en uno de los ojos del conejo, dejándose el otro como control. El grado de irritación e inflamación se puntuá en varios momentos después de la exposición. Se están dedicando muchos esfuerzos a elaborar metodologías que sustituyan a este ensayo, que se ha criticado no sólo por razones de humanidad sino también por la subjetividad de las observaciones y la variabilidad de los resultados. Es interesante señalar que, pese a las duras críticas que ha recibido, el ensayo de Draize ha sido de gran utilidad para predecir los irritantes del ojo humano, en particular las sustancias irritantes de leves a moderadas, que son difíciles de identificar con otros métodos. Es por tanto muy necesario encontrar alternativas *in vitro*.

La búsqueda de otros métodos que sustituyan al ensayo de Draize es complicada, aunque se prevé que culminará con éxito. Se han elaborado numerosas alternativas *in vitro* y de otro tipo, y en algunos casos se han puesto en práctica. Entre esas otras opciones que mejoran el ensayo de Draize, y que por definición son menos dolorosas o incómodas para los animales, figura el Ensayo Ocular de Poco Volumen, en el que se pone en el ojo del conejo una menor cantidad del material de ensayo, no sólo por razones de humanidad sino también para simular más fielmente las cantidades a las que una persona puede estar accidentalmente expuesta en la realidad. Otra mejora es que las sustancias que tienen un pH inferior a 2 o superior a 11,5 ya no se ensayan en animales, pues se sabe que producen una irritación ocular grave.

Se ha estimado que entre 1980 y 1989 se redujo en un 87 % el número de conejos utilizados para determinar la capacidad de irritación ocular de cosméticos. Esta enorme reducción de los ensayos con animales completos se ha conseguido incorporando ensayos *in vitro* a un enfoque de tres niveles. Se trata de un proceso multifásico que se inicia con el examen concienzudo de los datos históricos de irritación ocular y con el análisis físico y químico de la sustancia que se va a evaluar. Si esos dos procesos no brindan información suficiente, entonces se realiza una

batería de ensayos *in vitro*. Los datos adicionales que se obtienen en esos ensayos pueden ser entonces suficientes para evaluar la seguridad de la sustancia. Si no lo son, la última fase sería realizar ensayos *in vivo* limitados. Es muy evidente que con este enfoque se puede eliminar el uso de animales o al menos reducir drásticamente el número de los que se necesitan para predecir la seguridad de una sustancia.

La batería de ensayos *in vivo* que se utiliza como parte de esta estrategia de tres niveles depende de las necesidades de la actividad industrial de que se trate. El ensayo de irritación ocular se emplea en muchos sectores industriales, desde el de cosméticos y el farmacéutico hasta el de sustancias químicas industriales. No todos los sectores necesitan el mismo tipo de información, por lo que no es posible definir una única batería de ensayos *in vitro*. La batería se diseña generalmente para evaluar cinco parámetros: citotoxicidad, alteraciones de la fisiología y bioquímica del tejido, relaciones cuantitativas estructura-actividad, mediadores de la inflamación, y recuperación y reparación. Un ejemplo de ensayo para comprobar la citotoxicidad, que es una de las posibles causas de la irritación, es el ensayo rojo neutro en el que se utilizan células en cultivo (véase antes). Las alteraciones de la fisiología y bioquímica celulares por exposición a una sustancia química pueden ensayarse en cultivos de células epiteliales de la córnea humana. Otra opción que también han utilizado los investigadores es la de trabajar con globos oculares intactos o diseccionados de bovinos o pollos obtenidos en los mataderos. Muchos de los parámetros que se miden en estos cultivos de órganos completos son los mismos que se miden *in vivo*, como la opacidad e hinchaón de la córnea.

En las lesiones oculares inducidas por sustancias químicas suele producirse inflamación, y existen diversos ensayos para examinar este parámetro. Varios ensayos bioquímicos detectan la presencia de mediadores liberados durante el proceso inflamatorio, como el ácido araquidónico y las citoquinas. También puede utilizarse como indicador de la inflamación la membrana corioalantoica (CAM) del huevo de gallina. En este ensayo, se retira un pequeño fragmento de la cáscara de un embrión de pollo de entre 10 y 14 días para dejar al descubierto la membrana corioalantoica. Se le aplica la sustancia química y después, en diversos momentos, se comprueban los signos de inflamación, como por ejemplo la hemorragia vascular.

Uno de los procesos *in vivo* más difíciles de valorar *in vitro* es el de la recuperación y reparación de una lesión ocular. Un instrumento creado recientemente, el microfisiómetro de sílice, mide pequeñas alteraciones del pH extracelular y puede utilizarse para hacer un seguimiento de las células en cultivo en tiempo real. Se ha comprobado que este análisis muestra una correlación bastante buena con la recuperación *in vivo*, y se ha utilizado como ensayo *in vitro* para este proceso. Hemos hecho un breve repaso de los tipos de ensayos que se están empleando como alternativas a la prueba de Draize sobre irritación ocular. Es probable que en los próximos años se defina una serie completa de baterías de ensayos *in vitro* y que cada una de ellas sea validada para un fin específico.

Validación

La clave para que las metodologías de ensayo *in vitro* sean aceptadas por los órganos reguladores y se apliquen en la práctica es la validación, el proceso mediante el cual se establece la credibilidad de un ensayo para un determinado fin. Se ha intentado definir y coordinar el proceso de validación tanto en los Estados Unidos como en Europa. La Unión Europea creó en 1993 el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) para coordinar las actividades que se realizan en su territorio y cooperar con organizaciones de los Estados Unidos como el Johns Hopkins Centre for Alternatives to Animal Testing

(CAAT), que es una institución académica, o el Interagency Coordination Committee for the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), integrado por representantes de los National Institutes of Health, la Environment Protection Agency (EPA), la Food and Drug Administration (FDA) y la Consumer Products Safety Commission.

La validación de los ensayos *in vitro* exige una considerable organización y planificación. Debe haber un consenso entre los órganos de regulación gubernamentales y los científicos, industriales y académicos sobre los procedimientos aceptables, y una supervisión suficiente por parte de un consejo científico consultivo para garantizar que los protocolos se ajustan a las normas establecidas. Los estudios de validación deben realizarse en una serie de laboratorios de referencia que utilicen conjuntos calibrados de sustancias químicas de un banco de sustancias, así como células o tejidos de una misma procedencia. Deben demostrarse tanto la repetibilidad intralaboratorio como la reproducibilidad interlaboratorios del ensayo candidato, y los resultados se han de someter al análisis estadístico adecuado. Una vez compilados los resultados de los diferentes componentes de los estudios de validación, el consejo científico consultivo puede formular recomendaciones sobre la validez del ensayo o ensayos candidatos para un determinado fin. Además, los resultados de los estudios deben publicarse en las revistas que circulan por la profesión e incorporarse a una base de datos.

La definición del proceso de validación es una tarea que está en curso actualmente. Cada nuevo estudio de validación proporcionará información útil para el diseño del estudio siguiente. La comunicación y la cooperación internacionales son básicas para el desarrollo rápido de una serie ampliamente aceptable de protocolos, sobre todo dada la urgencia que ha impuesto la aprobación de la directiva de la UE sobre cosméticos. Esta legislación puede aportar sin duda el impulso necesario para que se emprenda una seria campaña de validación. Hasta que no finalice ese proceso no podrán empezar a aceptarse los métodos *in vitro*, las diversas instancias reguladoras.

Conclusiones

Hemos visto en esta sección un panorama general de la situación actual de los ensayos de toxicidad *in vitro*. La ciencia de la toxicología *in vitro* es relativamente joven, pero se está desarrollando a un ritmo exponencial. El reto al que se ha de hacer frente en los años venideros es incorporar los conocimientos mecanicistas generados por los estudios celulares y moleculares al amplio conjunto de datos *in vivo* para obtener una descripción más completa de los mecanismos toxicológicos, así como para establecer un paradigma mediante el cual puedan utilizarse los datos *in vitro* para predecir la toxicidad *in vivo*. El aprovechamiento del valor intrínseco de estos métodos *in vitro* pasa necesariamente por la concertación de esfuerzos entre los toxicólogos y los representantes de los gobiernos.

RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Ellen K. Silbergeld

El análisis de las relaciones estructura-actividad (SAR) es la utilización de información sobre la estructura molecular de las sustancias químicas para predecir características importantes en materia de persistencia, distribución, captación-absorción y toxicidad. El método SAR es otra forma posible de identificar sustancias potencialmente peligrosas que promete ser de utilidad a las industrias y a los gobiernos a la hora de establecer las sustancias que prioritariamente deben seguir estudiándose o de adoptar decisiones tempranas sobre nuevas sustancias. Las actividades

toxicológicas son cada vez más costosas y exigen cada vez más recursos. El aumento de la preocupación sobre los posibles efectos adversos de las sustancias químicas sobre las poblaciones humanas expuestas ha impulsado a los organismos reguladores y sanitarios a ampliar la variedad y sensibilidad de los ensayos de detección de peligros toxicológicos. Al mismo tiempo, las cargas reales y percibidas que las normativas legales imponen a la industria han hecho que a ésta le preocupe la viabilidad práctica de los métodos de ensayo y análisis de datos de toxicidad. En estos momentos, la determinación de la carcinogenicidad química depende del ensayo vitalicio de al menos dos especies, los dos sexos, a varias dosis y con minuciosos análisis histopatológicos de múltiples órganos, así como de la detección de cambios preneoplásicos en las células y órganos diana. En los Estados Unidos se estima que el coste de un bioensayo de carcinogenicidad es de más de tres millones de dólares (en dólares de 1995).

Aun cuando los recursos financieros fueran ilimitados, no habría suficientes toxicólogos formados para someter a ensayos a las aproximadamente 70.000 sustancias químicas que se producen hoy en el mundo. Se necesitarían siglos para realizar siquiera una evaluación de primer nivel de esas sustancias (NRC 1984). En muchos países ha aumentado la preocupación ética por el uso de animales en los ensayos de toxicidad, lo que ha supuesto una presión adicional sobre el uso de los métodos habituales. El análisis SAR se ha utilizado mucho en el sector farmacéutico para identificar moléculas que puedan utilizarse provechosamente en los tratamientos (Hansch y Zhang 1993). En la política ambiental y de salud en el trabajo, el análisis SAR se utiliza para predecir la dispersión de compuestos en el medio fisicoquímico y para detectar las nuevas sustancias químicas cuya toxicidad potencial debe evaluarse más a fondo. Con arreglo a la Ley de control de las sustancias tóxicas (TSCA) de los Estados Unidos, la EPA viene utilizando desde 1979 un enfoque SAR para hacer una "primera selección" de las nuevas sustancias en el proceso de notificación previa a la fabricación (PMN); en Australia se utiliza un enfoque similar como parte de su procedimiento de notificación de nuevas sustancias químicas (NICNAS). En los Estados Unidos el análisis SAR es una base importante a la hora de determinar si hay razones suficientes para concluir que la manufactura, elaboración, distribución, uso o eliminación de una sustancia va a presentar un riesgo no razonable de daño para la salud humana o el medio ambiente, tal como dispone la sección 5 f) de la TSCA. Sobre la base del resultado de ese análisis, la EPA puede exigir después que se realicen ensayos reales de la sustancia conforme a la sección 6 de la TSCA.

Fundamento del análisis SAR

El fundamento científico del análisis SAR se basa en la hipótesis de que la estructura molecular de una sustancia química puede predecir importantes aspectos de su comportamiento en los sistemas fisicoquímicos y biológicos (Hansch y Leo 1979).

Proceso del análisis SAR

El proceso del análisis SAR comprende la identificación de la estructura química, con inclusión tanto de formulaciones empíricas como del compuesto puro; la identificación de sustancias de estructura análoga; la localización de bases de datos y bibliografía para obtener información sobre sus análogos estructurales, y el análisis de toxicidad y otros datos sobre esos análogos. En algunos casos, poco frecuentes, puede bastar la información sobre la estructura del compuesto para apoyar un análisis SAR, a partir de mecanismos de toxicidad muy conocidos. Se han compilado varias bases de datos sobre el análisis SAR, así como métodos informatizados para la predicción de la estructura molecular.

A partir de esa información, con el análisis SAR se pueden estimar los siguientes parámetros:

- parámetros fisicoquímicos: punto de ebullición, presión de vapor, hidrosolubilidad, coeficiente de partición octanol/agua
- parámetros de destino biológico/ambiental: biodegradación, absorción por el suelo, fotodegradación, farmacocinética
- parámetros de toxicidad: toxicidad en organismos acuáticos, absorción, toxicidad aguda en mamíferos (ensayo límite o DL_{50}), irritación cutánea, pulmonar y ocular, sensibilización, toxicidad subcrónica, mutagenicidad.

Hay que señalar que no existen métodos de análisis SAR aplicables a parámetros tan importantes para la salud como la carcinogenicidad, la toxicidad del desarrollo, la toxicidad en reproducción, la neurotoxicidad, la immunotoxicidad u otros efectos en los órganos diana. Ello se debe a tres razones: la ausencia de una base de datos amplia en la que probar las hipótesis SAR, la falta de conocimientos sobre los determinantes estructurales de la acción tóxica, y la multiplicidad de células diana y mecanismos que intervienen en esos parámetros (véase "El enfoque estadounidense de la evaluación del riesgo de los tóxicos en la reproducción y agentes neurotóxicos"). Se han hecho algunos intentos limitados de utilizar el análisis SAR para predecir la farmacocinética utilizando información sobre los coeficientes de partición y la solubilidad (Johanson y Naslund 1988). Se han realizado análisis SAR cuantitativos más amplios para predecir el metabolismo P450-dependiente de una serie de

Tabla 33.10 • Comparación entre predicciones SAR y datos de ensayos: análisis de la OCDE y el NTP.

Parámetro	Concordancia (%)	Discordancia (%)	Número
Punto de ebullición	50	50	30
Presión de vapor	63	37	113
Hidrosolubilidad	68	32	133
Coeficiente de partición	61	39	82
Biodegradación	93	7	107
Toxicidad en peces	77	22	130
Toxicidad en dafnia	67	33	127
Toxicidad aguda en mamíferos (DL_{50})	80	20 ¹	142
Irritación cutánea	82	18	144
Irritación ocular	78	22	144
Sensibilización cutánea	84	16	144
Toxicidad subcrónica	57	32	143
Mutagenicidad ²	88	12	139
Mutagenicidad ³	82–94 ⁴	1–10	301
Carcinogenicidad ³ :	72–95 ⁴	—	301
Bioensayo de dos años			

Fuente: Datos de la OCDE: comunicación personal de C. Auer, EPA, Estados Unidos. Sólo se utilizaron en este análisis parámetros sobre los que se disponía de predicciones SAR y datos de ensayos reales comparables. Datos del NTP: tomados de Ashby y Tennant 1991.

¹ Un problema fue que con el método SAR no se pudo predecir la toxicidad aguda en el 12% de las sustancias ensayadas.

² Datos de la OCDE, basados en la concordancia entre el ensayo de Ames y el análisis SAR.

³ Datos del NTP, basados en ensayos de genotoxicidad comparados con predicciones SAR en varias clases de "sustancias estructuralmente alarmantes".

⁴ La concordancia variaba según las clases; la mayor se daba en los compuestos aromáticos amino/nitro, y la menor en las estructuras "míscláneas".

compuestos y la unión de moléculas del tipo de la dioxina y los PCB al receptor “de dioxina” citosólico (Hansch y Zhang 1993).

Como se indica en la Tabla 33.10, se ha comprobado que los análisis SAR tienen una predecibilidad variable respecto de algunos de los parámetros antes señalados. En esa tabla se presentan datos de dos comparaciones de la actividad predicha con los resultados reales obtenidos por medición empírica o ensayos de toxicidad. Los análisis SAR realizados por expertos de la EPA de los Estados Unidos funcionaron peor en la predicción de las propiedades fisicoquímicas que en la de la actividad biológica, incluida la biodegradación. Respecto de los parámetros de toxicidad, donde mejor funcionaron los análisis SAR fue en la predicción de la mutagenicidad. Ashby y Tennant (1991) comprobaron también una buena capacidad de predicción de la genotoxicidad a corto plazo en su análisis de sustancias químicas del Programa Nacional de Toxicología (NTP) de los Estados Unidos. Ello no es de extrañar si tenemos en cuenta lo que hoy se sabe de los mecanismos moleculares de la genotoxicidad (véase “Toxicología genética”) y del papel de la electrofilia en la unión al ADN. En cambio, los análisis SAR tendían a infrapredicir la toxicidad sistémica y subcrónica en los mamíferos y a sobrepredecir la toxicidad aguda en organismos acuáticos.

En el caso de otros parámetros de la toxicidad, como se ha señalado antes, la utilidad de los análisis SAR es menos demostrable. Las predicciones en mamíferos se ven complicadas por la falta de análisis SAR aplicables a la toxicocinética de moléculas complejas. No obstante, se han hecho algunos intentos de proponer principios SAR aplicables a parámetros complejos de la toxicidad en mamíferos (por ejemplo, véase en Bernstein (1984) un análisis SAR de tóxicos en reproducción potenciales en el varón). En la mayoría de los casos, la base de datos no es lo bastante amplia para probar rigurosamente las predicciones basadas en la estructura.

Por el momento cabe concluir que el análisis SAR puede ser útil sobre todo para establecer prioridades en la inversión de recursos en ensayos de toxicidad y para llamar la atención sobre peligros potenciales en una fase temprana. Sólo en el caso de la mutagenicidad es probable que el análisis SAR como tal pueda utilizarse de manera fiable como información en la que basar otras decisiones. Probablemente no hay ningún punto final de la toxicidad en el que el análisis SAR pueda ofrecer el tipo de información cuantitativa que, como se indica en otras partes de este capítulo y de la Enciclopedia, se necesita para evaluar el riesgo.

TOXICOLOGIA REGULADORA

● LA TOXICOLOGIA EN LA REGULACION DE LA SALUD Y LA SEGURIDAD

Ellen K. Silbergeld

La toxicología desempeña un papel importante en la elaboración de normas y otras medidas de salud profesional. Las decisiones encaminadas a prevenir las lesiones y enfermedades profesionales se están basando cada vez más en información obtenible antes o en ausencia de los tipos de exposiciones humanas que proporcionarían datos definitivos sobre el riesgo, como por ejemplo los derivados de estudios epidemiológicos. Además, y tal como se ha señalado en este capítulo, los estudios toxicológicos pueden proporcionar una información precisa sobre la dosis y la respuesta en las condiciones controladas de la investigación de laboratorio, información que suele ser difícil de obtener en el contexto no controlado de las exposiciones profesionales. No obstante, esa información ha de evaluarse cuidadosamente para estimar la probabilidad de efectos adversos en los humanos, la naturaleza de esos efectos adversos y la relación cuantitativa entre las exposiciones y los efectos.

En muchos países se viene prestando una considerable atención, desde el decenio de 1980, a la elaboración de métodos objetivos para utilizar la información toxicológica en la adopción de decisiones de regulación. Tanto instancias gubernamentales como no gubernamentales han propuesto y utilizado en esos países unos métodos formalizados que suelen denominarse *evaluación del riesgo*. La evaluación del riesgo se ha definido de diversas maneras; básicamente es un proceso de evaluación en el que se maneja información toxicológica, epidemiológica y sobre la exposición y que trata de identificar y estimar la probabilidad de que se produzcan efectos adversos asociados a exposiciones a sustancias o condiciones peligrosas. La evaluación del riesgo puede ser cualitativa, en cuyo caso indica la naturaleza de un efecto adverso y una estimación general de su probabilidad, o puede ser también cuantitativa, con estimaciones del número de personas afectadas a determinados niveles de exposición. En muchos sistemas de regulación, la evaluación del riesgo se

realiza en cuatro fases: *identificación del peligro*, que es la descripción de la naturaleza del efecto tóxico; *evaluación de la relación dosis-respuesta*, que es un análisis semicuantitativo o cuantitativo de la relación entre la exposición (o dosis) y la gravedad o probabilidad del efecto tóxico; *evaluación de la exposición*, en la que se evalúan los datos sobre el intervalo de exposiciones que probablemente van a sufrir poblaciones en su conjunto o subgrupos de ellas, y *caracterización del riesgo*, que es la compilación de toda la información anterior para obtener una magnitud del riesgo que cabe esperar en determinadas condiciones de exposición (sobre estos principios, véase NRC 1983).

En esta sección se presentan a manera de ejemplo tres enfoques de la evaluación del riesgo.

Es imposible ofrecer un compendio completo de los métodos de evaluación del riesgo que se utilizan en el mundo, y los casos que se han elegido no deben tomarse como modelos. Hay que señalar que se está tendiendo a armonizar los métodos de evaluación del riesgo, en parte para responder a disposiciones incluidas en los recientes acuerdos del GATT. En estos momentos están en curso dos procesos de armonización internacional de los métodos de evaluación del riesgo: en el Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS) y en la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Estas organizaciones mantienen también información actualizada sobre los enfoques nacionales de la evaluación del riesgo.

● PRINCIPIOS DE LA IDENTIFICACION DE LOS PELIGROS: EL ENFOQUE JAPONES

Masayuki Ikeda

Como en muchos otros países, el riesgo debido a exposición a sustancias químicas está regulado en el Japón con arreglo a varias categorías de sustancias (véase la Tabla 33.11). Se ocupan de la cuestión distintos ministerios u organismos gubernamentales. En el caso de las sustancias químicas industriales en general, la

Tabla 33.11 • Regulación legal de las sustancias químicas, Japón.

Categoría	Ley	Ministerio
Alimentos y aditivos alimentarios	Ley de higiene de los alimentos	MHW
Productos farmacéuticos	Ley de productos farmacéuticos	MHW
Estupefacientes	Ley de control de los estupefacientes	MHW
Sustancias químicas agrícolas	Ley de control de las sustancias químicas agrícolas	MAFF
Sustancias químicas industriales	Ley de control de las sustancias químicas	MHW & MITI
Todas las sustancias químicas excepto las radiactivas	Ley de regulación de los productos domésticos que contienen sustancias peligrosas Ley de control de las sustancias tóxicas y nocivas	MHW
	Ley de seguridad e higiene en el trabajo	MOL
Sustancias radiactivas	Ley de sustancias radiactivas	STA

Abreviaturas: MHW: Ministerio de Sanidad y Bienestar; MAFF: Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca; MITI: Ministerio de Comercio Internacional e Industria; MOL: Ministerio de Trabajo; STA: Agencia de Ciencia y Tecnología.

normativa principal es la Ley sobre el Examen y la Regulación de Productos Fabricados, etc. de las sustancias químicas, abreviada como Ley de Control de las Sustancias Químicas (CSCL). Los organismos responsables son el Ministerio de Comercio Internacional e Industria y el Ministerio de Sanidad y Bienestar. Además, la Ley de Seguridad e Higiene en el Trabajo (del Ministerio de Trabajo) estipula que las sustancias químicas industriales han de pasar un examen de mutagenicidad y que, si se comprueba que una sustancia es mutágena, la exposición de los trabajadores a ella debe reducirse al mínimo aislando las instalaciones de producción, instalando sistemas locales de aspiración de gases, utilizando equipo de protección, etc.

Como las sustancias químicas industriales peligrosas se identifican básicamente con arreglo a la CSCL, en esta sección se describirá el marco de los ensayos de identificación de los peligros que se prescribe en dicha ley.

