

CAPÍTULO 1

Principios generales de la toxicología

Autor: Leda Giannuzzi

Aportes de: Florencia Ortega y Ezequiel Ventosi

Fundamentos de toxicología

Las personas están expuestas a una gran variedad de sustancias naturales y otras fabricadas por el hombre. En ciertas circunstancias estas exposiciones causan efectos adversos en la salud que varían desde cambios biológicos casi imperceptibles a hasta la muerte.

Definición y objeto de la toxicología

La toxicología estudia la naturaleza, el mecanismo de acción tóxica de agentes físicos, sustancias químicas capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos. Identifica y cuantifica los efectos adversos asociados a la exposición de los agentes. También intervienen en esta definición la evaluación cuantitativa de la severidad y frecuencia de estos efectos en relación con la exposición de los organismos vivos. También estudia los procedimientos para detectar, identificar y valorar su grado de toxicidad.

La toxicología estudia las interacciones entre las sustancias químicas y los sistemas biológicos con el objeto de determinar cuantitativamente el daño potencial que resulta en efectos adversos a organismos vivos. La Toxicología investiga la naturaleza, la incidencia, los mecanismos de acción, los factores que influyen en su desarrollo y reversibilidad de los efectos adversos.

Por lo expuesto **se define toxicología** como la ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos capaces de producir alteraciones patológicas en los seres vivos, evalúa los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlos, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad.

La toxicología presenta un amplio campo de acción: investigación básica sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos y sustancias químicas empleas en medicina diagnóstica, en la industria de los alimentos, en la agricultura, industria química, componentes e intermedarios de plásticos, entre otros. Además, el toxicólogo participa en la determinación de los límites de exposición seguros tendientes a la elaboración e interpretación de pruebas normalizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes. Estas incluyen las ingestiones diarias aceptables y los valores del límite de umbral o en una evaluación de los riesgos en los que se

utiliza en relación con sustancias cuyos efectos se creen que no tienen umbral o que éste no se puede determinar.

La toxicología se estudia en disciplinas normalizadas, como la toxicología clínica, la forense, la de investigación, la reguladora, la analítica, la clínica, la ambiental, laboral, etc. Otra clasificación hace referencia a los sistemas o procesos orgánicos que se ven afectados, como la inmunotoxicología o la toxicología genética; puede presentarse también desde el punto de vista de sus funciones, así como en investigación, realización de ensayos y evaluación de los riesgos.

El principal objeto de la toxicología es determinar el potencial daño al organismo y su intacto y en algunos casos la extrapolación al hombre.

Por ello, **un tóxico** es cualquier agente (físico o químico) que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo, alterando sus equilibrios vitales. Se utiliza el término tóxico a los agentes cuyo origen deviene de la actividad antropogénica o subproductos.

El término **toxina** se refiere a las sustancias tóxicas que son producidas por sistemas biológicos tales como las plantas, animales, hongos y bacterias.

Una diferencia se establece con el concepto de **veneno** la cual es una sustancia empleada en forma intencional.

Uno de los conceptos fundamentales de la toxicología es la dosis, la cual determina la toxicidad. Este axioma, acuñado por Paracelso (1493-1541) indica que todas las sustancias son tóxicas, no hay ninguna que no lo sea. La dosis hace el veneno. Se define a la dosis a la cantidad de sustancia ingerida o administrada que produce un efecto tóxico. Presenta unidades de mg/Kg de peso corporal. Sustancias inofensivas como el agua en dosis elevadas resultan ser tóxicas.

Espectro de la dosis tóxica

Un tóxico puede definirse como cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta nociva en un sistema biológico. Prácticamente todas las sustancias químicas conocidas presentan la capacidad de ocasionar lesiones o incluso la muerte si se encuentran en cantidad suficiente. En la Tabla 1 se presentan las dosis de algunas sustancias químicas que es necesario administrar para causar la muerte al 50% de los animales tratados, dicho parámetro es denominado dosis letal 50 (DL50). La DL50 se expresa en mg/kg de peso corporal. Puede observarse que hay sustancias químicas muy poco tóxicas como el etanol mientras que la toxina botulínica (la sustancia proteica más tóxica conocida) en muy pequeña dosis puede matar al 50% de la población. Debe tenerse en cuenta que las medidas de la letalidad aguda como la DL50 pueden no reflejar con exactitud el espectro completo de la toxicidad o riesgo que se asocia a la exposición a un producto químico. Una sustancia química que presenta una baja toxicidad aguda puede producir toxicidad crónica, tal como los carcinogénicos o teratogénicos.

Clasificación de las sustancias tóxicas

Los agentes tóxicos se ordenan en función de diversas categorías tomando como criterio los órganos afectados, el uso, el origen y los efectos de las sustancias. Así podemos clasificar a las sustancias como hepatotóxicas, nefrotóxicas, neurotóxicas, etc., según afecten a órganos como el hígado, riñón o sistema nervioso. Según su uso reciben nombres como insecticidas, funguicidas, molusquicidas, etc según se utilice para combatir insectos, hongos y moluscos. Además, las sustancias se clasifican según su estado físico, estabilidad o reactividad química, su estructura química, reactividad química o su potencial tóxico.

Tabla 1: DL50 (mg/Kg peso corporal) de sustancias químicas

Sustancia	DL50 (mg/kg peso corporal)
Etanol	10000
Cloruro sódico	4000
Sulfato ferroso	1500
Sulfato de morfina	900
Fenobarbital sódico	150
Picrotoxina	5
Sulfato de estricnina	2
Nicotina	1
d-tubocurarina	0.5
Hemicolina-3	0.2
Tetradotoxina	0.10
Dioxina	0.001
Toxina botulínica	0.00001

Efecto tóxico

El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos. Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis del agente tóxico. El efecto tóxico o respuesta tóxica corresponde a cualquier desviación del funcionamiento normal del organismo que ha sido producida por la exposición a sustancias tóxicas. Sólo se consideran como desviaciones significativas los cambios irreversibles o los cambios que permanecen por un período prolongado después de que la exposición ha cesado.

Efectos adversos

Son aquellos que producen un detrimento ya sea de la supervivencia o de la normal funcionalidad del individuo. Corresponden a cambios morfológicos, fisiológicos y en el desarrollo del crecimiento en la vida de un organismo que resulta en un deterioro de la capacidad funcional o de la homeostasis y/o compensatoria de los efectos de stress o en un aumento en la susceptibilidad a los efectos dañinos del medio ambiente. Resultan ser los efectos que producen una disminución en la supervivencia o normal funcionamiento de un individuo.

Xenobióticos

Sustancias extrañas al organismo los cuales se diferencian de los compuestos endógenos. Ejemplos de xenobióticos son los fármacos, las sustancias químicas industriales, los tóxicos presentes en la naturaleza, los contaminantes del medio ambiente, etc.

Órgano blanco

Zona del organismo donde el tóxico ejerce su acción dañina. Muchas veces ese órgano puede no ser el que contenga la mayor concentración del toxico (ejemplo los compuestos organoclorados ejercen su acción en el sistema nervioso y se acumulan y presentan mayor concentración en el tejido adiposo).

Toxicidad

La capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un sistema biológico. La mayoría de las sustancias químicas conocidas tienen potencial de ocasionar lesiones o incluso la muerte si se encuentran en cantidades importantes.

Características de la exposición

Una sustancia química provoca efectos tóxicos sobre un sistema cuando dicha sustancia o sus metabolitos alcanzan el lugar apropiado del organismo durante un tiempo adecuado, una concentración suficiente como para producir una manifestación tóxica. Que ocurra o no la respuesta tóxica dependerá de las características químicas y físicas de las sustancias, del lugar de exposición, de la metabolización del agente y de la sensibilidad del sistema biológico.