El concepto de la Ley de Control de las Sustancias químicas

La CSCL original fue aprobada por la Dieta (parlamento del Japón) en 1973 y entró en vigor el 16 de abril de 1974. Obedecía básicamente al deseo de prevenir la contaminación ambiental y los consiguientes efectos sobre la salud humana debidos a los PCB y sustancias análogas. Los PCB se caracterizan por 1) su persistencia en el medio ambiente (son escasamente biodegradables), 2) su creciente concentración a medida que se asciende por la cadena alimentaria (bioacumulación) y 3) su toxicidad crónica en los humanos. En consecuencia, la ley obligaba a examinar desde el punto de vista de esas características toda sustancia química industrial antes de su comercialización en el país. En paralelo con la aprobación de la ley, la Dieta decidió encargar a la Agencia de Medio Ambiente la vigilancia del medio ambiente general para determinar la posible existencia de contaminación química. La Dieta modificó después la ley en 1986 (entrada en vigor en 1987) para armonizarla con las actividades de la OCDE en materia de salud y medio ambiente, con la reducción de las barreras no arancelarias en el comercio internacional y sobre todo con el establecimiento de un conjunto de datos mínimo previo a la comercialización (MPD) y directrices sobre los ensayos anexos. Con la modificación de la ley se quería reflejar también

un hecho que se había observado por entonces gracias a la vigilancia del medio ambiente: que sustancias como el tricloroetileno y el tetracloroetileno, que no tienen mucha capacidad de bioacumulación aunque son escasamente biodegradables y provocan toxicidad crónica, pueden contaminar el medio ambiente. Esas sustancias se detectaron en las aguas subterráneas de todo el país.

La ley clasifica las sustancias químicas industriales en dos categorías: sustancias existentes y sustancias nuevas. Las sustancias existentes son las que figuran en el "Inventario de Sustancias Químicas Existentes" (que se estableció al aprobar la ley original) y que ascienden a alrededor de 20.000, aunque la cifra depende de la denominación que tienen algunas sustancias en él. Las sustancias no incluidas en el Inventario se denominan "sustancias químicas nuevas". El Gobierno es responsable de la identificación del peligro que comportan las sustancias existentes, mientras que la empresa u otra entidad que deseé introducir una nueva sustancia en el mercado japonés es responsable de la identificación del peligro de dicha sustancia. Se encargan de la aplicación de la ley dos ministerios gubernamentales: el Ministerio de Sanidad y Bienestar (MHW) y el Ministerio de Comercio Internacional e Industria (MITI), y la Agencia de Medio Ambiente puede expresar su opinión en caso necesario. Se excluyen, por estar reguladas por otras leyes, las sustancias radiactivas y determinadas sustancias tóxicas, estimulantes y narcóticas.

Sistema de ensayos estipulado en la CSCL

En la Figura 33.15 se presenta un diagrama del procedimiento de examen, que en principio es un sistema basado en varias fases. Todas las sustancias (véase más adelante la cuestión de las excepciones) deben someterse a un examen de biodegradabilidad *in vitro*. Si la sustancia es fácilmente biodegradable, se considera "segura". De lo contrario, se la somete a un examen de bioacumulación. Si se comprueba que posee "gran capacidad de acumulación", se solicitan datos de toxicidad completos sobre la base de los cuales la sustancia se clasifica como "sustancia química especificada de la clase 1", cuando se confirma su toxicidad, o sustancia "segura" en caso contrario. La sustancia que presenta una acumulación baja o nula se somete a ensayos de detección de toxicidad, que consisten en pruebas de mutagenicidad y en la administración de dosis repetidas durante 28 días a animales de experimentación (véanse detalles en la Tabla 33.12). Tras una evaluación completa de los datos de toxicidad, la sustancia se clasifica como "sustancia química designada" si los

Tabla 33.12 • Parámetros de ensayo según la Ley de control de las sustancias químicas, Japón.

Parámetro	Diseño del ensayo
Biodegradación	Durante 2 semanas en principio, <i>in vitro</i> , con lodo activado
Bioacumulación	Durante 8 semanas en principio, con carpas
Detección selectiva de la toxicidad	
Ensayos de mutagenicidad	
Sistema bacteriano	Ensayo de Ames y ensayo con <i>E. coli</i> , ± mezcla S9
Aberraciones cromosómicas	células CHL, etc., ± mezcla S9
Administración de dosis repetida durante 28 días	Ratas, 3 niveles de dosis más control de NOEL, 2 semanas de ensayo de recuperación al nivel de dosis más alto

Figura 33.15 • Diagrama del examen.

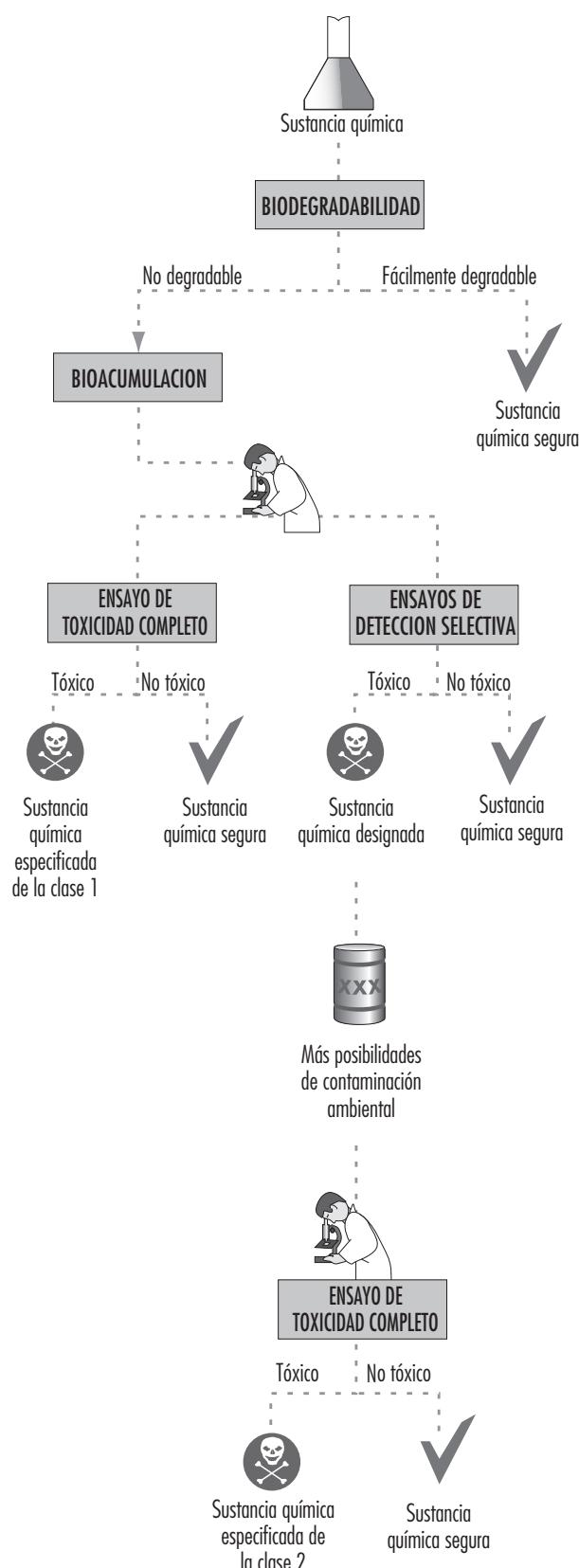


Tabla 33.13 • Características y regulación de las sustancias químicas clasificadas conforme a la Ley de control de las sustancias químicas, Japón.

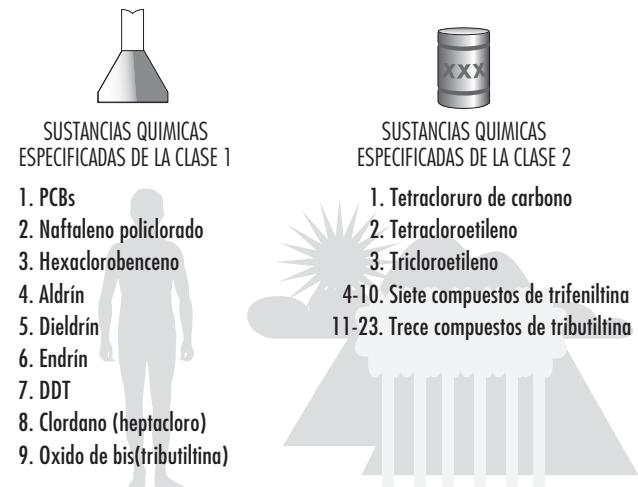
Sustancia química	Características	Regulación
Sustancias químicas específicas de la Clase 1	No biodegradables Muy bioacumulables Toxicidad crónica	Necesaria autorización para fabricar o importar ¹ Uso restringido
Sustancias químicas designadas	No biodegradables Nada o poco bioacumulables Toxicidad crónica Sospecha de contaminación ambiental	Notificación de la cantidad que se va a fabricar o importar Directrices técnicas para prevenir la contaminación/los efectos sobre la salud
Sustancias químicas designadas	No biodegradables Nada o poco bioacumulables Sospecha de toxicidad crónica	Notificación de la cantidad de fabricación o importación Estudio y revisión de la bibliografía

¹ En la práctica no se autorizan.

datos indican toxicidad. Si no, se considera “segura”. Cuando otros datos sugieren que hay muchas posibilidades de que esa sustancia contamine el medio ambiente, se piden datos de toxicidad completos a partir de los cuales, si son positivos, la sustancia designada se reclasifica como “sustancia química especificada de la clase 2”. Si los datos son negativos, se considera “segura”. Las características toxicológicas y ecotoxicológicas de las sustancias químicas especificadas de la clase 1 y de la clase 2 y de las sustancias designadas figuran en la Tabla 33.13 junto con una breve indicación de las medidas reguladoras.

No es necesario someter a ensayo a nuevas sustancias químicas de las que se va a utilizar una cantidad limitada (menos de 1.000 kg/empresa/año y menos de 1.000 kg/año en todo el país). Los polímeros se examinan conforme al diagrama de compuestos de alto peso molecular, que se establece sobre la hipótesis de que cuando la sustancia tiene un peso molecular

Figura 33.16 • Sustancias químicas especificadas y designadas conforme a la Ley de control de las sustancias químicas, Japón.



superior a 1.000 y es estable en el medio ambiente las posibilidades de que se absorba en el cuerpo son remotas.

Resultados de la clasificación de sustancias químicas industriales a finales de 1996

En los 26 años transcurridos desde que la CSCL entró en vigor, en 1973, hasta finales de 1996, se examinaron 1.087 productos químicos existentes conforme a las versiones original y modificada de la ley. De esos 1.087, nueve (algunos se identifican por nombres genéricos) se clasificaron como "sustancias químicas especificadas de la clase 1". De los demás, 36 se clasificaron como "sustancias designadas", 23 de las cuales se reclasificaron como "sustancias químicas especificadas de la clase 2" y otras 13 siguieron siendo "designadas". En la Figura 33.16 se indican los nombres de las sustancias químicas especificadas de ambas clases. Se puede comprobar inmediatamente en la lista que las sustancias de la clase 1 son en su mayoría plaguicidas organoclorados además de los PCB y sus productos sustitutivos, salvo un herbicida. Las sustancias de la clase 2 son en su mayoría herbicidas, más tres disolventes a base de hidrocarburos clorados que se utilizaron mucho en el pasado.

En ese mismo período, desde 1973 hasta fines de 1996, se solicitó la aprobación de unas 2.335 sustancias químicas nuevas, de las que 221 (alrededor del 9,5 %) se clasificaron como "designadas", pero no se clasificó ninguna como perteneciente a la clase 1 ni a la clase 2. Las demás se consideraron "seguras" y se aprobó su fabricación o importación.

● EL ENFOQUE ESTADOUNIDENSE DE LA EVALUACION DEL RIESGO DE LOS TOXICOS PARA LA REPRODUCCION Y AGENTES NEUROTOXICOS

Ellen K. Silbergeld

La neurotoxicidad y la toxicidad en la reproducción son importantes esferas de la evaluación del riesgo, pues los sistemas nervioso y reproductor son muy sensibles a los efectos de los xenobióticos. Se han identificado muchos agentes como tóxicos para estos sistemas en los humanos (Barlow y Sullivan 1982; OTA 1990). Hay muchos plaguicidas que están diseñados deliberadamente para que trastornen la función reproductora y neurológica en los organismos diana, como los insectos, interfiriendo la bioquímica hormonal y la neurotransmisión.

Es difícil identificar sustancias potencialmente tóxicas para estos sistemas, y ello por tres razones interrelacionadas: en primer lugar, son unos de los sistemas biológicos humanos más complejos, y en general se reconoce que los modelos animales de la función reproductora y neurológica son insuficientes para representar hechos tan críticos como la cognición o las primeras fases del desarrollo embrionario; en segundo lugar, no existen ensayos sencillos para identificar las sustancias que son potencialmente tóxicas para estos sistemas, y, en tercer lugar, estos sistemas contienen múltiples tipos de células y órganos, de manera que no se puede utilizar un solo grupo de mecanismos de toxicidad para inferir relaciones dosis-respuesta o predecir relaciones estructura-actividad (SAR). Además, se sabe que la sensibilidad tanto del sistema nervioso como del reproductor varía con la edad, y que en períodos críticos la exposición puede tener efectos mucho más graves que en otros momentos.

Evaluación del riesgo de neurotoxicidad

La neurotoxicidad es un importante problema de salud pública. Como se indica en la Tabla 33.14, ha habido varios episodios de neurotoxicidad humana en los que se han visto afectados miles de trabajadores y otros grupos de la población expuestos por liberación de productos industriales, alimentos o bebidas contaminados y otros vectores. La exposición profesional a neurotoxinas como el plomo, el mercurio, los insecticidas organofosforados y los disolventes clorados está muy extendida por todo el mundo (OTA 1990; Johnson 1978).

Las sustancias químicas pueden afectar al sistema nervioso actuando sobre cualquiera de las diversas dianas celulares o diversos procesos bioquímicos del sistema nervioso central o periférico. Los efectos tóxicos sobre otros órganos pueden afectar también al sistema nervioso, como en el caso de la encefalopatía hepática. Entre las manifestaciones de la neurotoxicidad cabe citar efectos sobre el aprendizaje (memoria, conocimiento, rendimiento intelectual...), los procesos somatosensoriales (sensación, percepción...), la función motora (equilibrio, marcha, control de movimientos adecuados...), la vida afectiva (personalidad, emociones...) y la función autónoma (control nervioso de la función endocrina y de los sistemas orgánicos internos). Los efectos tóxicos sobre el sistema nervioso suelen tener distinta sensibilidad y expresión en las diversas fases de la vida: durante el desarrollo, el sistema nervioso central puede ser especialmente susceptible a la agresión tóxica debido al amplio proceso de diferenciación celular, migración y contacto célula-célula que se produce en los humanos en ese período (OTA 1990). Además, el daño citotóxico al sistema nervioso puede ser irreversible porque después de la embriogénesis ya no hay reposición de neuronas. Aunque el sistema nervioso central (SNC) está en cierto modo protegido del contacto con los compuestos que se absorben gracias a un sistema de células muy tupido (la barrera hematoencefálica, integrada por células endoteliales de los capilares que revisten los vasos del cerebro), las sustancias tóxicas pueden conseguir entrar en él por tres mecanismos: los disolventes y compuestos lipófilos pueden atravesar la membrana celular; algunos compuestos pueden unirse a proteínas transportadoras endógenas cuya función es aportar nutrientes y biomoléculas al SNC, y proteínas pequeñas que si se inhalan pueden ser captadas directamente por el nervio olfativo y transportadas al cerebro.

Autoridades reguladoras de los Estados Unidos

En los Estados Unidos, la facultad de regular las sustancias desde el punto de vista de la neurotoxicidad está asignada legalmente a cuatro organismos: la Food and Drug Administration (FDA), la Environment Protection Agency (EPA), la Occupational Safety & Hygiene Administration (OSHA) y la Consumer Products Safety Commission (CPSC). Mientras la OSHA regula generalmente las exposiciones profesionales a las sustancias químicas neurotóxicas (y otras), la EPA está facultada para regular las exposiciones profesionales y no profesionales a los plaguicidas con arreglo a la Ley federal sobre insecticidas, fungicidas y rodenticidas (FIFRA). La EPA regula también las sustancias nuevas antes de su fabricación y comercialización, lo que la obliga a examinar tanto los riesgos profesionales como los no profesionales.

Identificación de los peligros

Se definen como peligros neurotóxicos los agentes que afectan negativamente a la fisiología, bioquímica o integridad estructural del sistema nervioso o de una función del sistema nervioso que se expresa en el comportamiento (EPA 1993). La determinación de la neurotoxicidad intrínseca es un proceso difícil debido a la complejidad del sistema nervioso y a las múltiples formas en que aquella se expresa. Algunos efectos pueden tardar en

Tabla 33.14 • Casos importantes de neurotoxicidad.

Año(s)	Lugar	Sustancia	Comentarios
400 a.C.	Roma	Plomo	Hipócrates comprueba la toxicidad del plomo en los mineros.
dec. 1930	Estados Unidos (Sudeste)	TOCP	Un compuesto que se suele añadir a los aceites lubricantes contamina la bebida alcohólica "Ginger Jake"; de 20.000 a 100.000 afectados, más de 5.000 de ellos por parálisis.
dec. 1930	Europa	Apiol (con TOCP)	Un fármaco abortivo que contiene TOCP provoca 60 casos de neuropatía.
1932	Estados Unidos (California)	Talio	Roban y utilizan para hacer tortas cebada rociada con sulfato de talio, empleado como rodenticida; 13 miembros de una familia hospitalizados con síntomas neurológicos; seis muertos.
1937	Sudáfrica	TOCP	60 sudafricanos afectados por parálisis tras emplear un aceite de cocina contaminado.
1946	—	Tetraetilplomo	Más de 25 personas padecen trastornos neurológicos tras limpiar unos depósitos de gasolina.
dec. 1950	Japón (Minimata)	Mercurio	Centenares de personas consumen pescado y marisco contaminados con mercurio procedente de una fábrica de productos químicos; 121 intoxicados, 46 muertos, muchos recién nacidos con grave daño neurológico.
dec. 1950	Francia	Organotina	La contaminación de Stallinon con trietilestoño produce más de 100 muertos.
dec. 1950	Marruecos	Manganoso	150 mineros padecen intoxicación crónica por manganeso, con graves problemas neurológicos y de conducta.
dec. 1950- dec. 1970	Estados Unidos	AETT	Se comprueba que un componente de perfumes es neurotóxico; se retira del mercado en 1978; se desconocen sus efectos sobre la salud humana.
1956	—	Endrín	49 personas enferman tras consumir productos de panadería preparados con harina contaminada con el insecticida endrín; algunos casos de convulsiones.
1956	Turquía	HCB	De 3.000 a 4.000 personas se intoxican con hexaclorobenceno, fungicida para grano; tasa de mortalidad del 10 por ciento.
1956-1977	Japón	Clioquinol	Se comprueba que un fármaco para la diarrea del viajero causa neuropatía; hasta 10.000 afectados a lo largo de dos decenios.
1959	Marruecos	TOCP	Unos 10.000 afectados por consumir aceite de cocina contaminado con aceite lubricante.
1960	Iraq	Mercurio	Pan contaminado con el mercurio que se emplea como fungicida para el grano; más de 1.000 afectados.
1964	Japón	Mercurio	646 afectados por metilmercurio.
1968	Japón	PCB	Aceite de arroz contaminado con bifenilos policlorados; 1.665 afectados.
1969	Japón	n-Hexano	93 casos de neuropatía tras exposición a n-hexano, empleado en la fabricación de sandalias de vinilo.
1971	Estados Unidos	Hexaclorofeno	Tras años de bañar a los bebés en agua con un 3 por ciento de hexaclorofeno se comprueba que este desinfectante es tóxico para el sistema nervioso y otros sistemas.
1971	Iraq	Mercurio	Pan contaminado con el mercurio que se emplea como fungicida para el grano; más de 5.000 intoxicados graves, 450 muertos en hospitales; sin documentar los efectos en muchos bebés expuestos prenatalmente.
1973	Estados Unidos (Ohio)	MIBK	Trabajadores de una fábrica de textiles expuestos al disolvente; más de 80 con neuropatía, 180 con efectos menos graves.
1974-1975	Estados Unidos (Hopewell, VA)	Clordecone (Kepone)	Trabajadores de una fábrica de productos químicos expuestos al insecticida; más de 20 con graves problemas neurológicos, más de 40 con efectos menos graves.
1976	Estados Unidos (Texas)	Leptophos (Phosvel)	Al menos nueve trabajadores padecen graves problemas neurológicos tras exposición al insecticida durante el proceso de fabricación.
1977	Estados Unidos (California)	Dicloropropeno (Telone II)	24 personas hospitalizadas tras exposición al plaguicida Telone después de un accidente de tráfico.
1979-1980	Estados Unidos (Lancaster, TX)	BHMH (Lucel-7)	Siete trabajadores de una fábrica de bañeras de plástico padecen graves problemas neurológicos tras exposición a BHMH.
dec. 1980	Estados Unidos	MPTP	Se comprueba que la falta de pureza en la síntesis de drogas ilegales provoca síntomas idénticos a los de la enfermedad de Parkinson.
1981	España	Aceite tóxico contaminado	20.000 personas afectadas por una sustancia tóxica en el aceite, con más de 500 muertos; numerosos casos de neuropatía grave.
1985	Estados Unidos y Canadá	Aldicarb	En California y otros estados del oeste y en British Columbia, más de 1.000 personas padecen problemas neuromusculares y cardíacos tras consumir melones contaminados con este plaguicida.
1987	Canadá	Ácido domoico	129 afectados y dos muertos por consumir mejillones contaminados con ácido domoico; síntomas como pérdida de memoria, desorientación y ataques.

Fuente: OTA 1990.

manifestarse, como la neurotoxicidad retardada de determinados insecticidas organofosforados. La determinación del peligro neurotóxico, incluida la consideración de las condiciones de exposición, dosis, duración y período en que se produce, exige por tanto prudencia y buen juicio.

La identificación de los peligros suele basarse en estudios toxicológicos de organismos intactos, en los que se valoran las funciones de comportamiento, cognoscitivas, motoras y somatosensoriales mediante diversos instrumentos de investigación que tienen en cuenta la bioquímica, la electrofisiología y la morfología (Tilson y Cabe 1978; Spencer y Schaumberg 1980). Difícilmente podría exagerarse la importancia que tiene la cuidadosa observación del comportamiento del organismo en su conjunto. La identificación de los peligros exige también que se evalúe la toxicidad en diferentes fases del desarrollo, desde las más tempranas (período intrauterino y primer período neonatal) hasta la senectud. En los humanos, la identificación de la neurotoxicidad comprende la evaluación clínica, con métodos de valoración neurológica, de aspectos como la función motora, fluidez del habla, reflejos, función sensorial, electrofisiología, ensayos neuropsicológicos y, en algunos casos, técnicas avanzadas de elaboración de imágenes cerebrales y electroencefalografía cuantitativa. La OMS ha desarrollado y validado una batería de pruebas esenciales de neurocomportamiento (NCTB), que contiene pruebas de la función motora, coordinación mano-ojo, tiempo de reacción, memoria inmediata, atención y estado de ánimo. Esta batería ha sido validada internacionalmente mediante un proceso coordinado (Johnson 1978).