Rutas, sitios de exposición

Las principales vías o rutas por las que las sustancias tóxicas acceden al cuerpo son por el tubo digestivo por ello la ruta de exposición se denomina oral, si la exposición es por los pulmones la vía de exposición es inhalatoria, si es por la piel la exposición es dérmica, o por otras vías parentales. Los efectos más intensos y la respuesta más rápida de los tóxicos, se producen cuando estos se introducen directamente en el torrente sanguíneo (vía intravenosa). El orden de eficacia descendente aproximado para las vías es: inhalatoria, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, oral y dérmica. El medio en que está disuelta la sustancia, denominado vehículo, así como otros factores de la formulación

pueden influir en la absorción de la misma. La vía de administración también repercute en la toxicidad de las sustancias.

Duración y frecuencia de la exposición

Otro factor que influye en la toxicidad de las sustancias es el tiempo. La exposición de los animales de experimentación a las sustancias químicas se divide en cuatro categorías según sea la dosis y el tiempo de exposición. Surge entonces la denominación de toxicidad aguda, subaguda, subcrónica y crónica.

Una exposición aguda se define como la exposición a una sustancia durante menos de 48 horas (tiempo corto). En general se realiza la exposición en única dosis, sin embargo, con determinadas sustancias existe la posibilidad de repetir las dosis durante las 24 horas. La exposición aguda por inhalación significa que ha habido una exposición continua durante menos de 24 horas normalmente 4 horas.

La exposición repetida se divide en tres categorías: subaguda, subcrónica y crónica.

La exposición subaguda se refiere a la exposición repetida a un agente químico durante un mes o menos y la duración de las exposiciones subcrónicas y crónicas son de 1 a tres meses y mayor de tres meses respectivamente.

Para seres humanos las frecuencias y duración de las exposiciones no están tan bien definidas como en los estudios en animales. Las exposiciones en los lugares de trabajo o ambientales se describen como agudas (derivadas de un accidente o episodio único), subcrónicas (las que se producen repetidamente durante varias semanas o meses) o crónicas (aquellas que se producen de forma repetida durante meses o años).

La exposición aguda a sustancias que se absorben rápidamente muy probablemente provocará efectos tóxicos inmediatos, pero también puede dar lugar a una toxicidad retardada que puede ser similar o no a las consecuencias tóxicas una exposición crónica. La exposición crónica a un agente tóxico puede producir además de los efectos prolongados de poca intensidad o crónicos, determinados efectos inmediatos (agudos) después de cada exposición.

Otro factor relacionado con el tiempo es el intervalo de exposición. Una sustancia tóxica que en una dosis única produce efectos graves puede carecer de ellos si la misma dosis total se administra fraccionada en varios momentos diferentes. Los efectos tóxicos crónicos pueden aparecer cuando las sustancias se acumulan en el sistema biológico (velocidad de absorción es mayor que la de eliminación) cuando el agente tóxico produce efectos tóxicos irreversibles o cuando el intervalo de exposición no concede el tiempo suficiente para que el sistema se recupere del daño tóxico.

Tabla 2: Ejemplos de toxicidad clasificados de acuerdo a la escala de tiempo y sitio de acción

Exposición	Sitio	Efecto	Sustancia
Aguda	Local	Corrosivo en la piel	Metilamina
		Daño al pulmón	HCl
	Sistémica	Daño al riñón	Fenacetina
		Hemólisis	Arsina
	Mezcla	Pulmón y Metahemoglobina	Óxidos de N
Crónica	Local	Bronquitis	SO ₂
		Carcinoma	Mostazas N
	Sistémica	Leucemia	Benceno
	Mixta	Daño al riñón	Cd

Espectro de los efectos indeseables

El espectro de los efectos indeseables de las sustancias químicas es muy amplio. En terapéutica, un fármaco produce números efectos, pero solo uno de ellos se asocia al objetivo principal del tratamiento, el resto de los efectos se denominan efectos secundarios o indeseables. Algunos de los efectos secundarios de los fármacos son nocivos para el ser humano, son los denominados efectos adversos, nocivos o tóxicos.

Reacciones alérgicas

La alergia consiste en una respuesta inmunitaria desencadenada por una sensibilización anterior a esa sustancia o a otra con estructura similar. Para describir esta situación se utilizan los términos hipersensibilidad, reacción alérgica y reacción de sensibilización. Una vez que se ha producido la sensibilización, la reacción alérgica será una consecuencia de la exposición a una dosis relativamente muy baja de la sustancia, por ese motivo son muy pocas las ocasiones en las que se han obtenido las curvas dosis-repuesta de una población para las reacciones alérgicas. Estas reacciones en un individuo alérgico guardan relación con la dosis. Las reacciones de sensibilización a veces son muy graves y en ocasiones llegan a ser mortales.

Reacciones idiosincrásicas

La idiosincrasia química hace referencia a una reactividad anormal de origen genético frente a una sustancia química. La respuesta observada suele ser cualitativamente parecida a la que presentan todos los individuos, pero puede manifestarse como una sensibilidad extrema a bajas dosis de la sustancia como una insensibilidad exagerada a dosis elevadas.

Toxicidad inmediata y toxicidad demorada

Los efectos tóxicos inmediatos aparecen rápidamente después de la administración de una dosis única de una sustancia, mientras que los efectos tóxicos retardados aparecen después de transcurrido un tiempo. En seres humanos, los efectos carcinogénicos de las sustancias químicas suelen presentar largos períodos de latencia a menudo entre 20 y 30 años desde la primera exposición hasta que se desata el cáncer.

Efectos tóxicos reversibles e irreversibles

Un efecto tóxico reversible es aquel que al desaparecer la exposición al tóxico se revierte el efecto observado. En cambio, un efecto tóxico es irreversible cuando al cesar la exposición perdura el efecto observado. Ello indica que se ha producido un daño en el organismo como puede ser una lesión tisular. Sin embargo, cuando una sustancia provoca una lesión tisular, será la capacidad de regeneración de ese tejido quien determine en gran medida si el efecto tóxico es reversible o irreversible. En el caso del hígado, su elevada capacidad de regeneración hace que la mayoría de las lesiones sean reversibles, mientras que las lesiones del sistema nervioso central (SNC) son en su mayor parte permanente porque las células diferenciales del SNC son irremplazables. Una vez que se producen los efectos carcinogénicos y teratogénicos de las sustancias químicas estos se suelen considerar consecuencias tóxicas irreversibles.

Toxicidad local y sistémica

Otra diferencia entre los tipos de efectos se refiere al lugar de acción. Los efectos tóxicos locales se producen en el lugar donde del primer contacto entre la sustancia tóxica y el sistema biológico. Por otro lado, los efectos sistémicos requieren que el tóxico se absorba, se distribuya hasta un punto distante donde provocará los efectos nocivos. La mayor parte de las sustancias químicas salvo las que son extremadamente reactivas producen efectos generales. La mayoría de las sustancias que provocan toxicidad sistémica suelen producir los efectos en uno o dos órganos que se denominan órganos diana. A menudo el órgano afectado por el tóxico no se corresponde con el lugar donde se alcanza la concentración más elevada de la sustancia química. Los órganos que resultan ser más frecuentemente afectados son el SNC, el aparato circulatorio, el sistema sanguíneo y hematopoyético, el hígado, los riñones, los pulmones y la piel. El músculo y los huesos son menos afectados.

Tolerancia

La tolerancia es la disminución de la sensibilidad al efecto tóxico de una sustancia que se produce como consecuencia de una exposición anterior a dicha sustancia o a otra estructuralmente semejante. Dos son los principales mecanismos responsables de la tolerancia: uno es la reducción de la cantidad del agente tóxico que alcanza el lugar donde se produce la acción tóxica (tolerancia farmacocinética) y el otro, consiste en la disminución de la respuesta de un

tejido frente a la acción del tóxico. Estos conceptos se aplican a determinadas drogas que generan tolerancia en el individuo requiriendo mayores dosis para alcanzar el efecto buscado.

Respuesta a la dosis

Las características de la exposición y el espectro de los efectos se enmarcan en una relación correlativa denominada relación dosis-respuesta. Sea cual sea la respuesta elegida para su medición, la relación entre el grado de respuesta de un sistema biológico y la cantidad de sustancia tóxica administrada adopta una forma tan constante que hace que sea considerada como el concepto más importante y general de la toxicología. Desde un punto de vista práctico, existen dos tipos de relaciones de relaciones entre dosis y la respuesta: 1) la relación entre la dosis y el efecto, que describe la respuesta de un único organismo a dosis variables de una sustancia química y que a menudo se denominan gradual porque el efecto medido es continuo en un intervalo de dosis y 2) la relación entre la dosis y respuesta que representa la distribución de las respuestas a dosis diferentes entre una población de organismos.

Relación dosis-efecto (individual-gradual)

La relación entre la dosis y el efecto provocado en un individuo, se caracteriza por un incremento en la magnitud de la respuesta en relación con la dosis.

Relación dosis-efecto: describe la respuesta de un solo individuo a diferentes dosis de un compuesto. Está caracterizada por un aumento de la gravedad del efecto con el aumento de la dosis (respuesta gradual). La curva de dosis-efecto es la expresión gráfica de la relación entre la dosis y la magnitud del cambio biológico producido, medido en unidades apropiadas. Se aplica a cambios mensurables que dan una respuesta gradual al aumentar la dosis de un medicamento o xenobiótico. Cuando se toma en cuenta la variación biológica, ésta representa el efecto producido en un animal o persona. Pueden ser ejemplos de ello las variaciones del peso corporal, de la presión sanguínea o del nivel de determinada enzima o la mayor irritación del tracto respiratorio por la exposición a mayores concentraciones de un gas tóxico como el cloro.

Relación dosis-respuesta: describe la distribución de respuestas a diferentes dosis en una población de individuos. Se caracteriza por un aumento del número de individuos afectados (respuesta cuantal: presente o ausente) al aumentar la dosis. La curva de dosis-respuesta puede ser definida como la expresión gráfica de la relación entre la dosis y la proporción de individuos que experimentan un efecto de todo o nada y es esencialmente la representación de la probabilidad de una ocurrencia (o la proporción de una población que presenta un efecto) en función de la dosis. Los ejemplos típicos de tales efectos totales o nulos son la mortalidad o la incidencia de cáncer.

Entre la ausencia de efecto y la letalidad existe un amplio margen de cambios fisiológicos y patológicos que experimental los animales en los estudios de dosis- respuesta. La exposición puede ser tan pequeña que no hay respuesta apreciable o puede presentarse respuestas con alteraciones mensurables de actividad enzimática, aumento de frecuencia cardíaca, dilatación de pupilas, etc. El

extremo opuesto se corresponde con la muerte. Las curvas dosis respuesta consideran dos aspectos importantes: 1) existe un fenómeno básico en que la mayoría de los tóxicos la magnitud de la respuesta biológica está relacionada con la dosis, es decir, a mayor exposición mayor es la intensidad de la respuesta. 2) No todos los animales responden de igual manera ante la misma exposición, existen variaciones entre los sujetos. Considerando la variabilidad que refleja las diferencias inherentes a respuestas esperadas se utilizan cuantificaciones como la desviación típica, varianza e intervalos de confianza para definir los límites o las variaciones esperadas en la relación dosis-respuesta. Las relaciones dosis-respuesta se utilizan para el determinar la DL50 o la CL50 (concentración letal 50). El sujeto vive o muere, no hay intermedios (respuesta binaria). Otras respuestas biológicas pueden ser clasificadas en forma semejante si se definen con claridad un punto de corte, ej. Presión sanguínea mayor a 140 mmHg e inferior a 140 mmHg para otro grupo. Puede calcularse la dosis precisa para que el 50% de los sujetos alcancen una presión sanguínea mayor a 140 mmHg.

También puede definirse la llamada CE50 como la concentración efectiva media. Es la concentración de una sustancia que provoca algún efecto en el 50% de la población expuesta. Este efecto puede ser letal o no letal. Debe especificarse la duración de la exposición, la vía de ingreso y la especie de organismo utilizado. Se expresa en mg/L, ppm, mg/Kg, etc.

Relación cuantal dosis-respuesta

A diferencia de la relación entre dosis-efecto individual que es gradual o en escala continua, la relación entre dosis y respuesta en una *población* se caracteriza por seguir la ley de *todo o nada* es decir, para una dosis determinada, un individuo de la población responderá o no responderá. Aunque resulte útil distinguir entre relaciones de dosis y efecto gradual y relaciones de dosis y respuesta en una población, los dos tipos de respuestas son idénticos desde el punto de vista conceptual. En ambos casos, en el eje de ordenadas se encuentra la respuesta que puede ser la magnitud de la respuesta o el efecto observado en un individuo o sistema, o bien la fracción de la población que responde. En el eje de abscisas se distribuyen las dosis administradas.

Ensayos de toxicidad

El conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede conocerse (aparte de las previsiones teóricas) por los estudios retrospectivos de casos de intoxicación y por la experimentación con plantas y animales. La experimentación con seres humanos se realiza únicamente en contadas ocasiones debido a sus implicaciones éticas y legales.

El uso de animales de experimentación para la determinación de la "dosis letal" hoy día está siendo reorientado debido a la presión de las asociaciones protectoras de animales y una mayor sensibilización por parte de la sociedad. Se emplean menos animales, las técnicas de ensayo se han refinado para provocar menos sufrimiento y para optimizar la cantidad de información extraída de la experiencia. Los requerimientos de las Good Laboratory Practices son de obligado cumplimiento si queremos asegurar la calidad de los resultados obtenidos experimentando con animales. Seguidamente veremos aspectos que nos permitan establecer algunos parámetros del ensayo de toxicidad y su intervalo de confianza.

Ensayos de toxicidad con animales. Cálculo de la LD50

Toxicidad aguda: Efectos adversos que se manifiestan luego de la aplicación de una única dosis o múltiples dosis de una sustancia en el lapso de 24 horas y durante una observación de al menos 15 días. Todas las sustancias son tóxicas cuando se administran a dosis altas. La toxicidad puede observarse de diversas maneras, siendo la determinación de la toxicidad aguda el ensayo más corriente. Esta determinación permite apreciar los síntomas de intoxicación y la dosis tóxica: Dosis mínima mortal y Dosis Letal 50 (DL50). Como los efectos tóxicos no se muestran a menudo más que después de un periodo de tiempo en el organismo, los ensayos de toxicidad crónica efectuados con animales se realizan cuando la sustancia química presenta un interés terapéutico. Por último, existen riesgos terapéuticos que no se manifiestan en estos ensayos de toxicidad y que son objeto de ensayos especiales: evaluación de efectos teratogénicos, carcinogénicos y mutágenos.