También en la identificación de los peligros mediante el empleo de animales es esencial adoptar unos métodos de observación cuidadosos. La EPA de los Estados Unidos ha elaborado

una batería de pruebas de observación funcional como ensayos de primer nivel para detectar y cuantificar los principales efectos neurotóxicos (Moser 1990). Este enfoque está presente también en los métodos de ensayo de toxicidad subcrónica y crónica de la OCDE. En una batería típica se determinan los parámetros siguientes: postura, marcha, movilidad, estimulación general y reactividad, y presencia o ausencia de temblor, convulsiones, lacrimeo, piloerección, salivación, micción o defecación excesivas, estereotipia, movimientos en círculo u otros comportamientos extraños. Entre los comportamientos que se provocan figuran la respuesta a manipulaciones, pinchazos en la cola o pequeños ruidos; el equilibrio y el reflejo de enderezamiento y la fuerza de agarre de los miembros traseros. En la Tabla 33.15 figuran algunos ensayos representativos y los agentes que se identifican con ellos.

A estos ensayos pueden seguir evaluaciones más complejas, que por lo general se realizan más en los estudios mecanicistas que en el contexto de la identificación de los peligros. Los métodos *in vitro* de identificación de los peligros de neurotoxicidad son limitados, pues no proporcionan indicaciones de los efectos sobre funciones complejas, como el aprendizaje, pero pueden ser muy útiles para definir las dianas de la toxicidad y mejorar la precisión de los estudios de dosis-respuesta en esos lugares (en OMS 1986 y EPA 1993 se analizan con detalle los principios y métodos de la identificación de neurotóxicos potenciales).

Evaluación de la relación dosis-respuesta

Como se ha estudiado en una sección anterior, la determinación de la relación entre la toxicidad y la dosis puede basarse en datos humanos cuando se dispone de ellos o en ensayos con animales.

Tabla 33.15 • Ejemplos de ensayos especializados para medir la neurotoxicidad.

Función	Procedimiento	Agentes representativos
Neuromuscular		
Debilidad	Fuerza de agarre; resistencia en natación; suspensión de barra; función motora discriminativa; extensión de miembros posteriores	n-Hexano, metilbutilcetona, carbarilo
Descoordinación	Barra giratoria, mediciones de la marcha	3-Acetylpiridina, etanol
Tremor	Escala de clasificación, análisis espectral	Clordecone, piretroides de tipo I, DDT
Mioclonia, espasmos	Escala de clasificación, análisis espectral	DDT, piretroides de tipo II
Sensorial		
Toxicidad auditiva	Condicionamiento discriminante, modificación de reflejos	Tolueno, trimetilestaño
Toxicidad visual	Condicionamiento discriminante	Metilmercurio
Toxicidad somatosensorial	Condicionamiento discriminante	Acrilamida
Sensibilidad al dolor	Condicionamiento discriminante ("btration"); batería de observaciones funcionales	Paratón
Toxicidad olfativa	Condicionamiento discriminante	Metilbromuro de 3-metilindol
Aprendizaje, memoria		
Habitación	Reflejo de sobresalto	Diisopropilfluorofosfato (DFP)
Condicionamiento clásico	Membrana nictitante, aversión condicionada a sabores, evitación pasiva, condicionamiento olfativo	Aluminio, carbaril, trimetilestaño, IDPN, (neonatal)
Condicionamiento operativo o instrumental	Evitación en un sentido, evitación negativa en dos sentidos, evitación en laberinto y laberinto de agua Biol, laberinto de agua Morris, laberinto de brazos radiales, retraso en emparejamiento con la muestra, adquisición repetida, aprendizaje de discriminación visual	Clordecone, plomo (neonatal), hipervitaminosis A, estreno, DFP, trimetilestaño, carbaril, plomo

Fuente: EPA 1993.

En los Estados Unidos suele aplicarse a los neurotóxicos un enfoque basado en un factor de incertidumbre o seguridad. Para ello se determina primero el “nivel sin efecto adverso observable” (NOAEL) o el “nivel mínimo de efecto adverso observable” (LOAEL) y después se divide ese valor por factores de incertidumbre o seguridad (por lo general múltiples de 10) para tener en cuenta aspectos como la falta de datos, la sensibilidad potencialmente mayor de los humanos y la variabilidad de la respuesta humana debido a la edad u otros factores. La cifra resultante se denomina dosis de referencia (RfD) o concentración de referencia (RfC). Para determinar el LOAEL o el NOAEL suele utilizarse el efecto que se produce al nivel de dosis más bajo en la especie animal más sensible. La conversión de dosis animales a exposiciones humanas se realiza mediante métodos normalizados de dosimetría transespecie, teniendo en cuenta las diferencias en materia de duración de la vida y duración de la exposición.

Este enfoque basado en un factor de incertidumbre parte de que existe un umbral, es decir, una dosis por debajo de la cual la sustancia no induce efecto adverso alguno. A veces es difícil determinar experimentalmente los umbrales correspondientes a determinados neurotóxicos; en esos casos se establecen sobre la base de hipótesis acerca del mecanismo de acción de la sustancia, hipótesis que pueden ser válidas o no para todos los neurotóxicos (Silbergeld 1990).

Evaluación de la exposición

En esta fase se valora la información sobre fuentes, rutas, dosis y duraciones de la exposición al neurotóxico en poblaciones humanas, subpoblaciones o incluso individuos. Esta información puede obtenerse de la vigilancia del medio ambiental o de muestras humanas, o también mediante estimaciones basadas en hipótesis normalizadas (como condiciones del lugar de trabajo y descripciones de empleos) o modelos de destino y dispersión en el medio ambiente (véanse unas directrices generales sobre los métodos de evaluación de la exposición en EPA 1992). En algunos casos limitados pueden utilizarse marcadores biológicos para validar conclusiones y estimaciones de la exposición; no obstante, son relativamente pocos los biomarcadores de neurotóxicos que pueden utilizarse.

Caracterización del riesgo

Para caracterizar el riesgo se combinan la identificación de los peligros, la relación dosis-respuesta y la evaluación de la exposición. En este proceso se establecen hipótesis en materia de extrapolación de dosis altas a dosis bajas y de animales a humanos, así como sobre la validez de los umbrales que se manejan y el empleo de los factores de incertidumbre.

Toxicología en la reproducción: métodos de evaluación del riesgo

En el ámbito de la reproducción, los peligros pueden afectar a múltiples parámetros funcionales y dianas celulares del ser humano, con consecuencias para la salud del individuo afectado y de las generaciones futuras. Pueden afectar al desarrollo del sistema reproductor tanto masculino como femenino, los comportamientos reproductores, la función hormonal, el hipotálamo y la pituitaria, las gónadas y las células germinales, la fecundidad, el embarazo y la duración de la función reproductora (OTA 1985). Además, sustancias mutágenas pueden afectar también a la función reproductora dañando la integridad de las células germinales (Dixon 1985).

Se sabe muy poco de la naturaleza y el grado de los efectos adversos de las exposiciones químicas sobre la función reproductora de las poblaciones humanas. Se dispone de relativamente poca información de vigilancia sobre parámetros como la

fecundidad de hombres o mujeres, la edad de la menopausia en las mujeres o el recuento de espermatozoides en los hombres. Sin embargo, tanto hombres como mujeres trabajan en sectores industriales en los que pueden producirse exposiciones a sustancias peligrosas para su función reproductora (OTA 1985).

No vamos a recapitular en esta sección los elementos que son comunes a la evaluación del riesgo de los neurotóxicos y los tóxicos reproductores, sino que nos vamos a centrar en las cuestiones específicas de la evaluación del riesgo de los segundos. Como en el caso de los neurotóxicos, la legislación asigna la facultad de regular las sustancias químicas respecto de su toxicidad reproductora a la EPA, la OSHA, la FDA y la CPSC. De estos cuatro organismos, sólo la EPA tiene establecida una serie de directrices para la evaluación del riesgo de toxicidad en la reproducción. Además, el estado de California ha elaborado métodos al respecto en cumplimiento de una ley estatal, la conocida como Proposición 65 (Pease y cols. 1991).

Al igual que los neurotóxicos, los tóxicos en la reproducción pueden actuar afectando a varios órganos diana o lugares de acción molecular. Su evaluación presenta la complejidad adicional de tener que evaluar tres organismos distintos por separado y de manera conjunta: el hombre, la mujer y la descendencia (Mattison y Thomford 1989). Aunque un parámetro importante de la función reproductora es la generación de hijos sanos, la biología reproductora también tiene que ver con la salud de los organismos en las fases de desarrollo y madurez con independencia de su intervención en la procreación. Por ejemplo, la pérdida de la función ovulatoria por agotamiento natural o extracción quirúrgica de oocitos tiene efectos considerables sobre la salud de las mujeres, como cambios en la tensión arterial, el metabolismo de los lípidos y la fisiología del hueso. Las alteraciones en la bioquímica de las hormonas pueden afectar a la susceptibilidad al cáncer.

Identificación de los peligros

Un peligro en reproducción puede identificarse sobre la base de datos referidos a humanos o a animales. En general, los datos sobre humanos son relativamente escasos, debido a la necesidad de efectuar una vigilancia minuciosa para detectar las alteraciones en la función reproductora, como el recuento o la calidad de los espermatozoides, la frecuencia y duración del ciclo de ovulación o la edad de la pubertad. La detección de los peligros en reproducción mediante el acopio de información sobre tasas de fecundidad o datos sobre resultados de embarazos puede llevar a conclusiones erróneas por las medidas deliberadas de reducir la fecundidad que adoptan muchas parejas mediante métodos de planificación familiar. El seguimiento cuidadoso de determinadas poblaciones indica que las tasas de fracaso reproductor (aborts) pueden ser muy altas cuando se valoran biomarcadores tempranos del embarazo (Sweeney y cols. 1988).

Para identificar tóxicos en reproducción se suelen utilizar protocolos de ensayo con animales de experimentación. En la mayoría de esos sistemas, como los que han desarrollado en los Estados Unidos la FDA y la EPA e internacionalmente la OCDE en su programa de directrices para ensayos, los efectos de los agentes sospechosos se detectan examinando la fecundidad tras la exposición del macho y/o la hembra, observando los comportamientos sexuales en materia de apareamiento y realizando análisis histopatológicos de las gónadas y glándulas sexuales secundarias, como las glándulas mamarias (EPA 1994). En los estudios de toxicidad en la reproducción se suelen administrar a los animales dosis continuadas durante una o varias generaciones para detectar los efectos en el proceso reproductor integral así como los efectos en órganos reproductores específicos. Se recomiendan los estudios sobre varias generaciones, pues

permiten detectar efectos que pueden ser inducidos por la exposición durante el desarrollo del sistema reproductor en el útero. En Estados Unidos, el Programa Nacional de Toxicología (NTP) ha elaborado un protocolo de ensayos especiales, denominado Evaluación de la Reproducción mediante Cría Continua (RACB). Se obtienen con él datos sobre los cambios en el espacioamiento temporal de los embarazos (que reflejan la función ovulatoria), así como el número y tamaño de las camadas a lo largo de todo el período del ensayo. Cuando se examina todo el período vital de la hembra se puede obtener información sobre abortos tempranos. Para detectar cambios en la función reproductora del macho pueden añadirse a la RACB mediciones del esperma. Un ensayo especial para detectar las pérdidas antes o después de la implantación es el ensayo de factor letal dominante, con el que se detectan los efectos mutágenos en la espermatogénesis del macho.

Se han elaborado también ensayos *in vitro* para detectar la toxicidad en reproducción (y del desarrollo) (Heindel y Chapin 1993). Se utilizan generalmente para complementar los resultados de ensayos *in vivo*, pues aportan más información sobre los lugares diana y el mecanismo de los efectos observados.

En la Tabla 33.16 se indican los tres tipos de parámetros que se utilizan al evaluar la toxicidad reproductora: toxicidad mediada por la pareja, toxicidad específica de la hembra y específica del macho. Los parámetros mediados por la pareja comprenden los que se pueden detectar tanto en estudios multigeneracionales como en un único organismo. Suelen incluir también la evaluación de la descendencia. Hay que señalar que la medición de la fecundidad en los roedores es por lo general insensible en comparación con esa misma medición en los humanos, y que es muy posible que se produzcan efectos adversos sobre la función reproductora a dosis más bajas que las que afectan de manera significativa a la fecundidad (EPA 1994). Entre los parámetros específicos del macho figuran los ensayos de letalidad dominante, así como la evaluación histopatológica de los órganos y el esperma, mediciones del nivel hormonal y marcadores del desarrollo sexual. La función espermática puede valorarse asimismo con métodos de fecundación *in vitro* para determinar la capacidad de penetración y capacitación que tienen las células germinales; esos ensayos son útiles porque son directamente comparables con las evaluaciones *in vitro* que se realizan en las clínicas de fecundidad humana, pero no aportan

Tabla 33.16 • Parámetros de toxicología en la reproducción.

	Parámetros mediados por la pareja
Estudios multigeneracionales	Otros parámetros reproductivos
Tasa de apareamiento, tiempo hasta apareamiento (tiempo hasta embarazo ¹)	Tasa de ovulación
Tasa de embarazos ¹	Tasa de fecundación
Tasa de partos ¹	Pérdidas antes de la implantación
Duración de la gestación ¹	Número de implantaciones
Tamaño de la camada (total y vivos)	Pérdidas después de la implantación ¹
Número de crías vivas y muertas (fase de muerte fetal ¹)	Malformaciones y variaciones internas ¹
Sexo de las crías ¹	Desarrollo estructural y funcional postnatal ¹
Peso al nacer ¹	
Pesos postnatales ¹	
Supervivencia de las crías ¹	
Malformaciones y variaciones externas ¹	
Reproducción de las crías ¹	
	Parámetros específicos de los machos
Peso de los órganos	Testículos, epididímos, vesículas seminales, próstata, pituitaria
Examen visual e histopatología	Testículos, epididímos, vesículas seminales, próstata, pituitaria
Evaluación del esperma ¹	Número (recuento) y calidad (morfología, motilidad) de los espermatozoides
Niveles hormonales ¹	Hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), testosterona, estrógenos, prolactina
Desarrollo	Descenso de los testículos ¹ , separación del prepucio, producción de esperma ¹ , distancia ano-genital, normalidad de los genitales externos ¹
	Parámetros específicos de las hembras
Peso corporal	
Peso de los órganos	Ovario, útero, vagina, pituitaria
Examen visual e histopatología	Ovario, útero, vagina, pituitaria, oviducto, glándula mamaria
Normalidad del ciclo del estro (menstrual ¹)	Citología del flujo vaginal
Niveles hormonales ¹	LH, FSH, estrógenos, progesterona, prolactina
Lactancia ¹	Crecimiento de las crías
Desarrollo	Normalidad de los genitales externos ¹ , orificio vaginal, citología del flujo vaginal, inicio del estro (menstruación ¹)
Senectud (menopausia ¹)	Citología del flujo vaginal, histología ovárica

¹ Parámetros que pueden obtenerse en los seres humanos con métodos relativamente no invasivos.

Fuente: EPA 1994.

por sí mismos información sobre la relación dosis-respuesta. Entre los parámetros específicos de la hembra figura, además de la histopatología de órganos y las mediciones del nivel hormonal, la valoración de las secuelas de la reproducción, entre ellas la lactancia y el crecimiento de la descendencia.

En Estados Unidos, la identificación del peligro de una sustancia concluye con una evaluación cualitativa de los datos de toxicidad en virtud de la cual se determina si esa sustancia presenta evidencia suficiente o insuficiente de peligro (EPA 1994). La evidencia "suficiente" comprende datos epidemiológicos que indican de manera convincente la existencia de una relación causal (o su ausencia) sobre la base de estudios de cohortes o de casos y controles, o de series de casos bien fundamentadas. Los datos sobre animales, suficientes, pueden unirse a los datos humanos, limitados, para apoyar la conclusión respecto de un peligro de la reproducción: para considerarlos suficientes, a los estudios experimentales se les suele pedir que utilicen las directrices de la EPA sobre ensayos en dos generaciones, y han de incluir también un mínimo de datos que demuestren un efecto reproductor adverso en un estudio adecuado y bien realizado sobre una de las especies del ensayo. Unas veces se dispone de datos humanos limitados, pero otras no; no son imprescindibles a efectos de la identificación de los peligros. Para descartar un peligro en reproducción potencial, los datos sobre animales han de incluir un número suficiente de parámetros, tomados de más de un estudio, que indiquen la inexistencia de efectos reproductores adversos sobre el animal a dosis mínimamente tóxicas (EPA 1994).

Evaluación de la relación dosis-respuesta

Como en la evaluación de los neurotóxicos, la demostración de los efectos relacionados con la dosis es una parte importante de la evaluación del riesgo de los tóxicos para la reproducción. En los análisis de la relación dosis-respuesta se plantean dos problemas singulares: la complicada toxicocinética durante el embarazo y la necesidad de distinguir la toxicidad específica para la reproducción de la toxicidad general para el organismo. Ocurre a veces que animales debilitados, o animales con un nivel sustancial de toxicidad no específica (como pérdida de peso), no ovulan o no se aparean. La toxicidad materna puede afectar a la viabilidad del embarazo o al sostenimiento de la lactancia. Aunque demuestran una toxicidad, esos efectos no son específicos de la reproducción (Kimmel y cols. 1986). La valoración de la relación dosis-respuesta respecto de un parámetro determinado, como la fecundidad, debe realizarse en el contexto de una evaluación global de la reproducción y el desarrollo. Las relaciones dosis-respuesta de diferentes efectos pueden ser notablemente distintas, pero complicar pese a ello la detección. Por ejemplo, agentes que reducen el tamaño de la camada pueden no afectar al peso de los miembros de ésta, pues hay menos competencia para conseguir la nutrición intrauterina.

Evaluación de la exposición

Un importante componente de la evaluación de la exposición en el caso del riesgo para la reproducción es el que se refiere a la información sobre el momento y la duración de las exposiciones. Las medidas de la exposición acumulada pueden no ser lo bastante precisas, según cuál sea el proceso biológico que se ha visto afectado. Se sabe que exposiciones ocurridas en diferentes fases del desarrollo tanto masculino como femenino pueden producir resultados distintos tanto en los humanos como en los animales de experimentación (Gray y cols. 1988). También afecta al resultado la naturaleza temporal de la espermatogénesis y la ovulación. Los efectos sobre la espermatogénesis pueden ser reversibles si cesa la exposición; en cambio, la toxicidad sobre el oocito no es reversible, pues las hembras tienen un número fijo de

células germinales que necesitan para la ovulación (Mattison y Thomford 1989).

Caracterización del riesgo

Al igual que en la neurotoxicidad, en la toxicidad para la reproducción se parte de la existencia de un umbral. No obstante, las acciones de compuestos mutágenos sobre las células germinales pueden considerarse una excepción a ese supuesto general. En el caso de otros parámetros se calcula una RfD o una RfC del mismo modo que con los neurotóxicos: determinando el NOAEL o el LOAEL y aplicando factores de incertidumbre adecuados. El efecto que se utiliza para determinar el NOAEL o el LOAEL es el punto final adverso más sensible de la especie de mamífero más apropiada o más sensible (EPA 1994). Los factores de incertidumbre tienen en cuenta aspectos como las variaciones entre especies y entre individuos de una especie, la posibilidad de definir un NOAEL auténtico y la sensibilidad del punto final detectado.

Las caracterizaciones del riesgo deben centrarse asimismo en subpoblaciones concretas en situación de riesgo, especificando en lo posible la composición por sexos, la situación en materia de embarazos y la edad. Pueden tenerse en cuenta también a los individuos especialmente sensibles, como mujeres lactantes, mujeres con un número reducido de oocitos, hombres con recuentos de espermatozoides bajos y adolescentes antes de la pubertad.

ENFOQUES EN LA IDENTIFICACION DE LOS PELIGROS: LA IARC

Harri Vainio y Julian Wilbourn

La identificación de los riesgos de carcinogenicidad para los humanos viene siendo desde 1971 el objetivo de la serie *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, que edita la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). Hasta la fecha se han publicado o están en preparación 69 volúmenes, con evaluaciones de la carcinogenicidad de 836 agentes o circunstancias de exposición (véase el Apéndice).

Estas evaluaciones cualitativas del riesgo carcinógeno para los humanos son equivalentes a la fase de identificación de los peligros en el sistema de evaluación del riesgo hoy generalmente aceptado, que comprende la identificación del peligro, la evaluación de la relación dosis-respuesta (incluidas extrapolaciones fuera de los límites de las observaciones), la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo.

El programa de las *Monographs* de la IARC tiene por objeto publicar evaluaciones cualitativas críticas sobre la carcinogenicidad para los humanos que presentan agentes (sustancias químicas, grupos de sustancias químicas, mezclas complejas, factores físicos o biológicos) o circunstancias de exposición (exposiciones profesionales, hábitos culturales) mediante la cooperación internacional basada en grupos de trabajo de expertos. Los grupos de trabajo preparan monografías sobre una serie de determinados agentes o exposiciones, y luego el volumen se publica y goza de una amplia distribución. Cada monografía consta de las partes siguientes: breve descripción de las propiedades físicas y químicas del agente; métodos para su análisis; descripción de cómo y cuánto se produce y de cuánto se utiliza; datos sobre su presencia y sus exposiciones humanas; resúmenes de informes de casos y estudios epidemiológicos sobre el cáncer en los humanos; resúmenes de ensayos experimentales de carcinogenicidad; breve descripción de otros datos biológicos pertinentes, como toxicidad y efectos genéticos, que

pueden indicar su posible mecanismo de acción, y evaluación de su carcinogenicidad. La primera parte de este plan general se tiene que adaptar cuando se trata de agentes que no son sustancias químicas ni mezclas químicas.

Varios grupos especiales de expertos han elaborado los principios rectores de la evaluación de los carcinógenos, principios que se publican en el Preámbulo de las *Monographs* (IARC 1994a).

Instrumentos para la identificación cualitativa del riesgo (peligro) de carcinogenicidad

Se establecen asociaciones examinando los datos disponibles procedentes de estudios sobre personas expuestas, de bioensayos con animales de experimentación y de estudios sobre exposición, metabolismo, toxicidad y efectos genéticos tanto en humanos como en animales.

Estudios sobre el cáncer en los humanos

Hay tres tipos de estudios epidemiológicos que contribuyen a la evaluación de la carcinogenicidad: estudios de cohortes, estudios de casos y controles y estudios de correlación (o ecológicos). Pueden examinarse también informes de casos de cáncer.

Los estudios de cohortes y de casos y controles ponen en relación las exposiciones individuales que se estudian con la presencia de cáncer en los individuos y ofrecen, como medida principal de esa asociación, una estimación del riesgo relativo (coeficiente entre la incidencia en las personas expuestas y la incidencia en las no expuestas).

En los estudios de correlación, la unidad de investigación es por lo general poblaciones enteras (por ejemplo, determinadas zonas geográficas), y la frecuencia del cáncer se pone en relación con una medida global de la exposición de la población al agente. Como no se documentan las exposiciones individuales, en estos estudios es más difícil deducir una relación causal que en los de cohortes y de casos y controles. Los informes de casos obedecen generalmente a una sospecha, basada en la experiencia clínica, de que la concurrencia de dos hechos —es decir, una determinada exposición y la presencia de un cáncer— es mucho más frecuente de lo que cabría atribuir al azar. Las incertidumbres que rodean a la interpretación de los informes de casos y los estudios de correlación hacen que éstos no sean por sí solos, salvo en raras excepciones, una base suficiente para inferir una relación causal.

En la interpretación de los estudios epidemiológicos es necesario tener en cuenta la posible influencia de un sesgo o de factores de confusión. Por sesgo se entiende la presencia, en el diseño o ejecución del estudio, de factores que conducen a establecer una asociación errónea, más fuerte o más débil de la que existe en realidad, entre la enfermedad y un agente. Por factores de confusión se entienden una serie de factores que hacen que la relación con la enfermedad resulte más fuerte o más débil de lo que es en realidad debido a un asociación entre el factor causal aparente y otro factor que está asociado a un incremento o a una reducción de la incidencia de la enfermedad.

En la evaluación de los estudios epidemiológicos, las asociaciones fuertes (es decir, un riesgo relativo grande) indican causalidad con más probabilidad que las asociaciones débiles, aunque se reconoce que los riesgos relativos de pequeña magnitud no comportan una ausencia de causalidad y pueden ser importantes cuando se trata de una enfermedad extendida. Las asociaciones que se repiten en varios estudios del mismo diseño o utilizando distintos enfoques epidemiológicos o en diferentes circunstancias de exposición tienen más probabilidades de representar una relación de causalidad que las observaciones aisladas de un solo estudio. Se considera que el incremento del riesgo de cáncer al

incrementar la cantidad de exposición es un claro indicio de causalidad, pero el hecho de que la respuesta no esté graduada no descarta necesariamente la existencia de una relación causal. La demostración de que el riesgo desciende tras cesar o reducirse la exposición en individuos o en poblaciones enteras apoya también la interpretación causal de los resultados.

Cuando varios estudios epidemiológicos indican que la asociación entre una exposición y el cáncer es escasa o nula, se puede aceptar que, entre todos ellos, contienen una evidencia que sugiere la ausencia de carcinogenicidad. Pero ha de considerarse y excluirse con certeza razonable la posibilidad de que el resultado observado se deba a la presencia de sesgo o de factores de confusión o a una clasificación errónea de la exposición o los datos. La evidencia que sugiere una ausencia de carcinogenicidad obtenida en varios estudios epidemiológicos es aplicable únicamente al tipo o tipos de cáncer, niveles de dosis e intervalos entre la primera exposición y la observación de la enfermedad que se han estudiado. En el caso de algunos tipos de cáncer humano, el período entre la primera exposición y el desarrollo de la enfermedad clínica es raras veces inferior a 20 años; en los períodos de latencia sustancialmente inferiores a 30 años no puede haber evidencia que sugiera ausencia de carcinogenicidad.

La evidencia relativa a la carcinogenicidad obtenida en estudios sobre humanos se clasifica en una de las categorías siguientes:

Evidencia suficiente de carcinogenicidad. Se ha establecido una relación de causalidad entre la exposición al agente, mezcla o circunstancia de exposición y el cáncer humano. Es decir, se ha observado una relación positiva entre la exposición y el cáncer en estudios en los que puede descartarse con razonable confianza la presencia de azar, sesgo o factores de confusión.

Evidencia limitada de carcinogenicidad. Se ha observado una asociación positiva entre la exposición al agente, mezcla o circunstancia de exposición y el cáncer, y es creíble su interpretación como relación de causalidad, pero no puede descartarse con confianza razonable la presencia de azar, sesgo o factores de confusión.

Evidencia inadecuada de carcinogenicidad. Los estudios que se han realizado no tienen la calidad, coherencia o representatividad estadística suficientes para poder llegar a una conclusión sobre la presencia o ausencia de una relación de causalidad, o no se dispone de datos sobre el cáncer en los humanos.

Evidencia que sugiere ausencia de carcinogenicidad. Hay varios estudios adecuados que abarcan todo el intervalo de niveles de exposición que pueden experimentar los seres humanos, y esos estudios se refuerzan mutuamente en no mostrar una asociación positiva entre la exposición al agente y el cáncer estudiado a ninguno de los niveles de exposición observados. La conclusión de “evidencia que sugiere ausencia de carcinogenicidad” se limita inevitablemente a las localizaciones del cáncer, condiciones y niveles de la exposición y duración de la observación abarcadas por los estudios realizados.

La aplicabilidad de una evaluación de la carcinogenicidad de una mezcla, proceso, actividad profesional o sector sobre la base de la evidencia obtenida en estudios epidemiológicos depende del tiempo y el lugar. Deben buscarse la exposición, proceso o actividad específicos que se estime que tienen más probabilidades de ser los responsables de cualquier exceso de riesgo, y la evaluación ha de delimitarse lo más estrictamente posible. El largo período de latencia del cáncer humano complica la interpretación de los estudios epidemiológicos.

Otra dificultad es el hecho de que los humanos están expuestos simultáneamente a diversas sustancias químicas, que pueden interactuar para incrementar o reducir el riesgo de neoplasia.

Estudios sobre carcinogenicidad en animales de experimentación

Los estudios en los que se expone a animales de experimentación (por lo general ratones y ratas) a carcinógenos potenciales y después se examina en ellos la presencia o ausencia de cáncer se empezaron a realizar hace unos 50 años con el fin de plantear científicamente el estudio de la carcinogénesis química y de evitar algunos de los inconvenientes de utilizar sólo datos epidemiológicos sobre humanos. En todas las *Monographs* de la IARC se resumen los estudios publicados sobre carcinogenicidad en animales y se clasifica en una de las categorías siguientes el grado de evidencia de carcinogenicidad:

Evidencia suficiente de carcinogenicidad. Se ha establecido una relación de causalidad entre el agente o mezcla y una mayor incidencia de neoplasias malignas o de una combinación adecuada de neoplasias benignas y malignas en dos o más especies de animales o en dos o más estudios independientes sobre una misma especie realizados en épocas distintas, en laboratorios distintos o conforme a protocolos distintos. Excepcionalmente podría considerarse que un único estudio sobre una única especie aporta evidencia suficiente de carcinogenicidad cuando se presentan neoplasias malignas con una intensidad inusual respecto de su incidencia, localización, tipo de tumor o edad a la que se presentan.

Evidencia limitada de carcinogenicidad. Los datos sugieren un efecto carcinógeno, pero son demasiado limitados para formular una evaluación definitiva porque, por ejemplo, a) la evidencia de carcinogenicidad se limita a un único experimento, o b) quedan algunas dudas sin resolver acerca de la calidad del diseño, la realización o la interpretación del estudio, o c) el agente o mezcla aumenta la incidencia sólo de neoplasias benignas o de lesiones de potencial neoplásico incierto, o de determinadas neoplasias que pueden presentarse espontáneamente con altas incidencias en determinadas estirpes.

Evidencia inadecuada de carcinogenicidad. Los estudios no pueden interpretarse ni en el sentido de presencia ni en el de ausencia de efecto carcinógeno debido a importantes limitaciones cualitativas o cuantitativas, o porque no se dispone de datos sobre el cáncer en animales de experimentación.

Evidencia que sugiere ausencia de carcinogenicidad. Se dispone de estudios adecuados sobre un mínimo de dos especies que indican que, dentro de los límites de los ensayos utilizados, el agente o mezcla no es carcinógeno. La conclusión de evidencia que sugiere ausencia de carcinogenicidad se limita inevitablemente a las especies, localización del tumor y niveles de exposición que se han estudiado.

Otros datos de interés para la evaluación de la carcinogenicidad

Entre los datos sobre los efectos biológicos en los humanos que son de especial interés figuran las consideraciones toxicológicas, cinéticas y metabólicas, así como la presencia de unión al ADN y la persistencia de lesiones en el ADN o daño genético en las personas expuestas. La información toxicológica, como la que se refiere a la citotoxicidad y regeneración, la unión a receptores y los efectos hormonales e inmunológicos, y los datos sobre cinética y metabolismo en animales de experimentación se resumen cuando se consideran de interés para el posible mecanismo de la acción carcinógena del agente. Los resultados de los ensayos para detectar efectos genéticos y afines se resumen respecto de todos los mamíferos, incluido el hombre, células de mamíferos en cultivo y sistemas de no mamíferos. Las relaciones estructura-actividad se mencionan cuando son relevantes.

Respecto del agente, mezcla o circunstancia de exposición que es objeto de la evaluación, los datos disponibles sobre parámetros u otros fenómenos de interés para los mecanismos de la

carcinogénesis obtenidos en estudios sobre humanos y animales de experimentación y en ensayos tisulares y celulares se resumen en una o varias de las categorías descriptivas siguientes:

- Evidencia de genotoxicidad (es decir, cambios estructurales al nivel de los genes): por ejemplo, consideraciones de estructura-actividad, formación de aductos, mutagenicidad (efecto sobre genes específicos), mutaciones cromosómicas o aneuploidía.
- Evidencia de efectos sobre la expresión de genes pertinentes (es decir, cambios funcionales al nivel intracelular): por ejemplo, alteraciones de la estructura o cantidad del producto de un protooncogén o de un gen supresor de tumores, o alteraciones de la activación y desactivación metabólicas o de la reparación del ADN.
- Evidencia de efectos pertinentes sobre el comportamiento celular (es decir, cambios morfológicos o de comportamiento al nivel celular o tisular): por ejemplo, inducción de mitogénesis, proliferación celular compensatoria, preneoplasia e hiperplasia, supervivencia de células premalignas o malignas (immortalización, inmunosupresión) o efectos sobre el potencial de metástasis.
- Evidencia obtenida de relaciones dosis-tiempo de efectos carcinógenos e interacciones entre agentes: por ejemplo, fase temprana frente a fase tardía, conforme a estudios epidemiológicos; inicio, promoción, progresión o conversión a malignidad, conforme a experimentos de carcinogenicidad en animales; toxicocinética.

Estas categorías no son excluyentes, y un agente puede aparecer en más de una de ellas. Así, por ejemplo, la acción de un agente sobre la expresión de los genes pertinentes podría resumirse en las categorías primera y segunda, aun cuando se supiera con razonable certeza que esos efectos tienen un origen genotóxico.

Evaluaciones globales

Por último, se consideran en su conjunto todos los resultados a fin de llegar a una evaluación global de la carcinogenicidad para los humanos de un agente, mezcla o circunstancia de exposición. La evaluación puede referirse a un grupo de sustancias químicas cuando los datos de apoyo indican que otros compuestos relacionados de los que no hay evidencia directa de su capacidad para inducir cáncer en humanos o animales pueden ser también carcinógenos, y en esos casos se añade al texto de la evaluación una justificación de dicha conclusión.

El agente, mezcla o circunstancia de exposición se describe en los términos que figuran en las categorías siguientes, y se indica el grupo al que se le ha asignado. La categorización de un agente, mezcla o circunstancia de exposición es una cuestión de juicio científico, en el que se debe reflejar la mayor o menor evidencia obtenida en estudios con humanos y animales de experimentación y en otros datos pertinentes.

Grupo 1

El agente (mezcla) es carcinógeno para los humanos. La circunstancia de exposición comporta exposiciones que son carcinógenas para los humanos.

Esta categoría se utiliza cuando hay evidencia suficiente de carcinogenicidad en los humanos. Excepcionalmente puede incluirse en esta categoría un agente (mezcla) respecto del que la evidencia en los humanos no llega a ser suficiente pero sí hay evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación y clara evidencia en humanos expuestos de que el agente (mezcla) actúa a través de un mecanismo de carcinogenicidad pertinente.

Grupo 2

Están incluidos en esta categoría los agentes, mezclas y circunstancias de exposición respecto de los cuales, por uno de los extremos, el grado de evidencia de carcinogenicidad en los humanos es casi suficiente, así como aquellos otros respecto de los cuales, por el otro extremo, no hay datos humanos pero sí evidencia de carcinogenicidad en animales de experimentación. Sobre la base de la evidencia epidemiológica y experimental de carcinogenicidad y otros datos pertinentes, los agentes, mezclas y circunstancias de exposición se asignan bien al grupo 2A (probablemente carcinógenos para los humanos), bien al grupo 2B (posiblemente carcinógenos para los humanos).

Grupo 2A. El agente (mezcla) es probablemente carcinógeno para los humanos. La circunstancia de exposición comporta exposiciones que son probablemente carcinógenas para los humanos. Se utiliza esta categoría cuando hay evidencia limitada de carcinogenicidad en los humanos y evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación. En algunos casos puede clasificarse en esta categoría un agente (mezcla) cuando hay evidencia inadecuada de carcinogenicidad en los humanos y evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación y clara evidencia de que la carcinogénesis está llevada a cabo por un mecanismo que también opera en los humanos. Con carácter excepcional, puede clasificarse también en esta categoría un agente, mezcla o circunstancia de exposición únicamente sobre la base de evidencia limitada de carcinogenicidad en los humanos.

Grupo 2B. El agente (mezcla) es posiblemente carcinógeno para los humanos. La circunstancia de exposición comporta exposiciones que son posiblemente carcinógenas para los humanos. Se utiliza esta categoría para los agentes, mezclas y circunstancias de exposición respecto de los cuales hay la evidencia limitada de carcinogenicidad en los humanos y evidencia menos que suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación. Puede utilizarse también cuando hay evidencia inadecuada de carcinogenicidad en los humanos pero evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación. En algunos casos puede incluirse en este grupo un agente, mezcla o circunstancia de exposición respecto del cual hay evidencia inadecuada de carcinogenicidad en los humanos pero evidencia limitada de carcinogenicidad en animales de experimentación junto con evidencia complementaria a partir de otros datos relevantes.

Grupo 3

El agente (mezcla o circunstancia de exposición) no es clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para los humanos. Se utiliza sobre todo esta categoría para los agentes, mezclas y circunstancias de exposición respecto de los cuales la evidencia de carcinogenicidad es inadecuada en los humanos e inadecuada o limitada en animales de experimentación.

Excepcionalmente pueden incluirse en esta categoría agentes (mezclas) respecto de los cuales la evidencia de carcinogenicidad es inadecuada en los humanos pero suficiente en los animales de experimentación cuando hay una clara evidencia de que el mecanismo de carcinogenicidad observado en los animales de experimentación no opera en los humanos.

Grupo 4

El agente (mezcla) es probablemente no carcinógeno para los humanos. Se incluyen en esta categoría los agentes o mezclas respecto de los cuales hay la evidencia que sugiere ausencia de carcinogenicidad en los humanos y en animales de experimentación. En algunos casos pueden clasificarse en este grupo agentes o mezclas respecto de los cuales hay evidencia inadecuada de carcinogenicidad en los humanos pero evidencia que sugiere ausencia

de carcinogenicidad en los animales de experimentación, con el apoyo claro y sistemático de una amplia gama de otros datos relevantes.

Los sistemas de clasificación que ha elaborado el hombre no son lo suficientemente perfectos para abarcar todas las complejas entidades de la biología. No obstante, son útiles como principios de orientación y pueden modificarse a medida que se van consolidando nuevos conocimientos sobre la carcinogénesis. Al incluir un agente, mezcla o circunstancia de exposición en una u otra categoría es esencial basarse en los juicios científicos formulados por el grupo de expertos.

Resultados hasta la fecha

Hasta la fecha se han publicado o están en preparación 69 volúmenes de las *Monographs* de la IARC, en los que se evalúa la carcinogenicidad para los humanos de 836 agentes o circunstancias de exposición. Setenta y cuatro agentes o exposiciones se han evaluado como carcinógenos para los humanos (Grupo 1), 56 como probablemente carcinógenos para los humanos (Grupo 2A), 225 como posiblemente carcinógenos para los humanos (Grupo 2B) y uno como probablemente no carcinógeno para los humanos (Grupo 4). En el caso de 480 agentes o exposiciones, los datos epidemiológicos y experimentales disponibles no permitieron evaluar su carcinogenicidad para los humanos (Grupo 3).

Importancia de los datos mechanistas

En el Preámbulo revisado, que apareció por vez primera en el volumen 54 de las *Monographs* de la IARC, se contempla la posibilidad de que un agente respecto del cual la evidencia epidemiológica de cáncer es menos que suficiente sea incluido en el Grupo 1 cuando hay evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación y clara evidencia en humanos expuestos de que el agente actúa a través de un mecanismo de carcinogenicidad aplicable a los humanos. A la inversa, un agente respecto del cual hay evidencia inadecuada de carcinogenicidad en los humanos y evidencia suficiente en animales de experimentación y clara evidencia de que el mecanismo de carcinogénesis no opera en los humanos puede colocarse en el Grupo 3 en vez de, como sería lo normal, en el Grupo 2B —posiblemente carcinógenos para los humanos.

En tres ocasiones se ha debatido recientemente la utilización de esos datos mechanistas.

Aunque está en general aceptado que la radiación solar es carcinógena para los humanos (Grupo 1), los estudios epidemiológicos sobre cáncer humano por el empleo de lámparas de radiaciones UVA y UVB no proporcionan más que una evidencia limitada de carcinogenicidad. En tumores humanos de células escamosas de zonas de la piel expuestas al sol se han observado especiales sustituciones en tandem de bases (GC®TT) en genes supresores de tumores p53. Aunque la UVR puede inducir transiciones similares en algunos sistemas experimentales y las radiaciones UVB, UVA y UVC son carcinógenas en los animales de experimentación, los datos mechanistas disponibles no le parecieron al grupo de trabajo lo suficientemente contundentes para clasificar las radiaciones UVB, UVA y UVC en un grupo superior al 2A (IARC 1992). En un estudio publicado después de la reunión (Kress y cols. 1992) se demostró la existencia de transiciones CC®TT en p53 en tumores cutáneos inducidos por la radiación UVB en el ratón, lo que podría sugerir que ésta debería clasificarse también como carcinógena para los humanos (Grupo 1).

El segundo caso en el que se estudió la posibilidad de incluir un agente en el Grupo 1 a pesar de no haber evidencia epidemiológica suficiente es el de la 4,4'-metilen-bis(2-cloroanilina) (MOCA). La MOCA es carcinógena en perros y roedores y posee una amplia genotoxicidad. Se une al ADN mediante

reacción con N-hidroxi MOCA, y los mismos aductos que se forman en los tejidos diana de la carcinogenicidad en los animales se han encontrado en células uroteliales de un reducido número de personas expuestas. Tras considerar largamente la posibilidad de pasar la MOCA a la categoría superior, el grupo de trabajo decidió finalmente clasificarla globalmente en el Grupo 2A, es decir, como probablemente carcinógena para los humanos (IARC 1993).

Durante una reciente evaluación del óxido de etileno (IARC 1994b), los estudios epidemiológicos disponibles proporcionaban una evidencia limitada de carcinogenicidad en los humanos mientras que los estudios con animales de experimentación daban evidencia suficiente de carcinogenicidad. El óxido de etileno se clasificó como carcinógeno para los humanos (Grupo 1) teniendo en cuenta otros datos pertinentes: 1) que el óxido de etileno induce un aumento sensible, persistente y relacionado con la dosis de la frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambios de cromatidial hermanas en linfocitos periféricos y micronúcleos de las células de la médula ósea de los trabajadores expuestos; 2) que se ha asociado con tumores malignos del sistema linfático y hematopoyético tanto en los humanos como en los animales de experimentación; 3) que induce un incremento relacionado con la dosis de la frecuencia de aductos de hemoglobina en los humanos expuestos e incrementos relacionados con la dosis del número de aductos tanto de ADN como de hemoglobina en los roedores expuestos; 4) que

induce mutaciones génicas y translocaciones heredables en las células germinales de los roedores expuestos, y 5) que es un poderoso mutágeno y clastógeno a todos los niveles filogenéticos.

Ningún grupo de trabajo ha utilizado hasta el momento la posibilidad, contemplada en el Preámbulo, de que un agente respecto del cual hay evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales se incluya en el Grupo 3 (en vez de en el Grupo 2B, en el que se clasificaría normalmente) cuando hay clara evidencia de que el mecanismo de carcinogenicidad que actúa en los animales no lo hace en los humanos. Se podría haber contemplado tal posibilidad en el caso del d-limoneno si hubiera habido evidencia suficiente de su carcinogenicidad en animales, pues hay datos que sugieren que la producción de α 2-microglobulina en el riñón del macho de la rata está vinculada a los tumores renales observados.

Entre las muchas sustancias químicas que consideró prioritarias un grupo de trabajo especial que se reunió en diciembre de 1993 figuraban algunos mecanismos de acción intrínsecos que se proponen con frecuencia y se identificaban determinadas clases de agentes sobre la base de sus propiedades biológicas. El grupo de trabajo recomendó que, antes de que se evaluaran los agentes como los proliferantes de peroxisomas, fibras, polvos y agentes tirostáticos, dentro del programa de las Monografías se convocaran grupos de trabajo especiales para examinar los últimos conocimientos sobre sus mecanismos de acción correspondientes.

● APENDICE: EVALUACIONES GLOBALES DE CARCINOGENICIDAD PARA LOS HUMANOS: MONOGRAFIAS DE LA IARC, VOLUMENES 1-69 (836)¹

Grupo 1: Carcinógenos para los humanos (74)

Agentes y grupos de agentes

- Aflatoxinas [1402-68-2] (1993)
- Amianto [1332-21-4]
- 4-Aminodifenilo [92-67-1]
- Anticonceptivos orales, combinados⁵
- Anticonceptivos orales, secuenciales
- Arsénico [7440-38-2] y compuestos de arsénico²
- Azatioprina [446-86-6]
- Benceno [71-43-2]
- Bencidina [92-87-5]
- Berilio [7440-41-7] y compuestos de berilio (1993)³
- Bis(2-cloroethyl)-2-naftilamina (clornafacina) [494-03-1]
- Bis(clorometil) éter [542-88-1] y clorometil metil éter [107-30-2] (grado técnico)
- Cadmio [7440-43-9] y compuestos del cadmio (1993)³
- Ciclofosfamida [50-18-0] [6055-19-2]
- Ciclosporina [79217-60-0] (1990)
- Clorambucil [305-03-3]
- 1-(2-Cloroetyl)-3-(4-metilciclohexil)-1-nitrosourea (metil-CCNU; semustina) [13909-09-6]

- Cloruro de vinilo [75-01-4]
- Cromo[VI], compuestos de (1990)³
- Dietilsilbestrol [56-53-1]
- Dimetanosulfonato de 1,4-butanediol (myleran) [55-98-1]
- Erionita [66733-21-9]
- Estrógenos, esteroideos²
- Estrógenos, no esteroideos²
- Estrógenos, terapia de sustitución con Gas mostaza (mostaza de azufre) [505-60-2]
- Helicobacter pylori* (infección con) (1994)
- Melfalán [148-82-3]
- 8-Metoxipsoraleno (metoxsaleno) [298-81-7] más radiación ultravioleta A
- MOPP y otras quimioterapias combinadas, incluidos agentes alquilantes
- 2-Naftilamina [91-59-8]
- Níquel, compuestos de (1990)³
- Opisthorchis viverrini* (infección con) (1994)
- Oxido de etileno⁴ [75-21-8] (1994)
- Radiación solar (1992)

1 El número de Chemical Abstract figura entre corchetes; los años que aparecen entre parentesis corresponden al año en que se publicó la evaluación con posterioridad al Suplemento 7-Grupo de Trabajo para agentes, mezclas o circunstancias de exposición incluidos en los Volúmenes 43 al 61 de las Monografías.

2 Esta evaluación se aplica al grupo de sustancias químicas como conjunto, no necesariamente a cada una de ellas como elemento dentro del grupo.

3 Evaluados como grupo.

4 Evaluación global por la que pasa de 2A a 1 con pruebas de apoyo a partir de otros datos relevantes para la evaluación de la carcinogenicidad y sus mecanismos.

5 La evidencia de que estos agentes poseen un efecto protector contra los cánceres de ovario y endometrio es concluyente.

6 La evidencia de que este agente (tamoxifeno) reduce el riesgo de cáncer de mama contralateral es igualmente concluyente.

7 Evaluación global por la que pasa de 2A a 1 con pruebas de apoyo a partir de otros datos relevantes para la evaluación de la carcinogenicidad y sus mecanismos.