En un estudio de la toxicidad aguda se definen los siguientes términos. La dosis letal 50 (DL50) corresponde a la dosis capaz de producir la muerte en condiciones determinadas, de la mitad de los animales (de una misma especie) sometidos a la experiencia. Esta determinación se basa en la evaluación de respuestas de todo ó nada: muerte o supervivencia del animal. Como es imposible obtener de manera inmediata el 50% de muertes a partir de un único grupo, el método consiste en experimentar con 5 ó 6 lotes de 10 a 20 animales a los cuales se administran dosis crecientes de la sustancia a ensayar, de manera que el porcentaje de mortalidad varíe entre 0-100%. El procedimiento para estimar la DL50 con su tolerancia fue propuesto por Trevan (1927) y consiste en transformar la relación obtenida entre el % de mortalidad y la dosis en una relación final lineal que permita interpolar la dosis que corresponde al 50% de mortalidad. Para ello primero se representa el porcentaje de mortalidad frente al logaritmo de la dosis correspondiente, pues la distribución de frecuencias que se construye después parece ajustarse mejor a la lognormal que a la normal. La Fig. 1 a muestra que la respuesta como la letalidad presenta una distribución normal o gaussiana. El histograma de frecuencias también indica la relación entre la dosis y la respuesta. Las barras corresponden al porcentaje de animales que murieron a cada dosis menos el porcentaje de los mismos que murieron a la dosis inmediatamente inferior. Puede observarse que solo pocos animales responden a dosis bajas o dosis altas. El mayor número de animales responden a dosis intermedias y la frecuencia máxima de respuestas ocurre en dosis intermedia. Esta es la curva con forma de campana denominada distribución normal de frecuencias (Fig. 1 a). Esto es debido a que cada individuo presenta diferente sensibilidad a las sustancias. Los animales que responden a dosis bajas se denominan sensibles mientras que los que responden a dosis altas son los resistentes. Si sumamos el número de animales que responden a cada dosis consecutiva se obtiene la relación de frecuencias acumuladas de respuestas frente a la dosis como se muestra en la curva sigmoidea de la Fig. 1b. Una curva de distribución normal se aproxima a 0 a medida que la dosis disminuye y del 100% a medida que la dosis aumenta. No están definidas las respuestas para 0 y 100%.

La curva sigmoidea presenta una parte lineal entre 16 y 84%, estos valores son los límites de una desviación estándar de la media. En una población normalmente distribuida,

tenemos dos parámetros fundamentales: la medida del valor representativo o más probable del conjunto y la medida de la dispersión del conjunto de datos. Una estimación adecuada para el valor más probable sería la media de las dosis (--sus logaritmos--), y para la dispersión, la desviación estándar (SD) que puede tomarse como la magnitud que mide la distancia desde la media a cualquiera de las dos inflexiones de la curva. El área de la curva limitada por la media $\pm 1SD$ contiene un 68% de la población; para la media $\pm 2SD$ y $\pm 3SD$ llegamos a un 95 y un 99.7% de la población. Considerando que las curvas dosis respuesta siguen una distribución normal, podemos convertir el porcentaje de respuestas en unidades de desviación de la media o desviación normal equivalente (DNE). Así, la DNE para una respuesta del 50% es 0, la DNE es +1 para una respuesta del 84%. Para evitar las cifras negativas las unidades de las DNE se convierten añadiendo 5 a su valor. Se obtiene así la llamada unidad de probabilidad o probit. Según ello, una respuesta del 50% corresponde a un probit de 5, una desviación standard +1, se corresponde a un probit de 6 y una desviación estándar de -1 corresponde a un probit de 4 como se indica en la Tabla 2:

Tabla 3: Relación entre % Mortalidad, NED y Probits

%Mortalidad	NED	Probit
0.1	-3	2
2.3	-2	3
15.9	-1	4
50.0	0	5
84.1	1	6
97.7	2	7
99.9	3	8

La Fig. 1 c se representa los datos de las Fig. 1 a y b en unidades probit siendo una línea recta el resultado de la transformación. De esta manera es posible mediante este método ajustar la mortalidad u otras respuestas de todo o nada a una distribución normal de la población obteniéndose una línea recta. La DL50 se obtiene trazando una línea horizontal desde la unidad de probit 5 que representa la mortalidad del 50% hasta la línea dosis respuesta. Desde allí, se traza una línea vertical que corta la abscisa en un punto que corresponde con la DL50. También es posible obtener la pendiente de la curva dosis- respuesta.

La Fig. 2 muestra las curvas de mortalidad para dos compuestos A y B. El compuesto A presenta una pendiente más plana que significa un cambio grande en la dosis para observar un cambio importante en la respuesta. El compuesto B muestra una relación dosis –respuesta más pronunciada indicando que un cambio de dosis relativamente pequeño produce un cambio importante en la respuesta.

Otro concepto importante en la relación entre dosis y respuesta es el de dosis umbral.

La dosis umbral

Es la dosis mínima que provoca una respuesta de todo o nada aun cuando no pueda calcularse experimentalmente. La dosis umbral es la dosis por debajo de la cual la probabilidad que un individuo responda es cero. En el caso de la relación entre dosis y respuesta es cierto que existen umbrales para la mayoría de los efectos tóxicos, aunque la variabilidad interindividual de la respuesta y los cambios cualitativos que provocan la dosis en el patrón de respuesta hacen difícil establecer una verdadera dosis inefectiva carente de efectos para cualquier sustancia.

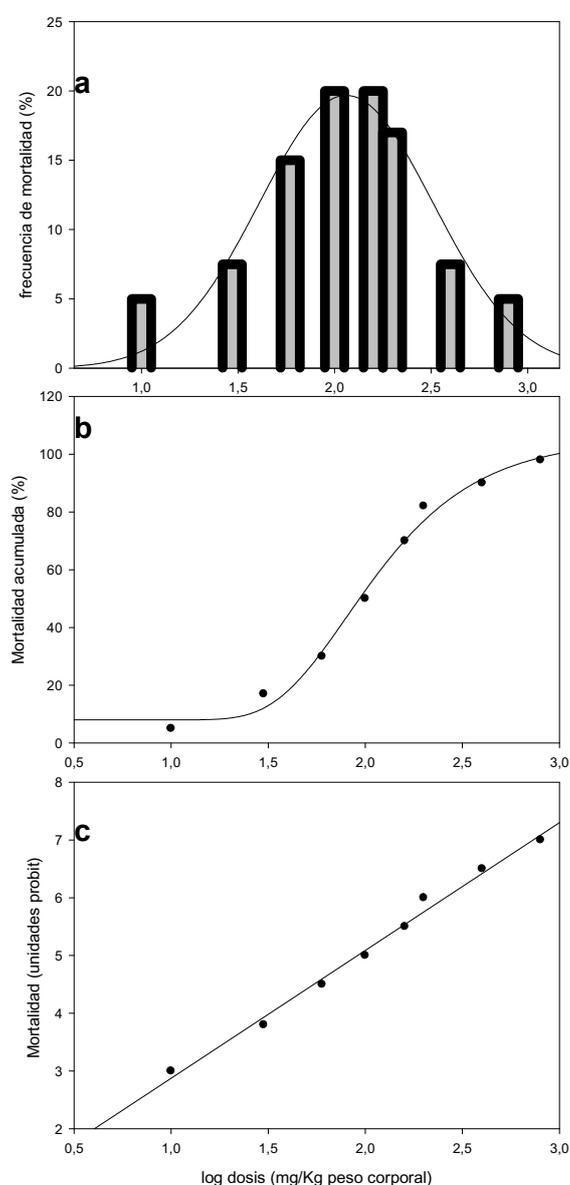


Fig. 1: Curva dosis-respuesta a) distribución de frecuencias, b) frecuencias acumuladas y c) en unidades probit