8 Evaluación global por la que pasa de 2B a 2A con pruebas de apoyo a partir de otros datos relevantes.

9 Evaluación global por la que pasa de 3 a 2B con pruebas de apoyo a partir de otros datos relevantes.

10 Hay cierta evidencia de la relación inversa que existe entre el consumo de café y el cáncer de intestino grueso; el consumo de café no puede clasificarse por su carcinogenicidad para otros órganos.

Radón [10043-92-2] y sus productos de desintegración (1988)
Schistosoma haematobium (infección con) (1994)
 Sílice [14808-60-7] cristalina (inalada en forma de cuarzo o cristobalita a partir de exposiciones profesionales)
 Talco con fibras asbestiformes
 Tamoxifeno [10540-29-1]
 Tiotepa [52-24-4] (1990)
 Treosulfán [299-75-2]
 Virus de la hepatitis B (infección crónica con) (1993)
 Virus de la hepatitis C (infección crónica con) (1993)
 Virus del papiloma en humanos, tipo 16 (1995)
 Virus del papiloma en humanos, tipo 18 (1995)
 Virus linfotrópico de células T en humanos, tipo I (1996)

Mezclas

Aceites de esquisto [68308-34-9]
 Aceites minerales, no tratados o levemente tratados
 Alquitranes de hulla [8007-45-2]
 Bebidas alcohólicas (1988)
 Betel mascado con tabaco
 Breas de alquitrán de hulla [65996-93-2]
 Hollines
 Humo de tabaco
 Mezclas analgésicas con fenacetina
 Pescado salado (estilo chino) (1993)
 Polvo de madera
 Productos del tabaco, sin humo

Exposiciones

Aluminio, producción de
 Auramina (fabricación de)
 Calzado (fabricación y reparación de)
 Caucho, industria del
 Ebanistería y fabricación de muebles
 Extracción de hematites (subterránea) con exposición a radón
 Fundición siderúrgica
 Gasificación del carbón
 Isopropanol, fabricación de (proceso con ácidos fuertes)
 Magenta, fabricación de (1993)
 Nieblas de ácidos fuertes inorgánicos con ácido sulfúrico (exposición profesional) (1992)
 Pintores (exposición profesional de los) (1989)
 Producción de coque

Grupo 2: Probablemente carcinógenos para los humanos (56)**Agentes y grupos de agentes**

Acrilamida [79-06-1] (1994)⁸
 Acrilonitrilo [107-13-1]
 Adriamicina⁸ [23214-92-8]
 Azacitidina⁸ [320-67-2] (1990)
 Benz[α]antraceno⁸ [56-55-3]
 Benzo[α]pireno⁸ [50-32-8]
 Biscloroetil nitrosourea (BCNU) [154-93-8]
 Bromuro de vinilo [593-60-2]
 1,3-Butadieno [106-99-0] (1992)
 Captafol [2425-06-1] (1991)
 Cisplatina⁸ [15663-27-1]
Clonorchis sinensis (infección con)⁸ (1994)
 Cloranfenicol [56-75-7] (1990)
 Clorhidrato de procarbazina⁸ [366-70-1]
 1-(2-Cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea⁸ (CCNU) [13010-47-4]

p-Cloro-*o*-toluidina [95-69-2] y sus sales de ácidos fuertes (1990)³
 Clorozotocina⁸ [54749-90-5] (1990)
 Cloruro de dimetilcarbamilo⁸ [79-44-7]
 Colorantes derivados de la benzidina⁸
 Dibenz[*a,h*]antraceno⁸ [53-70-3]
 Dibromuro de etileno⁸ [106-93-4]
 Epiclorhidrina⁸ [106-89-8]
 Esteroides androgénicos (anabólicos)
N-Etil-*N*-nitrosourea⁸ [759-73-9]
 Fenacetina [62-44-2]
 Fluoruro de vinilo [75-02-5]
 Formaldehído [50-00-0])
 IQ⁸ (2-Amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina) [76180-96-6] (1993)
 4,4-Metileno bis(2-cloroanilina) (MOCA)⁸ [101-14-4] (1993)
N-Metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina⁸ (MNNG) [70-25-7]
N-Metil-*N*-nitrosourea⁸ [684-93-5]
 5-Metoxiposaleno⁸ [484-20-8]
 Mostazas nitrogenadas [51-75-2]
N-Nitrosodietilamina⁸ [55-18-5]
N-Nitrosodimetilamina⁸ [62-75-9]
 Oxido de 7,8-estireno⁸ [96-09-3] (1994)
 Radiación ultravioleta A⁸ (1992)
 Radiación ultravioleta B⁸ (1992)
 Radiación ultravioleta C₈ (1992)
 Sulfato de dietilo [64-67-5] (1992)
 Sulfato de dimetilo⁸ [77-78-1]
 Tetracloroetileno [127-18-4]
 Tricloroetileno [79-01-6]
 Tris(2,3-dibromopropil)fosfato⁸ [126-72-7]

Mezclas

Bifenilos policlorados [1336-36-3]
 Creosotas [8001-58-9]
 Gases de escape de motores Diesel (1989)
 Insecticidas no arsenicales (exposiciones profesionales en rociado y aplicación de) (1991)
 Mate caliente (1991)

Exposiciones

Lámparas y camas de rayos ultravioleta (uso de) (1992)
 Peluqueros o barberos (exposición profesional de los) (1993)
 Refinado de petróleo (exposición profesional en el) (1989)
 Vidrio artístico, recipientes de vidrio y artículos de vidrio prensado (fabricación de) (1993)

Grupo 2B: Posiblemente carcinógenos para los humanos (225)**Agentes y grupos de agentes**

A-*α*-C (2-Amino-9H-pirido[2,3-*b*]indol) [26148-68-5]
 Acetaldehído [75-07-0]
 Acetamida [60-35-5]
 Acetato de medroxiprogesterona [71-58-9]
 Acetato de metilazoximetanol [592-62-1]
 Acetato de vinilo [108-05-4] (1995)
 Ácido cafeíco [331-39-5] (1993)
 Ácido cloréndico [115-28-6] (1990)
 Ácido nitrilotriacético [139-13-9] y sus sales (1990)³
 Acrilato de etilo [140-88-5]
 AF-2 [2-(2-Furil)-3-(5-nitro-2-furil)acrilamida] [3688-53-7]
 Aflatoxina M1 [6795-23-9] (1993)
p-Aminoazobenceno [60-09-3]
o-Aminoazotolueno [97-56-3]
 2-Amino-5-(5-nitro-2-furil)-1,3,4-tiadiazol [712-68-5]

- Amitrol [61-82-5]
 Anaranjado Oil SS [2646-17-5]
 α -Anisidina [90-04-0]
 Aramita [140-57-8]
 Atrazina^g [1912-24-9] (1991)
 Auramina [492-80-8] (grado técnico)
 Azaserina [115-02-6]
 Azul CI Direct 15 [2429-74-5] (1993)
 Azul Disperse 1 [2475-45-8] (1990)
 Azul HC núm. 1 [2784-94-3] (1993)
 Azul tripán [72-57-1]
 Benzo[*b*]fluoranteno [205-99-2]
 Benzo[*j*]fluoranteno [205-82-3]
 Benzo[*k*]fluoranteno [207-08-9]
 Bleomicinas [11056-06-7]
 Bromato de potasio [7758-01-2]
 Bromodiclorometano [75-27-4] (1991)
 β -Butirolactona [3068-88-0]
 Cicasina [14901-08-7]
 Clordano [57-74-9] (1991)
 Clordecone (Kepone) [143-50-0]
 ρ -Cloroanilina [106-47-8] (1993)
 4-Cloro- α -fenilendiamina [95-83-0]
 Clorofenoles
 Cloroformo [67-66-3]
 1-Cloro-2-metilpropeno [513-37-1]
 Cobalto [7440-48-4] y compuestos de cobalto³ (1991)
 Complejo hierro-dextrano [9004-66-4]
 ρ -Cresidina [120-71-8]
 Dacarbazina [4342-03-4]
 Dantron (crisacina; 1,8-dihidroxiantraquinona) [117-10-2] (1990)
 Daunomicina [20830-81-3]
 DDT [*p,p*-DDT, 50-29-3] (1991)
N,N-Diacetilbencidina [613-35-4]
 2,4-Diaminoanisol [615-05-4]
 4,4'-Diaminodifenil éter [101-80-4]
 2,4-Diaminotolueno [95-80-7]
 Dibenz[*a,h*]acridina [226-36-8]
 Dibenz[*a,j*]acridina [224-42-0]
 7H-Dibenzo[*c,g*]carbazol [194-59-2]
 Dibenzo[*a,e*]pireno [192-65-4]
 Dibenzo[*a,h*]pireno [189-64-0]
 Dibenzo[*a,i*]pireno [189-55-9]
 Dibenzo[*a,l*]pireno [191-30-0]
 ρ -Diclorobenceno [106-46-7]
 1,2-Dibromo-3-cloropropano [96-12-8]
 3,3'-Diclorobencidina [91-94-1]
 3,3'-Dicloro-4,4'-diaminodifenil éter [28434-86-8]
 1,2-Dicloroetano [107-06-2]
 Diclorometano (cloruro de metileno) [75-09-2]
 1,3-Dicloropropeno [542-75-6] (técnico)
 Diclorvos [62-73-7] (1991)
 Diepoxibutano [1464-53-5]
 Diepóxido de 4-vinilciclohexeno [107-87-6] (1994)
 1,2-Dietilhidrazina [1615-80-1]
 Diglicidil resorcinol éter [101-90-6]
 Dihidrosafrol [94-58-6]
 Diisocianatos de tolueno [26471-62-5]
 ρ -Dimetilaminoazobenceno [60-11-7]
trans-2-[(Dimetilamino)metilimino]-5-[2-(5-nitro-2-furil)-vinil]-1,3,4-oxadiazol [25962-77-0]
 2,6-Dimetilanilina (2,6-xilidina) [87-62-7] (1993)
 3,3'-Dimetilbencidina (α -tolidina) [119-93-7]
 Dimetilformamida [68-12-2] (1989)
 1,1-Dimetilhidrazina [57-14-7]
 1,2-Dimetilhidrazina [540-73-8]
 3,3'-Dimetoxibencidina (α -Dianisidina) [119-90-4]
 3,7-Dinitrofluoranteno [105735-71-5]
 3,9-Dinitrofluoranteno [22506-53-2]
 1,6-Dinitropireno [42397-64-8] (1989)
 1,8-Dinitropireno [42397-65-9] (1989)
 2,4-Dinitrotolueno [121-14-2]
 2,6-Dinitrotolueno [606-20-2]
 1,4-Dioxano [123-91-1]
 Esterigmatocistina [10048-13-2]
 Estireno [100-42-5] (1994)
 Estreptozotocina [18883-66-4]
 Extractos de negro de humo
 α -Fenilfenato de sodio [132-27-4]
 Fenilglicidil éter [122-60-1] (1989)
 Fenitoína [57-41-0]
 Fenobarbital [50-06-6]
 Fibras cerámicas
 2-(2-Formilhidrazino)-4-(5-nitro-2-furil)tiazol [3570-75-0]
 Ftalato de di(2-etilhexilo) [117-81-7]
 Glicidaldehído [765-34-4]
 Glu-P-1 (2-amino-6-metildipirido[1,2-*a*:3,2'-*d*]imidazol) [67730-11-4]
 Glu-P-2 (2-aminodipirido[1,2-*a*:3,2'-*d*]imidazol) [67730-10-3]
 Griseofulvina [126-07-8]
 Helecho común
 Heptacloro [76-44-8] (1991)
 Herbicidas clorofenoxi
 Hexaclorobenceno [118-74-1]
 Hexaclorociclohexanos
 Hexametilfosforamida [680-31-9]
 Hidrazina [302-01-2]
 Hidrocloruro de fenazopiridina [136-40-3]
 Hidrocloruro de fenoxibenzamina [63-92-3]
 Hidroxianisol butilado (BHA) [25013-16-5]
 Indeno[1,2,3-*cd*]pireno [193-39-5]
 Isopreno [78-79-5] (1994)
 Lana de vidrio (1988)
 Lana mineral (de escorias) (1988)
 Lana mineral (de rocas) (1988)
 Lasiocarpina [303-34-4]
 Magenta [632-99-5] (con CI rojo básico 9) (1993)
 MeA- α -C (2-Amino-3-metil-9H-pirido[2,3-*b*]indol) [68006-83-7]
 MeIQ (2-Amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-*f*]quinolina) [77094-11-2] (1993)
 MeIQx (2-Amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina) [77500-04-0] (1993)
 Merfalán [531-76-0]
 Metanosulfonato de etilo [62-50-0]
 Metanosulfonato de metilo [66-27-3]
 2-Metilaziridina (propilenimina) [75-55-8]
 5-Metilcriseno [3697-24-3]
 4,4'-Metilendianilina [101-77-9]
 4,4'-Metileno bis(2-metilanilina) [838-88-0]
 Metilmercurio, compuestos de (1993)³
 2-Metil-1-nitroantraquinona [129-15-7] (pureza incierta)
 N -Metil- N -nitrosouretano [615-53-2]
 Metiltiouracilo [56-04-2]
 Metronidazol [443-48-1]
 Mirex [2385-85-5]
 Mitomicina C [50-07-7]
 Monocrotalina [315-22-0]
 5-(Morfolinometilo)-3-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-2-oxazolidinona [3795-88-8]

Mostaza de uracilo [66-75-1]
 Nafenopino [3771-19-5]
 Níquel, metálico [7440-02-0] (1990)
 Niridazol [61-57-4]
 5-Nitroacenafteno [602-87-9]
 2-Nitroanisol [91-23-6] (1996)
 Nitrobenceno [98-95-3] (1996)
 6-Nitrocriseno [7496-02-8] (1989)
 Nitrofeno [1836-75-5], técnico
 2-Nitrofluorenó [607-57-8] (1989)
 1-[*(5*-Nitrofurilideno)amino]-2-imidazolidinona [555-84-0]
N-[4-(5-Nitro-2-furil)-2-tiazolil]acetamida [531-82-8]
 1-Nitropireno [5522-43-0] (1989)
 4-Nitropireno [57835-92-4] (1989)
 2-Nitropropano [79-46-9]
N-Nitrosodi-*n*-butilamina [924-16-3]
N-Nitrosodietanolamina [1116-54-7]
N-Nitrosodi-*n*-propilamina [621-64-7]
 4-(*N*-Nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanolona (NNK) [64091-91-4]
 3-(*N*-Nitrosometilamino)propionitrilo [60153-49-3]
N-Nitrosometiletilamina [10595-95-6]
N-Nitrosometilvinilamina [4549-40-0]
N-Nitrosomorfolina [59-89-2]
N[¶]-Nitrosonornicotina [16543-55-8]
N-Nitrosopiperidina [100-75-4]
N-Nitrosopirrolidina [930-55-2]
N-Nitrososarcosina [13256-22-9]
 Ocratoxina A [303-47-9] (1993)
 Oxazepam [604-75-1] (1996)
N-Oxido de mostazas nitrogenadas [126-85-2]
 Oxido de propileno [75-56-9] (1994)
 Palygorskita (attapulgita) [12174-11-7] (fibras largas: más de 5 micras) (1997)
 Panfurán S (con dihidroximetilfuratrina [794-93-4])
 Pentaclorofenol [87-86-5] (1991)
 PhIP (2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridina) [105650-23-5] (1993)
 Plomo [7439-92-1] y compuestos de plomo inorgánico³
 Ponceau MX [3761-53-3]
 Ponceau 3R [3564-09-8]
 Progestinas
 1,3-Propanosultona [1120-71-4]
 Propiltiouracilo [51-52-5]
 β-Propiolactona [57-57-8]
 Rojo CI Acid 114 [6459-94-5] (1993)
 Rojo CI Basic 9 [569-61-9] (1993)
 Rojo Citrus núm. 2 [6358-53-8]
 Sacarina [81-07-2]
 Safrol [94-59-7]
Schistosoma japonicum (infección con) (1994)
 Sulfálatos [95-06-7]
 Sulfato de diisopropilo [2973-10-6] (1992)
 Tetracloruro de carbono [56-23-5]
 Tetranitrometano [509-14-8] (1996)
 Tiocetamida [62-55-5]
 4,4'-Tiodianilina [139-65-1]
 Tiourea [62-56-6]
 Tiourea de etileno [96-45-7]
 α-Toluenos clorados (cloruro de bencilo, cloruro de benzal, benzotricloruro)
 o-Toluidina [95-53-4]
 Triclorometina (hidrocloruro de trimustina) [817-09-4] (1990)
 Trióxido de antimonio [1309-64-4] (1989)

Trp-P-1 (3-Amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol) [62450-06-0]
 Trp-P-2 (3-Amino-1-metil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol) [62450-07-1]
 Uretano [51-79-6]
 4-Vinilciclohexeno [100-40-3] (1994)
 Violeta de bencilo 4B [1694-09-3]
 Virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (infección con) (1996)
 Virus del papiloma en humanos: tipos distintos de 16, 18, 31 y 33 (1995)

Mezclas

Betunes [8052-42-4], extractos de, refinados con vapor y con agua
 Bifenilos polibromados [firemaster BP-6, 59536-65-1]
 Café (vejiga urinaria)⁹ (1991)
 Carragenina [9000-07-1], degradada
 Combustible para Diesel, embarcaciones (1989)
 Encurtidos de verduras (tradicionales en Asia) (1993)
 Fuel-oils, residuales (pesados) (1989)
 Gases de escape de motores, gasolina (1989)
 Gasolina (1989)
 Humos de soldadura (1990)
 Parafinas cloradas de longitud media de cadena de carbono C12 y grado medio de cloración de aproximadamente el 60 % (1990)
 Toxafeno (canfenos policlorados) [8001-35-2]
 Toxinas derivadas de *Fusarium moniliforme* (1993)

Exposiciones

Carpintería y ebanistería
 Limpieza en seco (exposiciones profesionales en) (1995)
 Manufacturas textiles (trabajo en) (1990)
 Procesos de impresión (exposiciones profesionales en) (1996)

Grupo 3: Inclasificables en cuanto a su carcinogenicidad para los humanos (480)

Agentes y grupos de agentes

Acetites isopropílicos
 Acetato de bencilo [140-11-4]
 Acetato de polivinilo [9003-20-7]
 Acetato de vinilo [108-05-4]
 Ácido acrílico [79-10-7]
 p-Acido aminobenzoico [150-13-0]
 Ácido 11-aminoundecanoico [2432-99-7]
 Ácido antranílico [118-92-3]
 Ácido dicloroacético [79-43-6] (1995)
 Ácido cis-9,10-epoxiesteárico [2443-39-2]
 Ácido hidroclórico [7647-01-0] (1992)
N-Ácido nitrosófólico [29291-35-8]
 Ácido parasóblico [10048-32-5]
 Ácido penicílico [90-65-3]
 Ácido poliacrílico [9003-01-4]
 Ácido shikímico [138-59-0]
 Ácido tánico [1401-55-4] y taninos
 Ácido tricloroacético [76-03-9] (1995)
 Acrilato de *n*-butilo [141-32-2]
 Acrilato de 2-etilhexilo [103-11-7] (1994)
 Acrilato de metilo [96-33-3]
 Acroleína [107-02-8]
 Actinomicina D [50-76-0]
 Adipato de di(2-etilhexilo) [103-23-1]
 Afolato [52-46-0]
 Agua potable clorada (1991)

- Alcohol polivinílico [9002-89-5]
 Aldicarb [116-06-3] (1991)
 Aldrin [309-00-2]
 Almizcle ambrette [83-66-9] (1996)
 Almizcle de xileno [81-15-2] (1996)
 Amaranto [915-67-3]
 Amarillo AB [85-84-7]
 Amarillo Disperse 3 [2832-40-8] (1990)
 Amarillo HC númer. 4 [59820-43-8] (1993)
 Amarillo OB [131-79-3]
 Amarillo Sunset FCF [2783-94-0]
 Amarillo Vat 4 [128-66-5] (1990)
 5-Aminoacenafteno [4657-93-6]
 2-Aminoantraquinona [117-79-3]
 1-Amino-2-metilantraquinona [82-28-0]
 2-Amino-4-nitrofenol [99-57-0] (1993)
 2-Amino-5-nitrofenol [121-88-0] (1993)
 4-Amino-2-nitrofenol [119-34-6]
 2-Amino-5-nitrotiazol [121-66-4]
 Ampicilina [69-53-4] (1990)
 Anaranjado CI Acid 3 [6373-74-6] (1993)
 Anaranjado de acridina [494-38-2]
 Anaranjado G [1936-15-8]
 Anaranjado I [523-44-4]
 Anestésicos, volátiles
 Angelicina [523-50-2] más radiación ultravioleta A
 Anhídrido succínico [108-30-5]
 Anilina [62-53-3]
 ρ -Anisidina [104-94-9]
 Antanreno [191-26-4]
 Antraceno [120-12-7]
 Antralinato de cinamilo [87-29-6]
 Aurotioglucosa [12192-57-3]
 Aziridil benzoquinona [800-24-8]
 Aziridina [151-56-4]
 2-(1-Aziridinil)etanol [1072-52-2]
 Azobenceno [103-33-3]
 Azul Brilliant FCF, sal de disodio [3844-45-9]
 Azul Evans [314-13-6]
 Azul HC númer. 2 [33229-34-4] (1993)
 Azul VRS [129-17-9]
 Benz[a]acridina [225-11-6]
 Benz[c]acridina [225-51-4]
 Benzo[c]fenantreno [195-19-7]
 Benzo[gh]fluoranteno [203-12-3]
 Benzo[a]fluoreno [238-84-6]
 Benzo[b]fluoreno [243-17-4]
 Benzo[c]fluoreno [205-12-9]
 Benzo[ghi]perileno [191-24-2]
 Benzo[e]pireno [192-97-2]
 ρ -Benzoquinona dioxima [105-11-3]
 Bis(2,3-epoxiciclopentil)éter [2386-90-5] (1989)
 Bis(2-cloroethyl)éter [111-44-4]
 Bis(2-cloro-1-metiletil)éter [108-60-1]
 1,2-Bis(clorometoxi)etano [13483-18-6]
 1,4-Bis(clorometoximetil)benceno [56894-91-8]
 Bisfenol A diglicidil éter [1675-54-3] (1989)
 Bis(2-hidroxietil)ditiocarbamato de potasio [23746-34-1]
 Bisulfitos (1992)
 Bromocloroacetonitrilo [83463-62-1] (1991)
 Bromoetano [74-96-4] (1991)
 Bromoformo [75-25-2] (1991)
 Bromuro de metilo [74-83-9]
 Butilhidroxitolueno (BHT) [128-37-0]
 γ -Butirolactona [96-48-0]
 Butoxipiperonilo [51-03-6]
- Cafeína [58-08-2] (1991)
 Cantaridina [56-25-7]
 Captan [133-06-2]
 Carbamato de metilo [598-55-0]
 Carbamato de *n*-propilo [627-12-3]
 Carbarilo [63-25-2]
 Carbazol [86-74-8]
 3-Carbetoxipsoraleno [20073-24-9]
 Carboxilato de 3,4-epoxi-6-metilciclohexilmetyl-3,4-epoxi-6-metilciclohexano [141-37-7]
 Carmoisina [3567-69-9]
 Carragenina [9000-07-1], natural
 Catecol [120-80-9]
 Ciclamatos [ciclamat de sodio, 139-05-9]
 Cicloclorotina [12663-46-6]
 Ciclohexanova [108-94-1] (1989)
 Ciclopenta[cd]pireno [27208-37-3]
 Cimetidina [51481-61-9] (1990)
 Citrato de clomifeno [50-41-9]
 Citrimina [518-75-2]
 Clofibrato [637-07-0]
 Cloral [75-87-6] (1995)
 Clordimeformo [6164-98-3]
 Clorito de sodio [7758-19-2] (1991)
 Cloroacetonitrilo [107-14-2] (1991)
 Clorobencilato [510-15-6]
 Clorodibromometano [124-48-1] (1991)
 Clorodifluorometano [75-45-6]
 Cloroetano [75-00-3] (1991)
 4-Cloro-*m*-fenilendiamina [5131-60-2]
 Clorofluorometano [593-70-4]
 3-Cloro-2-metilpropeno [563-47-3] (1995)
 Cloronitrobencenos [88-73-3; 121-73-3; 100-00-5] (1996)
 Cloropreno [126-99-8]
 Cloroprophan [101-21-3]
 Cloroquina [54-05-7]
 Clorotalonilo [1897-45-6]
 2-Cloro-1,1,1-trifluoroetano [75-88-7]
 Cloruro de acrilavina [8018-07-3]
 Cloruro de alilo [107-05-1]
 Cloruro de benzoilo [98-88-4]
 Cloruro de metilo [74-87-3]
 Cloruro de polivinilo [9002-86-2]
 Cloruro de vinilideno [75-35-4]
 Colesterol [57-88-5]
 Complejo hierro-dextrina [9004-51-7]
 Complejo hierro-sorbitol-ácido cítrico [1338-16-5]
 Copolímeros de acrilonitrilo-butadieno-estireno
 Copolímeros de cloruro de vinilideno-cloruro de vinilo [9011-06-7]
 Copolímeros de cloruro de vinilo-acetato de vinilo [9003-22-9]
 Copolímeros de estireno-acrilonitrilo [9003-54-7]
 Copolímeros de estireno-butadieno [9003-55-8]
 Coroneno [191-07-1]
 m -Cresidina [102-50-1]
 Criseno [218-01-9]
 Crisoidina [532-82-1]
 Cromo[III], compuestos de (1990)
 Cromo [7440-47-3], metálico (1990)
 Crotonaldehído [4170-30-3] (1995)
 Cumara [91-64-5]
 Dapsone [80-08-0]
 Deltametrina [52918-63-5] (1991)
 Diacetilaminoazotolueno [83-63-6]
 Dialato [2303-16-4]

- 1,2-Diamino-4-nitrobenceno [99-56-9]
 1,4-Diamino-2-nitrobenceno [5307-14-2] (1993)
 2,5-Diaminotolueno [95-70-5]
 Diazepam [439-14-5]
 Diazometano [334-88-3]
 Dibenz[a,c]antraceno [215-58-7]
 Dibenz[a,j]antraceno [224-41-9]
 Dibenzo- β -dioxina (1997)
 Dibenzodioxinas cloradas (distintas de TCDD)
 Dibeno- β -dioxinas policloradas (distintas de 2,3,7,
 8-tetra-clorodibenzo- β -dioxina) (1997)
 Dibenzo[a,e]fluoranteno [5385-75-1]
 Dibenzofuranos policlorados (1997)
 Dibenzo[h,rst]pentafeno [192-47-2]
 Dibromoacetonitrilo [3252-43-5] (1991)
 Dicloroacetileno [7572-29-4]
 Dicloroacetonitrilo [3018-12-0] (1991)
 o-Diclorobenceno [95-50-1]
 trans-1,4-Diclorobuteno [110-57-6]
 2,6-Dicloro-para-fenilendiamina [609-20-1]
 1,2-Dicloropropano [78-87-5]
 Dicofol [115-32-2]
 Dieldrin [60-57-1]
 Dietilditiocarbamato de sodio [148-18-5]
 2,4-Difenildiamina [492-17-1]
 Dihidrocloruro de manomustina [551-74-6]
 Dihidroximetilfuratrina [794-93-4]
 4,4'-Diisocianato de 3,3-dimetoxibencidina [91-93-0]
 Diisocianato de 4,4-metilendifenilo [101-68-8]
 Diisocianato de 1,5-naftaleno [3173-72-6]
 Diisocianato de polimetilenopolifenilo [9016-87-9]
 4,4'-Dimetilangelicina [22975-76-4] más radiación
 ultravioleta A
 4,5'-Dimetilangelicina [4063-41-6] más radiación
 ultravioleta A
N,N-Dimetilanilina [121-69-7] (1993)
 1,4-Dimetilfenantreno [22349-59-3]
 Dimetoxano [828-00-2]
 1,3-Dinitropireno [75321-20-9] (1989)
 Dinitrosopentametilentetramina [101-25-7]
 Dióxido de azufre [7446-09-5] (1992)
 Dióxido de titanio [13463-67-7] (1989)
 Disulfirán [97-77-8]
 Ditranol [1143-38-0]
 Doxefazepam [40762-15-0] (1996)
 Droloxiteno [82413-20-5] (1996)
 Dulcina [150-69-6]
 Endrín [72-20-8]
 Eosina [15086-94-9]
 1,2-Epoxibutano [106-88-7] (1989)
 Espironolactona [52-01-7]
 Espumas de poliuretano [9009-54-5]
 Estazolam [29975-16-4] (1996)
 Esterato de glicidilo [7460-84-6]
 Estrógenos-progestina, terapia de sustitución
 Etileno [74-85-1] (1994)
 Etionamida [536-33-4]
 Eugenol [97-53-0]
 Fenantreno [85-01-8]
 Fenicarbazida [103-03-7]
 Fenilbutazona [50-33-9]
 m-Fenilendiamina [108-45-2]
 p-Fenilendiamina [106-50-3]
 o-Fenilfenol [90-43-7]
N-Fenil-2-naftilamina [135-88-6]
 Fenol [108-95-2] (1989)
 Fenvalerato [51630-58-1] (1991)
 Ferbam [14484-64-1]
 Fibras acrílicas
 Fibras modacrílicas
 Fibrillas de p-aramida [24938-64-5] (1997)
 Filamentos de vidrio (1988)
 Fluometuron [2164-17-2]
 Fluoranteno [206-44-0]
 Fluorenó [86-73-7]
 5-Fluoruracilo [51-21-8]
 Fluoruro de vinilideno [75-38-7]
 Fluoruros (inorgánicos, empleados en el agua potable)
 Ftalato de butilbencílico [85-68-7]
 Furazolidona [67-45-8]
 Furfural [98-01-1] (1995)
 Furosemida (Frusemida) [54-31-9] (1990)
 Gemfibrozilo [25812-30-0] (1996)
 Giromitrina [16568-02-8]
 Hematites [1317-60-8]
 Hexaclorobutadieno [87-68-3]
 Hexacloroetano [67-72-1]
 Hexaclorofeno [70-30-4]
 Hidralazina [86-54-4]
 Hidrato de cloral [302-17-0] (1995)
 Hidrazida de ácido isonicotínico (isoniazida) [54-85-3]
 Hidrazida maleica [123-33-1]
 Hidroclorotiacida [58-93-5] (1990)
 Hidrocloruro de pronetalol [51-02-5]
 Hidrocloruro de semicarbazida [563-41-7]
 Hidrogenofosfito de dimetilo [868-85-9] (1990)
 Hidroquinona [123-31-9]
 4-Hidroxiazobenceno [1689-82-3]
 8-Hidroxiquinolina [148-24-3]
 8-Hidroxiquinolina de cobre [10380-28-6]
 Hidroxisenkirkina [26782-43-4]
 Hipocloritos (1991)
 Istatidina [15503-86-3]
 Isosoflamida [3778-73-2]
 Isopropanol [67-63-0]
 Isosafrol [120-58-1]
 Isotiocianato de alilo [57-06-7]
 Isovalerato de alilo [2835-39-4]
 Jacobine [6870-67-3]
 Kaempferol [520-18-3]
 d-Limoneno [5989-27-5] (1993)
 Luces fluorescentes (1992)
 Luteoskyrina [21884-44-6]
 Malatión [121-75-5]
 Malonaldehído [542-78-9]
 Maneb [12427-38-2]
 Marrón Sudan RR [6416-57-5]
 Medfalán [13045-94-8]
 Melamina [108-78-1]
 6-Mercaptoperina [50-44-2]
 Mercurio [7439-97-6] y compuestos inorgánicos de
 mercurio (1993)
 Mesilato de hicantona [23255-93-8]
 Metabisulfitos (1992)
 Metacrilato de metilo [80-62-6] (1994)
 Metacrilato de polimetilo [9011-14-7]
 5-Metilangelicina [73459-03-7] más radiación ultravioleta A
 1-Metilcriseno [3351-28-8]
 2-Metilcriseno [3351-32-4]
 3-Metilcriseno [3351-31-3]
 4-Metilcriseno [3351-30-2]
 6-Metilcriseno [1705-85-7]

- N*-Metil-*N*,4-dinitrosoanilina [99-80-9]
 4,4'-Metenobis(*N,N*-dimetil)bencenamina [101-61-1]
 1-Metilfenantreno [832-69-9]
 2-Metilfluoranteno [33543-31-6]
 3-Metilfluoranteno [1706-01-0]
 Metilgioxal [78-98-8] (1991)
N-Metilolacrilamida [90456-67-0] (1994)
 Metilparación [298-00-0]
 7-Metilpirido[3,4-c]psoraleno [85878-62-2]
 Metotrexato [59-05-2]
 Metoxicloro [72-43-5]
 Monuron [150-68-5] (1991)
 Morfolina [110-91-8] (1989)
 Mostaza de estradiol [22966-79-6]
 1,5-Naftalendiamina [2243-62-1]
 1-Naftilamina [134-32-7]
 1-Naftiltiourea (ANTU) [86-88-4]
 Nitaciida [139-94-6]
 5-Nitro-*o*-anisidina [99-59-2]
 9-Nitroantraceno [602-60-8]
 7-Nitrobenz[*a*]antraceno [20268-51-3] (1989)
 6-Nitrobenzo[*a*]pireno [63041-90-7] (1989)
 4-Nitrobifenilo [92-93-3]
 3-Nitrofluoranteno [892-21-7]
 Nitrofural (nitrosurazona) [59-87-0] (1990)
 Nitrofurantoína [67-20-9] (1990)
 1-Nitronaftaleno [86-57-7] (1989)
 2-Nitronaftaleno [581-89-5] (1989)
 3-Nitroperileno [20589-63-3] (1989)
 2-Nitropireno [789-07-1] (1989)
N-Nitrosoanabasina [37620-20-5]
N-Nitrosoanatabina [71267-22-6]
N-Nitrosodifenilamina [86-30-6]
p-Nitrosodifenilamina [156-10-5]
N-Nitrosoguvacina [55557-01-2]
N-Nitrosoguvacolina [55557-02-3]
N-Nitrosohidroxiprolina [30310-80-6]
 4-(*N*-Nitrosometilamino)-4-(3-piridil)-1-butanal (NNA) [64091-90-3]
 3-(*N*-Nitrosometilamino)propionaldehído [85502-23-4]
N-Nitrosoprolina [7519-36-0]
 5-Nitro-*o*-toluidina [99-55-8] (1990)
 Nitrovina [804-36-4]
 Nylon 6 [25038-54-4]
 Oleato de glicidilo [5431-33-4]
Opisthorchis felineus (infección con) (1994)
 Oxido de decabromodifenilo [1163-19-5] (1990)
 Oxido de hierro sacarado [8047-67-4]
 Oxido de tris(1-aziridinil)fosfina [545-55-1]
 Oxido de tris(2-metil-1-aziridinil)fosfina [57-39-6]
 Oxido férrico [1309-37-1]
 Oxifenbutazona [129-20-4]
 Palyorskita (attapulgita) [12174-11-7] (fibras cortas: menos de 5 micras) (1997)
 Paracetamol (acetaminofeno) [103-90-2] (1990)
 Paratión [56-38-2]
 Patulina [149-29-1]
 Pentacloroetano [76-01-7]
 Perileno [198-55-0]
 Permetrina [52645-53-1] (1991)
 Peróxido de benzoilo [94-36-0]
 Peróxido de hidrógeno [7722-84-1]
 Peróxido de lauroilo [105-74-8]
 Petasitenina [60102-37-6]
 Picloram [1918-02-1] (1991)
 Pireno [129-00-0]
 Pirido[3,4-*c*]psoraleno [85878-62-2]
 Pirimetamina [58-14-0]
 Pirrolidona de polivinilo [9003-39-8]
 Plomo, compuestos orgánicos [75-74-1], [78-00-2]
 Polichloropreno [9010-98-4]
 Poliestireno [9003-53-6]
 Polietileno [9002-88-4]
 Polipropileno [9003-07-0]
 Politetrafluoroetileno [9002-84-0]
 Polvo de carbón (1997)
 Ponceau SX [4548-53-2]
 Prazeepam [2955-38-6] (1996)
 Prednimustina [29069-24-7] (1990)
 Prednisona [53-03-2]
 Propham [122-42-9]
 Propileno [115-07-1] (1994)
 Ptaquilosida [87625-62-5]
 Quercetina [117-39-5]
p-Quinona [106-51-4]
 Quintoceno (pentacloronitrobenceno) [82-68-8]
 Reserpina [50-55-5]
 Resorcinol [108-46-3]
 Retrorsina [480-54-6]
 Rhodamina B [81-88-9]
 Rhodamina 6G [989-38-8]
 Riddelliína [23246-96-0]
 Rifampicina [13292-46-1]
 Ripazepam [26308-28-1] (1996)
 Rojo CI Pigment 3 [2425-85-6] (1993)
 Rojo D & C núm. 9 [5160-02-1] (1993)
 Rojo de metilo [493-52-7]
 Rojo HC núm. 3 [2871-01-4] (1993)
 Rojo Scarlet [85-83-6]
 Rojo Sudan 7B [6368-72-5]
 Rugulosina [23537-16-8]
 Sales de proflavina
 Sales de tetrakis(hidroximetil)fosfonio (1990)
Schistosoma mansoni (infección con) (1994)
 Selenac de etilo [5456-28-0]
 Selenac de metilo [144-34-3]
 Selenio [7782-49-2] y compuestos de selenio
 Senecifilina [480-81-9]
 Senkirkina [2318-18-5]
 Sepiolita [15501-74-3]
 Silice [7631-86-9], amorfa
 Simacina [122-34-9] (1991)
 Sinfitina [22571-95-5]
 Sudan I [842-07-9]
 Sudan II [3118-97-6]
 Sudan III [85-86-9]
 Sulfafurazol (sulfisoxazol) [127-69-5]
 Sulfametoxazol [723-46-6]
 Sulfato de fenelcina [156-51-4]
 Sulfato de vinblastina [143-67-9]
 Sulfato de vincristina [2068-78-2]
 Sulfitos (1992)
 Sulfonato de *p*-dimetilaminoazobencenodiazoo y sodio [140-56-7]
 Sulfuro de bis(1-aziridinil)morfolinofosfina [2168-68-5]
 Sulfuro de etileno [420-12-2]
 Talco [14807-96-6], sin fibras asbestiformes
 Telurac de etilo [20941-65-5]
 Temazepam [846-50-4] (1996)
 Teobromina [83-67-0] (1991)
 Teofilina [58-55-9] (1991)
 2,2,5,5-Tetraclorobencidina [15721-02-5]

1,1,1,2-Tetracloroetano [630-20-6]
 1,1,2,2-Tetracloroetano [79-34-5]
 Tetraclorvinfós [22248-79-9]
 Tetrafluoroetileno [116-14-3]
 Thiram [137-26-8] (1991)
 Tiouracilo [141-90-2]
 Tolueno [108-88-3] (1989)
 Tolueno de vinilo [25013-15-4] (1994)
 Toremifeno [89778-26-7] (1996)
 Toxinas derivadas de *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* y *F. crookwellense* (1993)
 Toxinas derivadas de *Fusarium sporotrichioides* (1993)
 Triclorfón [52-68-6]
 Tricloroacetonitrilo [545-06-2] (1991)
 1,1,1-Tricloroetano [71-55-6]
 1,1,2-Tricloroetano [79-00-5] (1991)
 Trietilenglicol diglidicil éter [1954-28-5]
 Trifenileno [217-59-4]
 Trifluralina [1582-09-8] (1991)
 4,4'6-Trimetilangelicina [90370-29-9] más radiación ultravioleta
 2,4,5-Trimetilanilina [137-17-7]
 2,4,6-Trimetilanilina [88-05-1]
 4,5;8-Trimetilpsoraleno [3902-71-4]
 2,4,6-Trinitrotolueno [118-96-7] (1996)
 Tris(aziridinil)-*p*-benzoquinona (triazicuona) [68-76-8]
 2,4,6-Tris(1-aziridinil)-s-triazina [51-18-3]
 Tris(2-cloroethyl)fosfato [115-96-8] (1990)
 1,2,3-Tris(clorometoxi)propano [38571-73-2]
 Trisulfuro de antimonio [1345-04-6] (1989)
 Verde Fast FCF [2353-45-9]
 Verde Guinea B [4680-78-8]
 Verde Light SF [5141-20-8]
N-Vinil-2-pirrolidona [88-12-0]
 Virus de la hepatitis D (1993)
 Virus linfotrópico de células T en humanos, tipo II (1996)
 Wollastonita [13983-17-0]
 Xileno [1330-20-7] (1989)
 2,4-Xilidina [95-68-1]
 2,5-Xilidina [95-78-3]
 Yoduro de metilo [74-88-4]
 Zectran [315-18-4]
 Zeolitas [1318-02-1] distintas de la erionita (clinoptilolita, filipsita, mordenita, zeolita japonesa no fibrosa, zeolitas sintéticas) (1997)
 Zineb [12122-67-7]
 Ziram [137-30-4] (1991)

Mezclas

Aceites minerales, muy refinados
 Betel mascado, sin tabaco
 Betunes [8052-42-4], refinados con vapor, residuo del cracking y refinados con aire
 Combustible para aviones a reacción (1989)
 Combustibles para Diesel, destilados (ligeros) (1989)
 Disolventes de petróleo (1989)
 Fuel-oils, destilados (ligeros) (1989)
 Mate (1990)
 Petróleo crudo [8002-05-9] (1989)
 Té (1991)
 Terpenos policlorados (StobaneR) [8001-50-1]
 Tintas de impresión (1996)

Exposiciones

Artículos de cuero (fabricación de)
 Cuero (curtido y elaboración del)

Industria de la madera y aserraderos (incluida la corta)
 Papel y pasta de papel (manufactura de)
 Pinturas (exposición profesional en manufactura de) (1989)
 Tintes para el pelo (uso personal) (1993)
 Vidrio plano y especial (manufactura de) (1993)

Grupo 4: Probablemente no carcinógenos para los humanos (1)

Caprolactama [105-60-2]

EVALUACION DEL RIESGO DE CARCINOGENICIDAD: OTROS ENFOQUES

Cees A. van der Heijden

Si bien los principios y métodos de la evaluación del riesgo que comportan las sustancias químicas no carcinógenas son similares en diferentes partes del mundo, llama la atención que en el caso de las sustancias carcinógenas la evaluación del riesgo se enfoca de muy diversas maneras. No sólo hay notables diferencias entre unos países y otros, sino incluso diversos organismos reguladores, comités y científicos especializados de un mismo país aplican o proponen enfoques distintos. En el caso de las sustancias no carcinógenas, la evaluación del riesgo es bastante sistemática y está relativamente consolidada debido en parte a que es una actividad más antigua y a que se conoce mejor la naturaleza de los efectos tóxicos en comparación con los de los carcinógenos, y hay por ello un alto grado de consenso y de confianza, tanto de los científicos como del público general, en los métodos que se utilizan y en sus resultados.

En el ámbito de las sustancias no carcinógenas se introdujeron factores de seguridad para compensar las incertidumbres que presentaban los datos toxicológicos (obtenidos en su mayor parte en experimentos con animales) y su aplicabilidad a poblaciones humanas grandes y heterogéneas. De esa manera, los límites recomendados o exigidos a las exposiciones humanas solían fijarse en una fracción (enfoque basado en un factor de seguridad o incertidumbre) de los niveles de exposición en animales que podían documentarse claramente como nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) o como nivel mínimo de efecto adverso observable (LOAEL). Se partía entonces de que las propiedades peligrosas de las sustancias químicas no se manifestarían mientras la exposición humana no excediera de los límites recomendados. Esta práctica, de una forma algo más perfeccionada, sigue aplicándose hoy en la evaluación de los riesgos toxicológicos de muchos tipos de sustancias.

A finales del decenio de 1960 y principios del de 1970 los órganos reguladores, empezando por los de los Estados Unidos, se enfrentaron a un problema de creciente gravedad que hizo pensar a muchos científicos que el enfoque basado en un factor de seguridad era inadecuado o incluso peligroso. Se trataba de las sustancias químicas que en determinadas condiciones se había comprobado que incrementaban el riesgo de cáncer en los humanos o en animales de experimentación. A efectos operativos, esas sustancias se denominaron carcinógenos. La definición del término "carcinógeno" sigue siendo objeto de debates y controversias, y hay numerosas opiniones distintas sobre cuáles son las técnicas idóneas para identificar y clasificar los carcinógenos y el proceso de la inducción del cáncer por sustancias químicas.

El debate se inició en realidad mucho antes, cuando en el decenio de 1940 unos científicos descubrieron que carcinógenos

químicos causaban el daño mediante un mecanismo biológico que era de un tipo totalmente distinto de los que producían otras formas de toxicidad. Esos científicos, utilizando principios derivados de la biología de los tipos de cáncer inducidos por la radiación, propusieron lo que se conoce como la hipótesis de “agentes sin umbral”, que se consideró aplicable tanto a la radiación como a las sustancias químicas carcinogénas. Se partía de la idea de que toda exposición a un carcinógeno que llega a su diana biológica crítica, especialmente el material genético, e interactúa con ella puede incrementar la probabilidad (el riesgo) de que se desarrolle el cáncer.

Al mismo tiempo que se desarrollaba el debate científico sobre la cuestión del umbral iba creciendo en la opinión pública la preocupación por la influencia nociva de los carcinógenos químicos y por la urgente necesidad de proteger a la población de una serie de enfermedades reunidas bajo el nombre colectivo de cáncer. El público general y los políticos empezaron a considerar el cáncer, con su carácter insidioso y su largo período de latencia, más los datos que indicaban que su incidencia en la población general estaba aumentando, como un problema preocupante que justificaba la máxima protección. Los responsables de la regulación se enfrentaban al hecho de que en determinadas situaciones gran número de personas, a veces casi la población entera, estaban o podían estar expuestas a niveles relativamente bajos de sustancias químicas (en productos de consumo y fármacos, en el lugar de trabajo y en el aire, el agua, los alimentos y los suelos) que se habían identificado como carcinógenos en los humanos o en animales de experimentación en condiciones de exposición relativamente intensa.

Los responsables de la regulación se enfrentaban así a dos preguntas fundamentales que, en la mayoría de los casos, no podían responderse plenamente con los métodos científicos disponibles:

1. ¿Qué riesgo hay para la salud humana en el intervalo de exposiciones a sustancias químicas que está por debajo del intervalo, relativamente intenso y estrecho, en el que el riesgo de cáncer puede medirse directamente?
2. ¿Qué se puede decir de los riesgos para la salud humana cuando sólo se han determinado los riesgos de desarrollo del cáncer en animales de experimentación?

Las instancias reguladoras reconocieron la necesidad de partir de unos determinados supuestos que unas veces tenían una base científica pero que muchas otras no se apoyaban en datos experimentales. Para dar coherencia a las distintas actividades se adoptaron definiciones y series de supuestos específicos que fueran aplicables genéricamente a todos los carcinógenos.