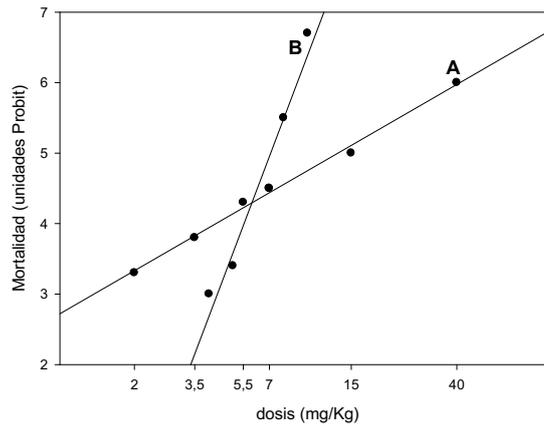


Fig. 2: Comparación de las curvas de dosis respuesta de dos sustancias diferentes A y B

Variaciones de las respuestas tóxicas

Toxicidad selectiva

La toxicidad selectiva significa que una sustancia química es nociva para una clase de individuos, pero no perjudica a otra forma de vida cuando coexistan en estrecho contacto. Esta toxicidad selectiva se deberá a diferencias toxico-cinéticas (absorción, biotransformación o excreción) o a aquel mecanismo molecular del procesamiento bioquímico de la sustancia tóxica es distinto en cada organismo.

Diferencias entre especies

Existe la posibilidad de obtener respuesta a las sustancias tóxicas que muestren diferencias cuali y cuantitativas entre distintas especies. Identificar los mecanismos moleculares y celulares de tales diferencias permitirá establecer la trascendencia de los datos obtenidos en animales para la respuesta en los seres humanos.

Diferencias individuales

Dentro de la misma especie puede haber importantes diferencias individuales en la respuesta a una sustancia causada por sutiles diferencias genéticas denominadas polimorfismos genéticos que corresponden a diferentes variaciones que pueden existir sobre el ADN de un mismo gen. Estos polimorfismos son responsables de las reacciones idiosincrásicas de las diferencias interindividuales en las respuestas a los tóxicos.

Pruebas descriptivas de toxicidad en animales

Todas las pruebas de toxicidad que se llevan a cabo en animales se basan en dos principios fundamentales. El primero es que cuando se cumplen los requisitos adecuados, los efectos producidos por un compuesto en animales de laboratorio son aplicables al hombre. El segundo

principio se basa en que la exposición de los animales de experimentación a altas dosis de una sustancia química es un método válido y necesario para descubrir posibles peligros en el hombre ya que la incidencia de un efecto en una población aumenta a medida que se incrementa la dosis o la exposición.

Las pruebas de toxicidad no están concebidas para demostrar si una sustancia es segura sino para identificar los efectos tóxicos que pueda provocar. No existe una batería de pruebas toxicológicas que haya de realizarse en cada compuesto que se quiera comercializar. Dependiendo de la aplicación final de la sustancia, los efectos tóxicos producidos por los análogos estructurales y los efectos tóxicos producidos por la propia sustancia contribuirán a determinar que pruebas toxicológicas deben practicarse.

Letalidad aguda

La primera prueba de toxicidad sobre una sustancia química es la de toxicidad aguda. Se determina la DL50 y otros efectos tóxicos agudos de una o más vías de administración, en una o más especies habitualmente ratón, rata y en ocasiones conejo y perro. Durante un período de 14 días después de una dosis única se examinan los animales a diario y se registran los animales que mueren. Las pruebas de toxicidad aguda proporcionan 1) un cálculo cuantitativo de la DL50 2) se identifican el o los órganos blanco y otras manifestaciones clínicas de toxicidad aguda, 3) establecer la reversibilidad de la respuesta tóxica y 4) orientan en cuanto al intervalo de dosis para otros estudios.

Si los animales son expuestos a sustancias presentes en el aire que respiran o el agua donde viven (peces), lo habitual es determinar la concentración letal 50 (CL50) para un tiempo de exposición conocido, es decir, la concentración de la sustancia química en el aire o en el agua que provoca la muerte del 50% de los animales.

Debe especificarse la duración de la exposición, la vía de ingreso y la especie de organismo utilizado. Se expresa en mg/L, ppm, etc.

La prueba de toxicidad dérmica aguda suele realizarse en conejos. Se rasura la zona de exposición y se aplica la sustancia tapándola 24 horas y descubriéndola después. Se limpia la piel y se observan los animales durante 14 días. Los estudios de letalidad aguda son esenciales para definir los efectos tóxicos de las sustancias y el peligro que representan para el hombre. La información más importante que brindan las pruebas de toxicidad aguda es que se obtiene de las observaciones clínicas y de la necropsia de los animales y no el valor concreto de la DL50.

Muchas organizaciones protectoras de animales han luchado en contra de la DL50, debido al sufrimiento animal que genera la muerte lenta y dolorosa que deben soportar los animales. Es así que varios países han prohibido los ensayos de DL50 oral y en el año 2001 la Organización Europea para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) suprimió el requisito de la prueba oral. En su lugar ha sido remplazado por el ensayo a dosis fija.

El enfoque evita la muerte innecesaria de gran número de animales y lo ha remplazado por ensayos basados en la observación de signos claros de toxicidad en una de una serie de nive-

les de dosis fijas. Los estudios fueron validados in vivo y posteriormente utilizando modelos matemáticos mostrando que el procedimiento es reproducible, utiliza menos animales y causa menos sufrimiento que los métodos tradicionales y es capaz de clasificar las sustancias de manera similar a los métodos tradicionales.

En el ensayo a dosis fija, se emplean grupos de animales de un solo sexo los que se dosifican en un procedimiento escalonado usando las dosis fijas de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg. El nivel de dosis inicial se selecciona sobre la base de un estudio de observación previo de dosis que producen algunos signos de toxicidad sin causar efectos tóxicos graves ni mortalidad. Otros grupos de animales se pueden dosificar a dosis fijas más altas o más bajas, dependiendo de la presencia o ausencia de signos de toxicidad o mortalidad.

Este procedimiento continúa hasta que la dosis que cause toxicidad evidente o no se detecte más de una muerte se detecte, o cuando no se observen efectos en la dosis más alta o cuando las muertes ocurren a la dosis más baja.

Irritaciones cutáneas y oculares

Para la prueba de irritación dérmica (test de Draize) se rasura la piel de los conejos y se aplica la sustancia en una zona íntegra y en dos superficies raspadas tapándolas todas durante 4 horas. El grado de irritación cutánea se puntúa teniendo en cuenta la aparición de eritema (enrojecimiento) y de escaras (costras) y de edema (hinchazón) y la acción corrosiva. Una vez retirado el parche, la irritación dérmica se comprueba repetidamente a diferentes intervalos. Para determinar la intensidad de la irritación ocular, se instila la sustancia química en uno de los ojos de cada conejo. El otro sirve de control. Los ojos de los animales tratados se examinan en diferentes momentos después de la aplicación.

Para evaluar la toxicidad cutánea y ocular, se han diseñado modelos in Vitro como los cultivos de queratinocitos epidérmicos y de células epiteliales de la córnea.

Sensibilización

Todos aquellos compuestos que puedan entrar en contacto con la piel repetidamente además de las pruebas de irritación se necesitan información sobre su capacidad para sensibilizar la piel. En general la sustancia investigada se administra por vía tópica o intradérmica o por ambas sobre la piel rasurada de un cobayo y durante 2 a 4 semanas. Entre 2 y 3 semanas después del último tratamiento los animales son expuestos a una concentración no irritante de la sustancia investigada y se evalúa la formación de eritema.