La carcinogénesis como proceso multifásico

Datos de diversos tipos apoyan la conclusión de que la carcinogénesis química es un proceso multifásico impulsado por el daño genético y por alteraciones epigenéticas, y esta teoría está hoy ampliamente aceptada en las comunidades científicas de todo el mundo (Barrett 1993). Aunque el proceso de la carcinogénesis química suele separarse en tres fases —iniciación, promoción y progresión—, desconocemos el número de alteraciones genéticas que intervienen en él.

La iniciación comprende la inducción de una célula irreversiblemente alterada y, en los carcinógenos genotóxicos, equivale siempre a un hecho mutacional. Ya en 1914 Theodor Boveri formuló la hipótesis de que la mutagénesis era un mecanismo de la carcinogénesis, y después se ha comprobado que estaba en lo cierto en muchos de sus supuestos y predicciones. Como la más mínima cantidad de un carcinógeno que modifica el ADN puede provocar efectos mutágenos irreversibles y autorreplicantes, se estima que no existe un umbral. La promoción es el proceso en virtud del cual la célula iniciada se expande (clonalmente) mediante una serie de divisiones y produce lesiones (pre)neoplásicas. La cuestión de si durante esta fase de promoción las células iniciadas sufren otras alteraciones genéticas es objeto de intensa controversia.

Por último, en la fase de progresión esas células consiguen “inmortalizarse”, y los tumores ya plenamente malignos pueden desarrollarse influyendo en la angiogénesis, evitando la reacción de los sistemas de control del huésped. Esta fase se caracteriza por un crecimiento invasivo y por la extensión del tumor, la mayoría de las veces en forma de metastásis. Durante la progresión se producen nuevas alteraciones genéticas debidas a la inestabilidad de las células en proliferación y de la selección.

Por consiguiente, hay tres mecanismos generales por los que una sustancia puede influir en el proceso multifásico de la carcinogenicidad. Una sustancia química puede inducir una determinada alteración genética, promover o facilitar la expansión clonal de una célula iniciada o estimular la progresión hacia la malignidad mediante cambios somáticos y/o genéticos.

Proceso de evaluación del riesgo

El riesgo puede definirse como la frecuencia predicha o efectiva de aparición de un efecto adverso en los humanos o el medio ambiente debido a una determinada exposición a un peligro. La evaluación del riesgo es un método de organizar sistemáticamente la información científica, incluidas sus incertidumbres, con miras a describir y calificar los riesgos para la salud que presentan sustancias, procesos, acciones o hechos peligrosos. Para ello es necesario evaluar la información pertinente y seleccionar los modelos que se van a emplear al extraer conclusiones de esa

Tabla 33.17 • Comparación de diversos procedimientos de extrapolación a dosis bajas.

	EPA de EE.UU. (actual)	Dinamarca	CEE	Reino Unido	Países Bajos	Noruega
Carcinógenos genotóxicos	Procedimiento multifásico lineal con el modelo de dosis bajas más apropiado	MLE a partir de modelos 1-hit y 2-hit más decisión del mejor resultado	No se especifica procedimiento	Sin modelo, experiencia y juicio científicos a partir de todos los datos disponibles	Modelo lineal con DT ₅₀ (método Peto) o “Método Holandés Simple” si no hay DT ₅₀	No se especifica procedimiento
Carcinógenos no genotóxicos	Igual que arriba	Modelo biológico de Thorslund o modelo multifásico o de Mantel-Bryan, basado en el origen del tumor y la relación dosis-respuesta	NOAEL y factores de seguridad	NOEL y factores de seguridad para establecer la ingesta diaria admisible (IDA)	NOEL y factores de seguridad para establecer la IDA	

información. Es asimismo necesario reconocer explícitamente las incertidumbres y aceptar plenamente la posibilidad de que haya otras interpretaciones de los datos disponibles que sean científicamente plausibles. La terminología que se utiliza hoy en materia de evaluación del riesgo la propuso en 1984 la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos. Lo que antes era la evaluación cualitativa del riesgo se empezó a denominar caracterización/identificación de los peligros, y la evaluación cuantitativa se dividió en varios componentes: relación dosis-respuesta, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.

En la sección siguiente se analizarán brevemente estos componentes desde el punto de vista de los conocimientos actuales del proceso de la carcinogénesis (química). Se observará con claridad que la principal incertidumbre que persiste en la evaluación del riesgo de carcinogenicidad es la que plantea la relación dosis-respuesta a niveles de dosis bajos, que son los característicos de la exposición ambiental.

Identificación de los peligros

En este proceso se identifican los compuestos potencialmente carcinógenos para los humanos —en otras palabras, se identifican sus propiedades genotóxicas intrínsecas. La clasificación de los compuestos carcinógenos se efectúa combinando información procedente de distintas fuentes y relativa a distintas propiedades. En general se suele utilizar la información siguiente:

- Datos epidemiológicos (por ejemplo, sobre el cloruro de vinilo, el arsénico o el amianto).
- Datos sobre carcinogenicidad en animales.
- Actividad genotóxica/formación de aductos de ADN.
- Mecanismos de acción.
- Actividad farmacocinética.
- Relaciones estructura-actividad.

La clasificación de las sustancias químicas en grupos con arreglo a una evaluación de la calidad de la evidencia de carcinogénesis en animales o en el hombre, cuando se dispone de datos epidemiológicos, es un proceso clave de la identificación de los peligros. Los sistemas más conocidos para clasificar las sustancias químicas carcinógenas en categorías son los de la IARC (1987), la UE (1991) y la EPA (1986). En la Tabla 33.17 se resumen los criterios de clasificación que emplean estos organismos (por ejemplo, métodos de extrapolación a dosis bajas).

Una cuestión importante a la hora de clasificar los carcinógenos que tiene a veces consecuencias de gran alcance para su regulación es la distinción entre mecanismos de acción genotóxicos y no genotóxicos. En los Estados Unidos, la EPA parte por defecto de que, respecto de todas las sustancias que muestran actividad carcinógena en experimentos con animales, no existe umbral (o al menos no puede demostrarse la existencia de un umbral), de manera que en cualquier exposición hay algo de riesgo. Se suele decir así que los compuestos genotóxicos (los que dañan el ADN) son compuestos “sin umbral”. La UE y muchos de sus miembros, como el Reino Unido, los Países Bajos y Dinamarca, establecen una distinción entre unos carcinógenos que son genotóxicos y otros de los que se piensa que producen tumores por mecanismos no genotóxicos. En el caso de los genotóxicos se utilizan procedimientos de estimación cuantitativa de la relación dosis-respuesta que parten de que no existe un umbral, aunque los procedimientos son a veces distintos de los que utiliza la EPA. En el caso de las sustancias no genotóxicas se estima que sí existe un umbral, y se parte de ese supuesto en los procedimientos que se utilizan para evaluar la relación dosis-respuesta. En este último caso, la evaluación del riesgo suele

basarse en el empleo de un factor de seguridad, similar al que se aplica a las sustancias no carcinógenas.

Es importante tener en cuenta que estos sistemas distintos se desarrollaron para evaluar el riesgo en contextos y circunstancias diferentes. El sistema de la IARC no se creó con fines de regulación, aunque se ha utilizado como base para formular directrices en ese ámbito. La EPA pretendió que su sistema sirviera para determinar el momento en que se debía adoptar la decisión de realizar evaluaciones cuantitativas del riesgo, mientras que el sistema de la UE se utiliza actualmente para incluir un símbolo de peligro (clasificación) y unas determinadas advertencias sobre el riesgo en la etiqueta de la sustancia. Se analiza con más amplitud esta cuestión en un estudio reciente (Mooleenaar 1994) sobre los procedimientos que utilizan ocho organismos gubernamentales y dos organizaciones independientes que se citan con frecuencia, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) y la Conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno (ACGIH).

En general, los sistemas de clasificación no tienen en cuenta la amplia evidencia negativa de la que se suele disponer. Asimismo, en los últimos años se ha empezado a entender mucho mejor el mecanismo de acción de los carcinógenos. Se han ido acumulando datos que indican que algunos mecanismos de la carcinogenicidad son específicos de especies y no actúan en el hombre. Veamos algunos ejemplos de este importante fenómeno. En primer lugar, se ha demostrado recientemente, en estudios sobre la carcinogenicidad de las partículas diésel, que las ratas responden con tumores de pulmón a una fuerte carga de partículas en ese órgano. Sin embargo, no se observa cáncer de pulmón en mineros del carbón cuyos pulmones presentan cargas de partículas muy fuertes. En segundo lugar, se ha afirmado que los tumores renales en la rata macho no son significativos para el hombre, pues el elemento clave de esa respuesta “tumorgénica” es la acumulación en el riñón de α -2 microglobulina, proteína que no existe en los humanos (Borghoff, Short y Swenberg 1990). También hay que mencionar a este respecto los trastornos de la función tiroidea en los roedores y la proliferación de peroxisomas o mitogénesis en el hígado del ratón.

Estos avances permiten interpretar con más precisión los resultados de un bioensayo de carcinogenicidad. Se están fomentando los estudios encaminados a conocer mejor los mecanismos de acción de la carcinogenicidad, pues es posible que gracias a ellos se pueda modificar el sistema de clasificación añadiéndole la categoría de sustancias no carcinógenas para los humanos.

Evaluación de la exposición

Suele pensarse que la evaluación de la exposición es el componente de la evaluación del riesgo que tiene menos incertidumbre intrínseca debido a que en algunos casos se pueden vigilar las exposiciones y a que se dispone de modelos relativamente bien validados. Pero ello es verdad sólo en parte, pues muchas de las evaluaciones de la exposición no se realizan aprovechando plenamente los distintos tipos de información disponibles. Por esa razón, sigue habiendo muchas posibilidades de mejorar las estimaciones de distribución de la exposición. Ello es así tanto en las evaluaciones de la exposición externa como en las de la exposición interna. Especialmente en el caso de los carcinógenos, el empleo de dosis en tejidos diana en vez de niveles de exposición externa para elaborar modelos sobre las relaciones dosis-respuesta permitiría realizar predicciones del riesgo más precisas, a pesar de que es necesario partir de muchos valores por defecto. Los modelos farmacocinéticos de base fisiológica para determinar la cantidad de metabolitos reactivos que llegan al tejido diana tienen potencialmente una gran utilidad para estimar esas dosis tisulares.

Caracterización del riesgo

Enfoques actuales

El nivel de dosis o de exposición que provoca un efecto en un estudio con animales y la dosis probable que provoca un efecto similar en los humanos son un elemento clave de la caracterización del riesgo. Hay que evaluar la relación dosis-respuesta desde las dosis altas hasta las bajas y efectuar extrapolaciones entre especies. La extrapolación plantea un problema lógico, que es que los datos se extrapolan muchos órdenes de magnitud por debajo de los niveles de exposición experimentales, mediante modelos empíricos que no reflejan los mecanismos subyacentes de carcinogenicidad. Ello es contrario a un principio básico de la adaptación de modelos empíricos, que es no extrapolarse fuera del intervalo de los datos observables. Por consiguiente, esa extrapolación empírica produce grandes incertidumbres, tanto desde el punto de vista estadístico como desde el biológico. No hay en la actualidad ningún procedimiento matemático que esté aceptado como el más idóneo para efectuar extrapolaciones a dosis bajas en materia de carcinogénesis. Los modelos matemáticos que se han utilizado para describir la relación entre la dosis externa administrada, el tiempo y la incidencia del tumor se basan en supuestos de distribución de la tolerancia o en supuestos mecanicistas, y a veces en ambas cosas a la vez. En la Tabla 33.18 figura un resumen de los modelos que se citan con más frecuencia (Kramer y cols. 1995).

Esos modelos de dosis-respuesta suelen aplicarse a datos sobre incidencia de tumores que corresponden a un número sólo limitado de dosis experimentales. Ello se debe al diseño normalizado del bioensayo que se utiliza. En vez de determinar la curva de dosis-respuesta completa, los estudios de carcinogenicidad suelen limitarse a tres (o dos) dosis relativamente altas, tomando como dosis más alta la dosis máxima tolerada (DMT). Esas dosis altas se utilizan para compensar el bajo nivel intrínseco de sensibilidad estadística de los bioensayos (del 10 al 15 % con respecto a la base), debido a que, por razones prácticas y de otro tipo, se utiliza un número de animales relativamente reducido. Como no se dispone de datos para la región de dosis bajas (es decir, no pueden determinarse experimentalmente), es necesario extrapolarse fuera del intervalo de observación. Respecto de casi todos los conjuntos de datos, la mayoría de los modelos antes enumerados se adapta igualmente bien al intervalo de dosis observado, debido al limitado número de dosis y animales. No obstante, en la región de dosis bajas esos modelos ofrecen divergencias de varios órdenes de magnitud, con lo que introducen grandes incertidumbres en el riesgo estimado para esos niveles de exposición bajos.

Como la forma real de la curva de dosis-respuesta en el intervalo de dosis bajas no puede generarse experimentalmente, para poder distinguir a este respecto entre los diversos modelos es esencial conocer los elementos mecanicistas del proceso de carcinogenicidad.

En numerosas revistas se discuten y se estudian con detalle los diversos aspectos de los diferentes modelos matemáticos de extrapolación Kramer y cols. (1995) y Park y Hawkins (1993).

Otros enfoques

Recientemente se han propuesto otros enfoques que se alejan de la práctica actual de elaboración de modelos matemáticos.

Modelos de base biológica

Los modelos de base biológica, como los de Moolgavkar-Venzon-Knudson (MVK), son hoy muy prometedores, pero por el momento no están lo suficientemente avanzados para utilizarlos

Tabla 33.18 • Modelos más citados de caracterización del riesgo de carcinogenicidad.

Modelos de distribución de la tolerancia	Modelos mecanicistas	
	Modelos hit	Modelos biológicos
Logit	One-hit	Moolgavkar (MVK) ¹
Probit	Multihit	Cohen y Ellwein
Mantel-Bryan	Weibull (Pike) ¹	
Weibull	Multifásico (Armitage-Doll) ¹	
Gamma Multihit	Multifásico lineal	

¹ Modelos basados en el tiempo hasta el tumor.

de manera habitual y exigen mucha más información específica de la que proporcionan actualmente los bioensayos. Estudios amplios (4.000 ratas) como los realizados sobre las N-nitrosoalquilaminas indican el tamaño del estudio que se precisa para la recogida de tales datos, aunque pese a ello sigue sin ser posible extrapolar a dosis bajas. Mientras no se desarrollen más estos modelos sólo pueden utilizarse para estimaciones caso por caso.

Enfoque basado en el factor de evaluación

El empleo de modelos matemáticos para realizar extrapolaciones por debajo del intervalo de dosis experimental equivale en la práctica al sistema que se basa en la utilización de un factor de seguridad, con un factor de incertidumbre amplio y mal definido. La alternativa más sencilla sería aplicar el factor de evaluación al “nivel sin efecto” aparente o al “nivel mínimo ensayado”. El nivel que se utiliza para ese factor de evaluación debe determinarse caso por caso teniendo en cuenta la naturaleza de la sustancia química y la población expuesta.

Dosis fija (BMD)

Este enfoque se basa en un modelo matemático adaptado a los datos experimentales incluidos en el intervalo observable para estimar o interpolar una dosis correspondiente a un nivel de efecto definido, como un incremento del 1, el 5 o el 10 % en la incidencia de tumores (DE_{01} , DE_{05} , DE_{10}). Como un incremento del 10 % es más o menos el cambio mínimo que puede determinarse estadísticamente en un bioensayo normalizado, la DE10 es apropiada para datos sobre el cáncer. Utilizando una dosis fija (BMD, “benchmark dose”) situada dentro del intervalo observable del experimento se evitan los problemas que plantea la extrapolación de dosis. Las estimaciones de la BMD o de su límite de confianza inferior reflejan las dosis a las que se modifica la incidencia de tumores, pero son bastante insensibles al modelo matemático que se utilice. Este tipo de dosis puede utilizarse en la evaluación del riesgo como una medida de la potencia del tumor y, combinada con factores de valoración apropiados, para establecer niveles aceptables de la exposición humana.

Umbral de regulación

Krewski y cols. (1990) han estudiado el concepto de un “umbral de regulación” en el caso de los carcinógenos químicos. A partir de información contenida en la base de datos sobre la potencia de los carcinógenos (CPDB) respecto de 585 experimentos, la dosis correspondiente a un riesgo de 10-6 presentaba una distribución logarítmica más o menos normal en torno a una mediana de 70 a 90 ng/kg/d. Las exposiciones a niveles de dosis superiores a ese intervalo se considerarían inaceptables. La dosis se estimó mediante extrapolación lineal a partir de la DT_{50} (la dosis que induce toxicidad en el 50 % de los animales del ensayo) y

estaba dentro de un factor de cinco a diez de la cifra obtenida con el modelo multifásico lineal. Por desgracia, los valores de DT₅₀ estarán relacionados con la DMT, lo que una vez más arroja dudas sobre la validez de la medición. No obstante, la DT₅₀ estará muchas veces dentro del intervalo de los datos experimentales o muy cerca de él.

Este enfoque basado en el empleo de un umbral de regulación exigirá, antes de plantearse su utilización, que se examinen mucho más a fondo cuestiones biológicas, analíticas y matemáticas, y que se disponga de una base de datos mucho más amplia. Nuevas investigaciones sobre las potencias de diversos carcinógenos pueden arrojar más luz sobre este ámbito.

Objetivos y futuro de la evaluación del riesgo de carcinógenos

Si echamos la vista atrás a las expectativas originales de la regulación de los carcinógenos (ambientales), que eran conseguir una importante reducción del cáncer, podríamos decir que los resultados son al día de hoy decepcionantes. Con el paso de los años se fue comprobando que el número de casos de cáncer que se consideraban debidos a carcinógenos que podían ser objeto de regulación era desconcertantemente reducido. En relación con las grandes expectativas que impulsaron las actividades de regulación en el decenio de 1970, no se ha conseguido el objetivo previsto de reducir de manera importante la tasa de mortalidad por cáncer en cuanto a los efectos estimados de los carcinógenos ambientales, ni siquiera utilizando procedimientos de evaluación cuantitativa sumamente conservadores. La característica principal de los procedimientos de la EPA es que las extrapolaciones a dosis bajas se efectúan de la misma manera para todas las sustancias químicas, con independencia del mecanismo de formación de tumores que se observe en los estudios experimentales. Hay

que señalar, no obstante, que este enfoque contrasta radicalmente con los adoptados por otros organismos gubernamentales. Como ya se ha indicado, la UE y varios gobiernos europeos —Alemania, Dinamarca, Francia, Italia, Países Bajos, Reino Unido, Suecia, Suiza— distinguen entre carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos, y enfocan la estimación del riesgo de una manera distinta en una y otra categoría. En general, los carcinógenos no genotóxicos se tratan como tóxicos con umbral. No se determinan niveles de efecto, y se utilizan factores de incertidumbre para establecer un amplio margen de seguridad. Determinar si una sustancia química debe considerarse o no genotóxica es una cuestión propia de los debates científicos y exige el juicio atinado de los expertos.

La cuestión fundamental es la siguiente: ¿qué es lo que causa el cáncer en los humanos, y qué papel desempeñan a ese respecto los carcinógenos ambientales? Los aspectos hereditarios del cáncer en los humanos son mucho más importantes de lo que antes se preveía. La clave para conseguir avances significativos en la evaluación del riesgo de carcinogenicidad es conocer mejor las causas y mecanismos del cáncer. Los estudios sobre el cáncer están entrando en unos terrenos de extraordinario interés. La investigación molecular puede modificar radicalmente la forma en que entendemos la influencia de los carcinógenos ambientales y los enfoques del control y la prevención del cáncer, tanto en el medio ambiente general como en el lugar de trabajo. La evaluación del riesgo de carcinogenicidad ha de basarse en una comprensión de los mecanismos de acción que no estamos más que empezando a adquirir. Uno de los aspectos importantes es el del mecanismo del cáncer heredable y la interacción de los carcinógenos con ese proceso. Esos conocimientos tendrán que incorporarse a la metodología sistemática y coherente que ya existe para la evaluación del riesgo de carcinogenicidad.

Referencias

- Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). 1992. *Solar and ultraviolet radiation*. Lyon: IARC.
- . 1993. *Occupational Exposures of Hairdressers and Barbers and Personal Use of Hair Colourants: Some Hair Dyes, Cosmetic Colourants, Industrial Dyestuffs and Aromatic Amines*. Lyon: IARC.
- . 1994a. *Preamble*. Lyon: IARC.
- . 1994b. *Some Industrial Chemicals*. Lyon: IARC.
- Andersen, KE, HI Maibach. 1985. Contact allergy predictive tests on guinea pigs. Capítulo 14 en *Current Problems in Dermatology*. Basilea: Karger.
- Ashby, J, RW Tennant. 1991. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP. *Mutat Res* 257:229-306.
- Barlow, S, F Sullivan. 1982. *Reproductive Hazards of Industrial Chemicals*. Londres: Academic Press.
- Barrett, JC. 1993a. Mechanisms of action of known human carcinogens. En *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*, dirigido por H Vainio, PN Magee, DB McGregor y AJ McMichael. Lyon: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC).
- . 1993b. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Persp* 100:9-20.
- Bernstein, ME. 1984. Agents affecting the male reproductive system: Effects of structure on activity. *Drug Metab Rev* 15:941-996.
- Beutler, E. 1992. The molecular biology of G6PD variants and other red cell defects. *Annu Rev Med* 43:47-59.
- Bloom, AD. 1981. *Guidelines for Reproductive Studies in Exposed Human Populations*. White Plains, Nueva York: March of Dimes Foundation.
- Borghoff, S, B Short, J Swenberg. 1990. Biochemical mechanisms and pathobiology of α -2-globulin nephropathy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:349.
- Burchell, B, DW Nebert, DR Nelson, KW Bock, T Iyanagi, PLM Jansen, D Lancet, GJ Mulder, JR Chowdhury, G Siest, TR Tephly, PI Mackenzie. 1991. The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily: Suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol* 10:487-494.
- Burleson, G, A Munson, J Dean. 1995. *Modern Methods in Immunotoxicology*. Nueva York: Wiley.
- Capecchi, M. 1994. Targeted gene replacement. *Sci Am* 270:52-59.
- Carney, EW. 1994. An integrated perspective on the developmental toxicity of ethylene glycol. *Rep Toxicol* 8:99-113.
- Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP). 1965. *Principles of Environmental Monitoring Related to the Handling of Radioactive Materials. Report of Committee IV of The International Commission On Radiological Protection*. Oxford: Pergamon.
- Dean, JH, MI Luster, AE Munson, I Kimber. 1994. *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. Nueva York: Raven Press.
- Descombes, J. 1986. *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals*. Amsterdam: Elsevier.
- Devary, Y, C Rosette, JA DiDonato, M Karin. 1993. NFkB activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* 261:1442-1445.
- Dixon, RL. 1985. *Reproductive Toxicology*. Nueva York: Raven Press.
- Duffus, JH. 1993. Glossary for chemists of terms used in toxicology. *Pure Appl Chem* 65:2003-2122.
- Elsenhans, B, K Schuemann, W Forth. 1991. Toxic metals: Interactions with essential metals. En *Nutrition, Toxicity and Cancer*, dirigido por IR Rowland. Boca Ratón: CRC Press.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1992. Guidelines for exposure assessment. *Federal Reg* 57:22888-22938.
- . 1993. Principles of neurotoxicity risk assessment. *Federal Reg* 58:41556-41598.
- . 1994. *Guidelines for Reproductive Toxicity Assessment*. Washington, DC: US EPA: Office of Research and Development.
- Ferguson, JE. 1990. The Heavy Elements. Chap. 15 in *Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Oxford: Pergamon.
- Gehring, PJ, PG Watanabe, GE Blau. 1976. Pharmacokinetic studies in evaluation of the toxicological and environmental hazard of chemicals. *New Concepts Saf Eval* 1(Parte 1, Capítulo 8):195-270.
- Goldstein, JA, SMF de Moraes. 1994. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 4:285-299.
- Gonzalez, FJ. 1992. Human cytochromes P450: Problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 13:346-352.
- Gonzalez, FJ, CL Crespi, HV Gelboin. 1991. cDNA-expressed human cytochrome P450: A new age in molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat Res* 247:113-127.
- Gonzalez, FJ, DW Nebert. 1990. Evolution of the P450 gene superfamily: Animal-plant “warfare,”