Pruebas de toxicidad subagudas (estudio de dosis repetidas)

Las pruebas de toxicidad subaguda se llevan a cabo para obtener información sobre la toxicidad de una sustancia química después de administraciones sucesivas, normalmente durante 14 días y lo ayudan a establecer las dosis para los estudios subcrónicos.

Pruebas subcrónicas

La exposición subcrónica suele durar 90 días. Los objetivos son determinar los niveles **NOAEL**: No Observable Adverso Effect Level (nivel de efecto adverso no observable), Mayor dosis de sustancia en experimentación o en observación que causa alteración **no detectable** en la morfología, capacidad funcional, en el crecimiento del organismo blanco en condiciones definidas de exposición. Se expresa en mg/Kg de peso corporal/día.

NOEL: Mayor concentración de sustancia en experimentación o en observación que no causa una alteración morfológica, funcional o en el desarrollo que resulta distinguible.

LOAEL: (lowest observed adverse effect level) es la menor concentración o cantidad de sustancia empleada en experimentación que causa una alteración adversa en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo de la vida en el organismo blanco. Se expresa en mg/Kg peso corporal/día.

Los estudios subcrónicos suelen realizarse en dos especies (perro, rata para Food Drugs Administration (FDA) rata y ratón para Environmental Protection Agency (EPA)) y por la vía de exposición prevista. Se emplean al menos tres dosis: una dosis alta que produce toxicidad, pero con nivel de mortalidad menor al 10%, una dosis baja que no produce efectos tóxicos evidentes y una dosis intermedia. Los animales deben observarse una o dos veces al día en busca de signos de toxicidad. Todas las muertes prematuras deben anotarse e investigarse con una necropsia. Los animales que agonizan se sacrifican para observar los tejidos y reducir el sufrimiento innecesario. Al cabo de 90 días se sacrifican los animales sobrevivientes recogiendo sangre y tejidos para su análisis posterior. Las anomalías macroscópicas y microscópicas de los órganos y tejidos se anotan y se estudian. Los análisis bioquímicos y urinarios se llevan a cabo antes de la exposición y en una etapa intermedia y al final de la exposición Se realizan análisis de hemoglobina, hematocrito, hemograma, fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas, tiempo de coagulación y el tiempo de protombina. Las determinaciones en sangre comprenden glucosa, calcio, potasio, nitrógeno ureico enzima alanina aminotransferasa (ALT) aspartato aminotransferasa (AST) gamaglutamil transferasa (GGT), sorbitol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, creatinina, bilirrubina, triglicéridos, colesterol, albúmina, globulinas y proteínas totales. El análisis de orina comprende la determinación de la densidad específica y la osmolaridad, el pH, las proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina y urobilinógeno así como el examen microscópico de los elementos formes. Si existe la probabilidad de que los seres humanos experimenten una exposición significativa a la sustancia mediante contacto cutáneo o inhalación también es necesario llevar a cabo las pruebas dérmicas.

Pruebas crónicas

Los estudios de exposición crónica o prolongada se llevan a cabo de forma parecida a los estudios de subcrónicos, pero el período de exposición oscila entre 6 meses y 2 años. Las pruebas de toxicidad crónica están concebidas para valorar tanto la toxicidad acumulada como el potencial carcinogénico de las sustancias químicas. Los estudios anatomopatológicos ma-

croscópicos y microscópicos se practican no sólo en los animales que sobreviven a la exposición crónica sino también en aquellos que mueren prematuramente.

La elección de la dosis es esencial para fanatizar que la mortalidad prematura secundaria a la toxicidad crónica no limita el número de animales se alcanza la esperanza de vida normal.

La mayoría de las disposiciones reglamentarias exigen que la dosis máxima administrada sea la **dosis máxima tolerable (DMT)** que corresponde a la dosis que inhibe ligeramente el aumento de peso corporal en un estudio subcrónico de 90 días. Generalmente se investigan una o dos dosis más, habitualmente un cuarto y la mitad de la DMT y un grupo control.

Los ensayos de toxicidad crónica suelen evaluar la capacidad carcinogénica de las sustancias. Den ser registrados los tumores benignos y los malignos. Para los estudios crónicos de carcinogénesis estén convenientemente diseñados es necesario disponer de un grupo control simultáneo con la edad, dieta, y condiciones equiparables de vida.

Otras pruebas

La mutagénesis es la capacidad que tienen las sustancias químicas para alterar el material genético del núcleo celular de manera que tales alteraciones se transmiten durante la división celular. En capítulos posteriores se describe estos métodos.

Los Estudios Toxicológicos Experimentales pueden tener, al menos, los siguientes objetivos:

1. Identificar el peligro o toxicidad
2. Conocer los efectos, su tratamiento y su reversibilidad: Es decir, cuales son las manifestaciones de la intoxicación, y si revierten al cesar la exposición
3. Identificar los órganos diana sobre los que se produce fundamentalmente la acción del tóxico
4. Investigar los mecanismos de acción fisiopatológica, incluyendo el estudio de las dianas moleculares y las respuestas homeostáticas del organismo
5. Identificar la cinética de la sustancia en el organismo y metabolismo hacia productos más o menos activos
6. Investigar la susceptibilidad variable entre las distintas especies, sexos, etc, es decir, aquellos factores que modifican la toxicidad y que servirán para identificar grupos de población con más riesgo
7. Conocer las Interacciones con otras sustancias, tanto nutricionales como medicamentosas, tóxicas o teóricamente inactivas, así como de las condiciones que puedan modificar su absorción o eliminación
8. Diagnosticar la presencia del tóxico en muestras biológicas o no biológicas mediante bioensayos más sensibles que técnicas analíticas instrumentales, como en el caso de la detección de la toxina botulínica
9. Monitorizar y controlar la presencia de compuestos perjudiciales para el medio ambiente
10. Controlar la calidad en productos farmacéuticos, vacunas, etc.

Ensayos Toxicológicos Básicos

Según se ha indicado previamente, las legislaciones establecen requerimientos específicos de estudios diferentes según el uso de las sustancias. Básicamente suele estudiarse, además de las propiedades fisicoquímicas, lo siguiente:

1. Efectos agudos (tras una sola exposición)
2. Efectos por exposición repetida o prolongada
3. Efectos corrosivos
4. Efectos irritantes
5. Efectos sensibilizantes
6. Efectos carcinogénicos
7. Efectos mutagénicos
8. Efectos tóxicos para la reproducción y el desarrollo
9. Efectos tóxicos sobre el ambiente
10. Cinética en el organismo y degradación ambiental

Concepto de Métodos alternativos en experimentación animal

En la actualidad se sintetizan cada año más de 2000 nuevos productos entre sustancias químicas, medicamentos, cosméticos, plaguicidas, aditivos alimentarios, etc. La necesidad de evaluar experimentalmente su toxicidad para que las autoridades reguladoras autoricen su comercialización y uso, ha provocado una serie de reacciones. Por un lado, la exigencia de garantizar la salud pública de la población humana; por otro el gran número de animales empleados, 1500 animales en promedio se emplean para evaluar un producto y el sufrimiento a que se les somete, ha motivado la oposición de las asociaciones de defensa de los animales. Por su parte, los fabricantes se quejan del excesivo coste de los estudios toxicológicos. Entre ellos, se sitúan los toxicólogos, que consideran que los métodos actuales son ética y científicamente mejorables y en ciertos casos sustituibles. Todo ello está motivando el interés por el desarrollo de métodos alternativos a los protocolos oficiales de evaluación de la toxicidad en animales, bien por refinamiento de los procedimientos in vivo, bien por el diseño de nuevos ensayos totalmente in vitro.

El concepto de alternativas adquiere un sentido especial en este contexto e incluye a todos los métodos o técnicas que pudieran sustituir a los experimentos realizados con animales, reducir el número de animales empleados en cada ensayo, o mejorar los procedimientos ya existentes con el fin de disminuir el estrés y evitar el sufrimiento infringido a los animales. **Las tres erres** corresponden a las letras iniciales de los tres principios básicos que identifican a los métodos alternativos: **Reemplazo** de los procedimientos que emplean animales por otros que no los precisen; **Reducción** en el número de animales utilizados; y **Refinamiento** de los métodos usados para mejorar su eficacia o disminuir el dolor o sufrimiento infligido. Los campos más importantes en los que se sitúan los métodos alternativos son la educación, la investigación biomédica y la valoración de la toxicidad de los compuestos químicos.

Los estudios en animales han sido empleados en el área médica desde hace mucho tiempo ya sea en la investigación básica y aplicada, la enseñanza, así como en la valoración de las acciones y efectos producidos por xenobioticos.

En 1967 se creó en USA, "The United Action for Animals" (UAA), para promover las alternativas y fundamentalmente la sustitución de los métodos in vivo. En 1969, se establece en Inglaterra FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments), con el objetivo de proponer estas prácticas en el ámbito científicas. Los organismos internacionales también han fomentado los métodos alternativos.

En 1971, la Resolución 621 del Consejo de Europa propone el establecimiento de un centro de documentación e información en métodos alternativos y bancos de tejidos para investigación. En 1986, mediante la Comunidad Europea insta a sus Estados miembros para que promuevan la legislación en torno a las "tres erres", lo que vienen haciendo desde entonces.

Centro Europeo para la Validación de los Métodos Alternativos (ECVAM), situado en Ispra, Italia, y en los Estados Unidos ha establecido un Comité Inter-agencias para la Validación de Métodos Alternativos (**ICCVAM**). Este organismo ha establecido los siguientes ítems:

1. Evitar la repetición innecesaria de experimentos *in vivo* e *in vitro*: Protocolos y estudios previos: Disponibilidad de la información, intercambio. Flexibilidad. Estrategias integradas.

2. Modelos Matemáticos de Predicción: Cinética ambiental de compuestos químicos Fármaco-toxicocinética (PB-PK) Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR).

3. Mejoras en el diseño de estudios animales: Reducción: número de animales usados Refinamiento: minimización del dolor y estrés; nuevos modelos.

4. Uso de organismos inferiores no protegidos: Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales invertebrados.

5. Vertebrados en etapas iniciales de desarrollo: Peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos.

6. Métodos *In vitro*: Según su finalidad, los ensayos in vitro pueden ser pruebas sustitutivas de los ensayos con animales, o bien pruebas previas a las de aquellos, o con el carácter de complementarias para mejorar la sensibilidad y especificidad de los estudios con animales. Los métodos in vitro no pretenden suplantar globalmente a los ensayos in vivo. Los métodos in vitro presentan entidad propia entre los métodos experimentales y proporcionan una información más profunda sobre los mecanismos de acción tóxica que la obtenida in vivo. Los ensayos in vitro se agrupan y forman una batería de pruebas, cuyos resultados, conjuntamente considerados, permitirán la interpretación del objetivo propuesto.

Órganos: baños, perfusión, cultivo, cortes, órganos reconstituidos Explantes, reagregados celulares, micromasas, cocultivos Cultivo primario de células dispersadas, Líneas celulares/transgénesis Sistemas libres de células.

7. Otros: son empleados en educación, como los sistemas audiovisuales, los modelos mecánicos, o las simulaciones por computadora. Los estudios humanos, incluyen los epidemiológicos, la tóxico-vigilancia tras la introducción de los productos en el mercado, y el empleo de voluntarios. La utilización de humanos plantea diferentes interrogantes de tipo ético, que no debieran reservarse sólo a la experimentación con animales. Sin embargo, la información obtenida pue-

de ser muy valiosa. Así, varios estudios recientes con voluntarios han demostrado que algunos métodos oficiales de experimentación toxicológica con animales, como por ejemplo el de irritación dérmica, poseen muy mala capacidad predictiva de la toxicidad humana.

Biología de sistemas

Las nuevas tecnologías disponibles permiten examinar todo el universo de respuestas biológicas a una sustancia tóxica. Estas nuevas tecnologías que se aplican en el campo de la toxicología incluyen a la genómica (caracterización de gran parte o del conjunto del genoma de un organismo), la transcriptómica (caracterización de la mayoría o de todos los mRNAs, expresado en una célula o tejido), la proteómica (caracterización de la mayoría o de todas las proteínas expresadas en una célula o en el tejido), y la metabonómica (caracterización de la mayoría o todas las moléculas pequeñas en una célula o tejido, incluyendo sustratos, productos, y cofactores de reacciones enzimáticas). La integración de todos estos niveles de función molecular (genómica, transcriptómica, proteómica, metabonómica, etc.) hacia la comprensión del funcionamiento de un organismo vivo se denomina Biología de Sistemas.

Toxicogenómica

Los enfoques científicos tradicionales para dilucidar los efectos bioquímicos y moleculares de las sustancias tóxicas se han centrado en gran medida en el examen de vías bioquímicas que se relacionan con las respuestas observadas identificadas en la patología macroscópica, la histología, los análisis en sangre, así como las observaciones conductuales. En las últimas décadas, numerosas nuevas tecnologías basadas en el genoma han sido desarrolladas y se encuentran disponibles lo cual permite el análisis a gran escala de respuestas a estímulos externos. Debido a que cada nivel de análisis genera una base de datos enorme, la recolección, la organización, la evaluación estadística de los datos entra en el campo de la Bioinformática. En el campo de toxicología, el término toxicogenómica se utiliza para definir el área de investigación que combina la transcripción, la proteína y el perfil de metabolitos con la toxicología convencional para investigar la interacción entre los genes y el estrés ambiental en la causalidad de la enfermedad.

Genómica

El genoma humano se compone de aproximadamente 3 mil millones bases de desoxirribonucleótidos. En el genoma humano, hay, en promedio, alrededor del 0,1% de variabilidad en la secuencia de ADN entre dos individuos, y son estas diferencias las que contribuyen a la unicidad de cada persona. La mayor parte de esta variabilidad se encuentra en el polimorfismo de un solo nucleótido, o SNPs, aunque segmentos más grandes del ADN puede ser variable entre individuos, incluyendo la duplicación o pérdida de genes enteros. La identificación de variantes genéticas, como el polimorfismo genético podría contribuir a las diferencias interindividuales que presentan ciertos individuos con diferente susceptibilidad a los productos químicos u otros factores ambientales.

Además, la información genómica debe ser expresada en la célula. La expresión del genoma ocurre cuando la secuencia de codificación del ADN se convierte en ARN mensajero (mRNA). La transcripción de la información genómica contenida en la célula es sólo parcial. La expresión diferencial de genes en una célula dada es en gran parte responsable de la diversa función de las células, los tejidos y los órganos diferentes que constituyen el organismo de un individuo. Comprender cuales genes se expresan en un tejido dado, a qué nivel, y cómo los tóxicos perturban la transcripción del mismo es de gran relevancia para la toxicología. El ADN también genera pequeños ARN interferentes (siRNA, microRNAs) que son biológicamente activos y pueden participar en la regulación de la expresión génica. Además, la metilación del ADN es un determinante de la expresión génica en células y tejidos y las sustancias químicas exógenas pueden interferir con la función transcripcional mediante la metilación del ADN. Es importante destacar que, aunque tales cambios epigenéticos no resultan en la alteración de la genómica, pueden dar lugar a cambios fenotípicos hereditarios. Por lo tanto, los análisis genómicos en toxicología también pueden incluir técnicas para identificar los cambios inducidos por tóxicos en los patrones de metilación del ADN.