- molecular drive, and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6:182-186.
- Grant, DM. 1993. Molecular genetics of the N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 3:45-50.
- Gray, LE, J Ostby, R Sigmon, J Ferrel, R Linder, R Cooper, J Goldman, J Laskey. 1988. The development of a protocol to assess reproductive effects of toxicants in the rat. *Rep Toxicol* 2:281-287.
- Guengerich, FP. 1989. Polymorphism of cytochrome P450 in humans. *Trends Pharmacol Sci* 10:107-109.
- . 1993. Cytochrome P450 enzymes. *Am Sci* 81:440-447.
- Hansch, C, A Leo. 1979. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. Nueva York: Wiley.
- Hansch, C, L Zhang. 1993. Quantitative structure-activity relationships of cytochrome P450. *Drug Metab Rev* 25:1-48.
- Hayes AW. 1988. *Principles and Methods of Toxicology*. 2^a ed. Nueva York: Raven Press.
- Heindell, JJ, RE Chapin. 1993. *Methods in Toxicology: Male and Female Reproductive Toxicology*. Vol. 1 y 2. San Diego, California: Academic Press.
- Johanson, G, PH Naslund. 1988. Spreadsheet programming - a new approach in physiologically based modeling of solvent toxicokinetics. *Toxicol Letters* 41:115-127.
- Johnson, BL. 1978. *Prevention of Neurotoxic Illness in Working Populations*. Nueva York: Wiley.
- Jones, JC, JM Ward, U Mohr, RD Hunt. 1990. *Hematopoietic System, ILSI Monograph*, Berlin: Springer Verlag.
- Kalow, W. 1962. *Pharmacogenetics: Heredity and the Response to Drugs*. Filadelfia: WB Saunders.
- . 1992. *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. Nueva York: Pergamon.
- Kammüller, ME, N Bloksma, W Seinen. 1989. *Autoimmunity and Toxicology. Immune Dysregulation Induced By Drugs and Chemicals*. Amsterdam: Elsevier Sciences.
- Kawajiri, K, J Watanabe, SI Hayashi. 1994. Genetic polymorphism of P450 and human cancer. En *Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*, dirigido por MC Lechner. París: John Libbey Eurotext.
- Kehrer, JP. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23:21-48.
- Kellerman, G, CR Shaw, M Luyten-Kellerman. 1973. Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. *New Engl J Med* 289:934-937.
- Khera, KS. 1991. Chemically induced alterations maternal homeostasis and histology of conceptus: Their etiologic significance in rat fetal anomalies. *Teratology* 44:259-297.
- Kimmel, CA, GL Kimmel, V Frankos. 1986. Interagency Regulatory Liaison Group workshop on reproductive toxicity risk assessment. *Environ Health Persp* 66:193-221.
- Klaassen, CD, MO Amdur, J Doull (dirs.). 1991. *Casarett and Doull's Toxicology*. Nueva York: Pergamon Press.
- Kramer, HJ, EJHM Jansen, MJ Zeilmaker, HJ van Kransen, ED Kroese. 1995. Quantitative methods in toxicology for human dose-response assessment. *RIVM-report nr. 659101004*.
- Kress, S, C Sutter, PT Strickland, H Mukhtar, J Schweizer, M Schwarz. 1992. Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res* 52:6400-6403.
- Krewski, D, D Gaylor, M Szyazkowicz. 1991. A model-free approach to low-dose extrapolation. *Env H Pers* 90:270-285.
- Lawton, MP, T Cresteil, AA Elfarra, E Hodgson, J Ozols, RM Philpot, AE Rettie, DE Williams, JR Cashman, CT Dolphin, RN Hines, T Kimura, IR Phillips, LL Poulsen, EA Shephare, DM Ziegler. 1994. A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities. *Arch Biochem Biophys* 308:254-257.
- Lewalter, J, U Korallus. 1985. Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. New findings on biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 56:179-196.
- Majno, G, I Joris. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.
- Mattison, DR, PJ Thomford. 1989. The mechanism of action of reproductive toxicants. *Toxicol Pathol* 17:364-376.
- Meyer, UA. 1994. Polymorphisms of cytochrome P450 CYP2D6 as a risk factor in carcinogenesis. En *Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*, dirigido por MC Lechner. París: John Libbey Eurotext.
- Moller, H, H Vainio, E Heseltine. 1994. Quantitative estimation and prediction of risk at the International Agency for Research on Cancer. *Cancer Res* 54:3625-3627.
- Moolenaar, RJ. 1994. Default assumptions in carcinogen risk assessment used by regulatory agencies. *Regul Toxicol Pharmacol* 20:135-141.
- Moser, VC. 1990. Screening approaches to neurotoxicity: A functional observational battery. *J Am Coll Toxicol* 1:85-93.
- National Research Council (NRC). 1983. *Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process*. Washington, DC: NAS Press.
- . 1989. *Biological Markers in Reproductive Toxicity*. Washington, DC: NAS Press.
- . 1992. *Biologic Markers in Immunotoxicology*. Subcommittee on Toxicology. Washington, DC: NAS Press.
- Nebert, DW. 1988. Genes encoding drug-metabolizing enzymes: Possible role in human disease. En *Phenotypic Variation in Populations*, dirigido por AD Woodhead, MA Bender y RC Leonard. Nueva York: Plenum Publishing.
- . 1994. Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem Pharmacol* 47:25-37.
- Nebert, DW, WW Weber. 1990. Pharmacogenetics. En *Principles of Drug Action. The Basis of Pharmacology*, dirigido por PB Pratt y PW Taylor. Nueva York: Churchill-Livingstone.
- Nebert, DW, DR Nelson. 1991. P450 gene nomenclature based on evolution. En *Methods of Enzymology. Cytochrome P450*, dirigido por MR Waterman y EF Johnson. Orlando, Florida: Academic Press.
- Nebert, DW, RA McKinnon. 1994. Cytochrome P450: Evolution and functional diversity. *Prog Liv Dis* 12:63-97.
- Nebert, DW, M Adensnik, MJ Coon, RW Estabrook, FJ Gonzalez, FP Guengerich, IC Gunsalus, EF Johnson, B Kemper, W Levin, IR Phillips, R Sato, MR Waterman. 1987. The P450 gene superfamily: Recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 6:1-11.
- Nebert, DW, DR Nelson, MJ Coon, RW Estabrook, R Feyereisen, Y Fujii-Kuriyama, FJ Gonzalez, FP Guengerich, IC Gunsalus, EF Johnson, JC Loper, R Sato, MR Waterman, DJ Waxman. 1991. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 10:1-14.
- Nebert, DW, DD Petersen, A Puga. 1991. Human AH locus polymorphism and cancer: Inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. *Pharmacogenetics* 1:68-78.
- Nebert, DW, A Puga, V Vasiliou. 1993. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann NY Acad Sci* 685:624-640.
- Nelson, DR, T Kamataki, DJ Waxman, FP Guengerich, RW Estabrook, R Feyereisen, FJ Gonzalez, MJ Coon, IC Gunsalus, O Gotoh, DW Nebert, K Okuda. 1993. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12:1-51.
- Nicholson, DW, A All, NA Thornberry, JP Vaillancourt, CK Ding, M Gallant, Y Gareau, PR Griffin, M Labelle, YA Lazebnik, NA Munday, SM Raju, ME Smulson, TT Yamin, VL Yu, DK Miller. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43.
- Nolan, RJ, WT Stott, PG Watanabe. 1995. Toxicologic data in chemical safety evaluation. Capítulo 2 en *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, dirigido por LJ Cralley, LV Cralley y JS Bus. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Nordberg, GF. 1976. *Effect and Dose-Response Relationships of Toxic Metals*. Amsterdam: Elsevier.
- Office of Technology Assessment (OTA). 1985. *Reproductive Hazards in the Workplace*. Documento núm. OTA-BA-266. Washington, DC: Government Printing Office.
- . 1990. *Neurotoxicity: Identifying and Controlling Poisons of the Nervous System*. Documento núm. OTA-BA-436. Washington, DC: Government Printing Office.
- Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE). 1993. *US EPA/EC Joint Project On the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships*. París: OCDE.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1980. *Recommended Health-Based Limits in Occupational Exposure to Heavy Metals*. Technical Report Series, No. 647. Ginebra: OMS.
- . 1986. *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated With Exposure to Chemicals*. Environmental Health Criteria, No.60. Ginebra: OMS.
- . 1987. *Air Quality Guidelines for Europe*. European Series, No. 23. Copenhague: Publicaciones Regionales de la OMS.
- . 1989. *Glossary of Terms On Chemical Safety for Use in IPCS Publications*. Ginebra: OMS.
- . 1993. *The Derivation of Guidance Values for Health-Based Exposure Limits*. Environmental Health Criteria, borrador no publicado. Ginebra: OMS.
- Park, CN, NC Hawkins. 1993. Technology review; an overview of cancer risk assessment. *Toxicol Methods* 3:63-86.
- Pease, W, J Vandenberg, WK Hooper. 1991. Comparing alternative approaches to establishing regulatory levels for reproductive toxicants: DBCP as a case study. *Environ Health Persp* 91:141-155.
- Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS). 1991. *Principles and Methods for the Assessment of Nephrotoxicity Associated With Exposure to Chemicals, EHC 119*. Ginebra: OMS.
- . 1996. *Principles and Methods for Assessing Direct Immunotoxicity Associated With Exposure to Chemicals, EHC 180*. Ginebra: OMS.
- Prpić-Majić, D, S Telišman, S Kežić. 1984. In vitro study on lead and alcohol interaction and the inhibition of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase in man. *Scand J Work Environ Health* 10:235-238.
- Reitz, RH, RJ Nolan, AM Schumann. 1987. Development of multispecies, multiroute pharmacokinetic models for methylene chloride

- and 1,1,1-trichloroethane. In *Pharmacokinetics and Risk Assessment, Drinking Water and Health*. Washington, DC: National Academy Press.
- Roitt, I, J Brostoff, D Male. 1989. *Immunology*. Londres: Gower Medical Publishing.
- Sato, A. 1991. The effect of environmental factors on the pharmacokinetic behaviour of organic solvent vapours. *Ann Occup Hyg* 35:525-541.
- Silbergeld, EK. 1990. Developing formal risk assessment methods for neurotoxicants: An evaluation of the state of the art. En *Advances in Neurobehavioral Toxicology*, dirigido por BL Johnson, WK Anger, A Durao y C Xintaras. Chelsea, Michigan: Lewis.
- Spencer, PS, HH Schaumberg. 1980. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Sweeney, AM, MR Meyer, JH Aarons, JL Mills, RE LePorte. 1988. Evaluation of methods for the prospective identification of early fetal losses in environmental epidemiology studies. *Am J Epidemiol* 127:843-850.
- Taylor, BA, HJ Heiniger, H Meier. 1973. Genetic analysis of resistance to cadmium-induced testicular damage in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 143:629-633.
- Telišman, S. 1995. Interactions of essential and/or toxic metals and metalloids regarding interindividual differences in susceptibility to various toxicants and chronic diseases in man. *Arh rada toksikol* 46:459-476.
- Telišman, S, A Pinent, D Prpić-Majić. 1993. Lead interference in zinc metabolism and the lead and zinc interaction in humans as a possible explanation of apparent individual susceptibility to lead. En *Heavy Metals in the Environment*, dirigido por RJ Allan y JO Nriagu. Edimburgo: CEP Consultants.
- Telišman, S, D Prpić-Majić, S Kežić. 1984. In vivo study on lead and alcohol interaction and the inhibition of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase in man. *Scand J Work Environ Health* 10:239-244.
- Tilson, HA, PA Cabe. 1978. Strategies for the assessment of neurobehavioral consequences of environmental factors. *Environ Health Persp* 26:287-299.
- Trump, BF, AU Arstila. 1971. Cell injury and cell death. En *Principles of Pathobiology*, dirigido por MF LaVia y RB Hill Jr. Nueva York: Oxford Univ. Press.
- Trump, BF, IK Berezesky. 1992. The role of cytosolic Ca²⁺ in cell injury, necrosis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 4:227-232.
- . 1995. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 9:219-228.
- Trump, BF, IK Berezesky, A Osornio-Vargas. 1981. Cell death and the disease process. The role of cell calcium. En *Cell Death in Biology and Pathology*, dirigido por ID Bowen y RA Lockshin. Londres: Chapman & Hall.
- Vos, JG, M Younes, E Smith. 1995. *Allergic Hyper-sensitivities Induced by Chemicals: Recommendations for Prevention Published on Behalf of the World Health Organization Regional Office for Europe*. Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Weber, WW. 1987. *The Acetylator Genes and Drug Response*. Nueva York: Oxford Univ. Press.
- Wyllie, AH, JFR Kerr, AR Currie. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
- Otras lecturas recomendadas**
- Albert, RE. 1994. Carcinogen risk assessment in the US Environmental Protection Agency. *Crit. Rev. Toxicol* 24:75-85.
- Alberts, B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts, JD Watson. 1988. *Molecular Biology of the Cell*. Nueva York: Garland Publishing.
- Ariens, EJ. 1964. *Molecular Pharmacology*. Vol.1. Nueva York: Academic Press.
- Ariens, EJ, E Mutschler, AM Simonis. 1978. *Allgemeine Toxicologie [General Toxicology]*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Ashby, J, RW Tennant. 1994. Prediction of rodent carcinogenicity for 44 chemicals: Results. *Mutagenesis* 9:7-15.
- Ashford, NA, CJ Spadafor, DB Hattis, CC Caldart. 1990. *Monitoring the Worker for Exposure and Disease*. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press.
- Balabuha, NS, GE Fradkin. 1958. *Nakoplenie radioaktivnykh elementov v organizme I ih vvedenie [Acumulación de elementos radiactivos en el organismo y su excreción]*. Moscú: Medgiz.
- Balls, M, J Bridges, J Southee. 1991. *Animals and Alternatives in Toxicology Present Status and Future Prospects*. Nottingham, Reino Unido: The Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments.
- Berlin, A, J Dean, MH Draper, EMB Smith, F Spreafico. 1987. *Immunotoxicology*. Dordrecht: Martinus Nijhoff.
- Boyhoux, A. 1974. *Breathing*. Nueva York: Grune & Stratton.
- Brandau, R, BH Lippold. 1982. *Dermal and Transdermal Absorption*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Brusick, DJ. 1994. *Methods for Genetic Risk Assessment*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Burrell, R. 1993. Human immune toxicity. *Mol Aspects Med* 14:1-81.
- Castell, JV, MJ Gómez-Lechón. 1992. *In Vitro Alternatives to Animal Pharmacotoxicology*. Madrid, España: Farmaindustria.
- Chapman, G. 1967. *Body Fluids and their Functions*. Londres: Edward Arnold.
- Committee on Biological Markers of the National Research Council. 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ Health Persp* 74:3-9.
- Congreso de los Estados Unidos. 1990. *Genetic Monitoring and Screening in the Workplace, OTA-BA-455*. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Cralley, LJ, LV Cralley, JS Bus (dirs.). 1978. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. Nueva York: Wiley.
- Dayan, AD, RF Hertel, E Heseltine, G Kazantzis, EM Smith, MT Van der Venne. 1990. *Immunotoxicity of Metals and Immunotoxicology*. Nueva York: Plenum Press.
- Djuric, D. 1987. Molecular-cellular Aspects of Occupational Exposure to Toxic Chemicals. En *Part I Toxicokinetics*. Ginebra: OMS.
- Duffus, JH. 1980. *Environmental Toxicology*. Londres: Edward Arnold.
- ECOTOC. 1986. *Structure-Activity Relationship in Toxicology and Ecotoxicology, Monograph No. 8*. Bruselas: ECOTOC.
- Forth, W, D Henschler, W Rummel. 1983. *Pharmakologie und Toxikologie*. Mannheim: Bibliographische Institut.
- Frazier, JM. 1990. *Scientific criteria for Validation of in Vitro Toxicity Tests*. OECD Environmental Monograph, no. 36. París: OCDE.
- . 1992. *In Vitro Toxicity—Applications to Safety Evaluation*. Nueva York: Marcel Dekker.
- Gad, SC. 1994. *In Vitro Toxicology*. Nueva York: Raven Press.
- Gadaskina, ID. 1970. Zhiroraya tkan I yadi [Tejidos grasos y productos tóxicos]. In *Aktualnie Voprosy promishlennoi toksikologii [Problemas actuales en la toxicología del trabajo]*, dirigido por NV Lazarev. Leningrado: Ministerio de Sanidad RSFSR.
- Gaylor, DW. 1983. The use of safety factors for controlling risk. *J Toxicol Environ Health* 11:329-336.
- Gibson, GG, R Hubbard, DV Parke. 1983. *Immunotoxicology*. Londres: Academic Press.
- Goldberg, AM. 1983-1995. *Alternatives in Toxicology*. Vol. 1-12. Nueva York: Mary Ann Liebert.
- Grandjean, P. 1992. Individual susceptibility to toxicity. *Toxicol Letters* 64/65:43-51.
- Hanke, J, JK Piotrowski. 1984. *Biochemiczne podstawy toksykologii [Bases bioquímicas de la toxicología]*. Varsavia: PWZL.
- Hatch, T, P Gross. 1954. *Pulmonary Deposition and Retention of Inhaled Aerosols*. Nueva York: Academic Press.
- Consejo de Salud de los Países Bajos. Comité para la Evaluación de la Carcinogenicidad de las Sustancias Químicas. 1994. Risk assessment of carcinogenic chemicals in The Netherlands. *Regul Toxicol Pharmacol* 19:14-30.
- Holland, WC, RL Klein, AH Briggs. 1967. *Molekulare Pharmakologie*.
- Huff, JE. 1993. Chemicals and cancer in humans: First evidence in experimental animals. *Environ Health Persp* 100:201-210.
- Klaassen, CD, DL Eaton. 1991. Principles of toxicology. Capítulo 2 en *Casarett and Doull's Toxicology*, dirigido por CD Klaassen, MO Amdur y J Doull. Nueva York: Pergamon Press.
- Kossover, EM. 1962. *Molecular Biochemistry*. Nueva York: McGraw-Hill.
- Kundiev, YI. 1975. *Vssavanie pesticidov cherez kozsu I profiliatika otravlenii [Absorción de pesticidas a través de la piel y prevención de intoxicaciones]*. Kiev: Zdrovia.
- Kustov, VV, LA Tiunov, JA Vasilejv. 1975. *Kombinovaniye deistviya promishlennih yadov [Efectos combinados de los productos tóxicos industriales]*. Moscú: Medicina.
- Lauwerys, R. 1982. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. París: Masson.
- Li, AP, RH Heflich. 1991. *Genetic Toxicology*. Boca Raton: CRC Press.
- Loewy, AG, P Sickewitz. 1969. *Cell Structure and Functions*. Nueva York: Holt, Reinhart and Winston.
- Loomis, TA. 1976. *Essentials of Toxicology*. Filadelfia: Lea & Febiger.
- Mendelsohn, ML, RJ Albertini. 1990. *Mutation and the Environment, Parts A-E*. Nueva York: Wiley Liss.
- Mettzler, DE. 1977. *Biochemistry*. Nueva York: Academic Press.
- Miller, K, JL Turk, S Nicklin. 1992. *Principles and Practice of Immunotoxicology*. Oxford: Blackwells Scientific.
- Ministerio de Comercio Internacional e Industria. 1981. *Handbook of Existing Chemical Substances*. Tokio: Chemical Daily Press.
- . 1987. *Application for Approval of Chemicals by Chemical Substances Control Law*. (En japonés y en inglés). Tokio: Kagaku Kogyo Nippo Press.
- Montagna, W. 1956. *The Structure and Function of Skin*. Nueva York: Academic Press.
- Moolenaar, RJ. 1994. Carcinogen risk assessment: international comparison. *Regul Toxicol Pharmacol* 20:302-336.
- National Research Council. 1989. *Biological Markers in Reproductive Toxicity*. Washington, DC: NAS Press.
- Neuman, WG, M Neuman. 1958. *The Chemical Dynamic of Bone Minerals*. Chicago: The Univ. of Chicago Press.
- Newcombe, DS, NR Rose, JC Bloom. 1992. *Clinical Immunotoxicology*. Nueva York: Raven Press.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1975. *Methods Used in USSR for Establishing Safe Levels of Toxic Substances*. Ginebra: OMS.
- Pacheco, H. 1973. *La pharmacologie moleculaire*. París: Presses Universitaire.
- Piotrowski, JK. 1971. *The Application of Metabolic and Excretory Kinetics to Problems of Industrial Toxicology*. Washington, DC: US Department of Health, Education and Welfare.
- . 1983. Biochemical interactions of heavy metals: Methalothionein. En *Health Effects of Combined Exposure to Chemicals*. Copenhague: Oficina Regional de la OMS para Europa.
- Proceedings of the Arnold O. Beckman/IFCC Conference of Environmental Toxicology Biomarkers of Chemical Exposure. 1994. *Clin Chem* 40(7B).
- Russell, WMS, RL Burch. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Londres: Methuen & Co. Reprinted by Universities Federation for Animal Welfare, 1993.
- Rycroft, RJC, T Menné, PJ Frosch, C Benezra. 1992. *Textbook of Contact Dermatitis*. Berlin: Springer-Verlag.
- Schubert, J. 1951. Estimating radioelements in exposed individuals. *Nucleonics* 8:13-28.
- Shelby, MD, E Zeiger. 1990. Activity of human carcinogens in the Salmonella and rodent bone-marrow cytogenetics tests. *Mutat Res* 234:257-261.
- Stone, R. 1995. A molecular approach to cancer risk. *Science* 268:356-357.
- Teisinger, J. 1984. *Expositionstest in der Industrietoxikologie [Pruebas de exposición en la toxicología industrial]*. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit.
- VEB. 1981. *Kleine Enzyklopädie: Leben [Vida]*. Leipzig: VEB Bibliographische Institut.
- Weil, E. 1975. *Elements de toxicologie industrielle [Elementos de la toxicología industrial]*. París: Masson et Cie.
- . 1978. *Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals, Part I*. Environmental Health Criteria, No.6. Ginebra: OMS.
- . 1981. *Combined Exposure to Chemicals, Interim Document no.11*. Copenhague: Oficina Regional de la OMS para Europa.
- . 1986. *Principles of Toxicokinetic Studies*. Environmental Health Criteria, no. 57. Ginebra: OMS.
- Yofre, JM, FC Courtice. 1956. *Lymphatics, Lymph and Lymphoid Tissue*. Cambridge: Harvard Univ. Press.
- Zakutinskiy, DI. 1959. *Voprosi toksikologii radioaktivnykh veshchestv [Problemas de toxicología de los materiales radiactivos]*. Moscú: Medgiz.
- Zurlo, J, D Rudacille, AM Goldberg. 1993. *Animals and Alternatives in Testing: History, Science and Ethics*. Nueva York: Mary Ann Liebert.