La toxicogenómica es la ciencia que estudia la modificación de la expresión génica debida a la acción de los tóxicos. Implica una nueva estrategia metodológica que utiliza las herramientas de la genómica para establecer el perfil de la expresión genética en individuos o células normales y expuestas a xenobióticos. Investiga los posibles mecanismos de toxicidad y propone un abanico de cambios en la expresión genética tanto frente a sustancias conocidas, como para nuevos xenobioticos.

Entre los ejemplos de la modificación de la expresión génica por xenobióticos encontramos: Existen modificaciones relacionadas con mecanismos de defensa en forma específicas, a modo de ejemplo, el ión níquel induce de forma altamente específica la expresión del gen *cap43*. También existen modificaciones que son relativamente inespecíficas como las respuestas de una célula al ser tratada con compuestos metálicos, en la que aumenta la expresión del gen de la metalotioneína (proteína directamente implicada en el transporte y bloqueo del metal) y que por tanto protege frente a su acción tóxica.

También encontramos modificaciones relacionadas con mecanismos de regulación.

Muchos compuestos, por ejemplo, concentraciones picomolares de plomo, actúan como señales para la activación de genes implicados en rutas de regulación enzimática, como las catalizadas por proteínquinasas, o bien alteran factores de transcripción.

Los genes que son inducibles por los tóxicos son candidatos para su utilización como biomarcadores de la exposición. Los cambios pueden hacerse permanentes por exposiciones prolongadas y surgir así fenotipos resistentes que aportan información sobre las dianas bioquímicas y los mecanismos de defensa. En ocasiones, surgen espontáneamente, por mutación, cambios permanentes, hereditarios, se seleccionan de forma natural a lo largo del tiempo y son responsables de la heterogeneidad de los individuos. Son útiles en este caso como marcadores de la susceptibilidad individual.

Transcriptómica

Uno de los primeros cambios que una célula exhibirá después de la exposición a una sustancia tóxica es un cambio en la expresión del gen.

El transcriptoma (todas las especies maduras de mRNA presente en una célula en un punto dado en el tiempo) es dinámico y representa el estado estacionario entre la velocidad de síntesis (transcripción) y la degradación de mRNAs en una célula. Los toxicólogos han utilizado el denominado análisis de "Northern blot" para evaluar el nivel de expresión de genes individuales en células o tejidos durante décadas. El ensayo Transcriptase Polymerase Chain Reaction "(RT-PCR) permite medir cuantitativamente el número relativo de especies de mRNA de genes específicos. Utilizando cebadores generales, también es posible amplificar el transcriptoma completo cuantitativamente para hacer muchas copias completas in vitro. Así, se puede obtener grandes cantidades de material para el análisis a partir de un número relativamente pequeño de las células. Utilizando tecnologías de microarrays, donde decenas de miles de oligonucleótidos únicos (o cDNAs) están anclados en una matriz sólida, es posible evaluar cuantitativamente la expresión de miles de ARNm únicos en una sola muestra, lo que permite capturar un perfil de expresión de todo el transcriptoma en un análisis.

Los perfiles de expresión génica pueden ser utilizados para proporcionar señales de tipo específico de respuesta tóxica, como una respuesta celular al daño del ADN o al estrés oxidativo.

Se espera que los ensayos de expresión génica puedan ser utilizados para facilitar una extrapolación más exacta entre especies, por ejemplo, los cambios inducidos por tóxicos en la expresión de genes en hepatocitos de rata, puedan ser comparables con la expresión de hepatocitos humanos bajo las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, una de los principales desafíos en la toxicogenómica es que la regulación de la transcripción es altamente dinámica y que los perfiles de expresión cambian dramáticamente con la dosis y el tiempo. Debido a que la expresión funcional de un gen generalmente requiere la traducción del mRNA a una proteína, también hay un gran interés en el estudio del proteoma o de la totalidad de proteínas que están presentes en una célula o tejido a punto en el tiempo.

Proteómica

El análisis del proteoma de una célula o tejido es mucho más difícil que el análisis del transcriptoma, principalmente porque todavía no es posible "amplificar" el número de copias de proteínas en una célula. Además, la identificación inequívoca de proteínas específicas es mucho más difícil que la identificación de los ARNm individuales. La identificación de proteínas específicas se realiza generalmente utilizando una combinación de técnicas de separación (por ejemplo, electroforesis en gel 2D, cromatografía líquida de alta performance), seguido por espectrometría de masas en tándem para la identificación. El poder potencial de la proteómica reside en la capacidad de identificar patrones únicos de expresión de proteínas o la identificación de proteínas o péptidos, que son predictivos de una respuesta tóxica temprana o posterior desarrollo de la enfermedad.

Metabonomica o metabolomica

Se utiliza ambos términos en forma indistinta para describir el análisis del universo de las pequeñas moléculas que sirven como sustratos, productos y cofactores del medio de las reacciones enzimáticas y otros procesos metabólicos que definen las células vivas, y por lo tanto el organismo. Aunque se usan prácticamente en forma indistinta, para algunos autores los términos metabolómica y metabonomica hacen referencia a objetivos diferentes. Mientras la metabolómica cataloga y cuantifica a las moléculas pequeñas que se encuentran en los sistemas biológicos, la metabonomica estudia cómo cambian los perfiles metabólicos como respuesta a estreses, tales como enfermedades, tóxicos o cambios en la dieta.

Entre las posibles aplicaciones de la metabolómica se encuentran los estudios toxicológicos, ya que se podría estudiar el metaboloma de la orina y otros fluidos corporales para detectar los cambios fisiológicos causados por la exposición a un posible tóxico. Como parte de la genómica funcional, la metabolómica puede ser una herramienta para estudiar la función de los genes, a través de la mutación, delección o inserción de los mismos.

Los cambios metabólicos deben reflejar los cambios biológicamente relevantes en la transcripción del gen, la traducción, la función de las proteínas y otros procesos celulares, incluidas las respuestas temporales y adaptativas, ignorando cambios biológicamente irrelevantes en estos factores.

Se utilizan para este fin dos técnicas que permiten identificar y medir cientos, o incluso miles, de pequeñas moléculas en muestras biológicas: la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la espectrometría de masas. Ambos tienen sus ventajas y limitaciones y es probable que los enfoques más exitosos a la aplicación de la metabonomica a los problemas toxicológicos sea el empleo de ambas técnicas.

La toxicología ha evolucionado utilizando las herramientas científicas de avanzada, sin embargo sigue teniendo como finalidad elucidar los mecanismos de toxicidad y generar conocimiento para mejor entender el riesgo que provocan los xenobióticos utilizando tecnologías modernas.

Bibliografía

- Repetto, M. (1997). Toxicología fundamental. Ed. Díaz de Santo.
- Cassarett y Doull. (2005). Fundamentos de Toxicología. Ed. Mc Graw-Hill/Interamericana. Madrid-España.
- Eaton, D. and Klaassen, C. (2001). Chapter 2. Principles of Toxicology, en: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th edition: by Curtis D. Klaassen (Editor) By McGraw-Hill Professional.
- Haschek, Wallig & Rousseaux Editor. (2009). Fundamentals of Toxicologic Pathology, [2nd Edition](#), Elsevier.