

CAPITULO 2

Disposición de tóxicos

Autor: Leda Giannuzzi

Aportes de: Florencia Ortega y Ezequiel Ventosi

La toxicidad de una sustancia depende de la dosis. La concentración de un compuesto en su lugar de acción es proporcional a la dosis, pero existen diferencias cinéticas los compuestos en los cuales a una misma dosis dos compuestos generen concentraciones diferentes en un órgano o tejido. La disposición de un xenobiótico abarca los procesos de absorción, distribución y excreción. La Fig. 1 muestra las diferentes vías de absorción, distribución y excreción de tóxicos en el organismo.

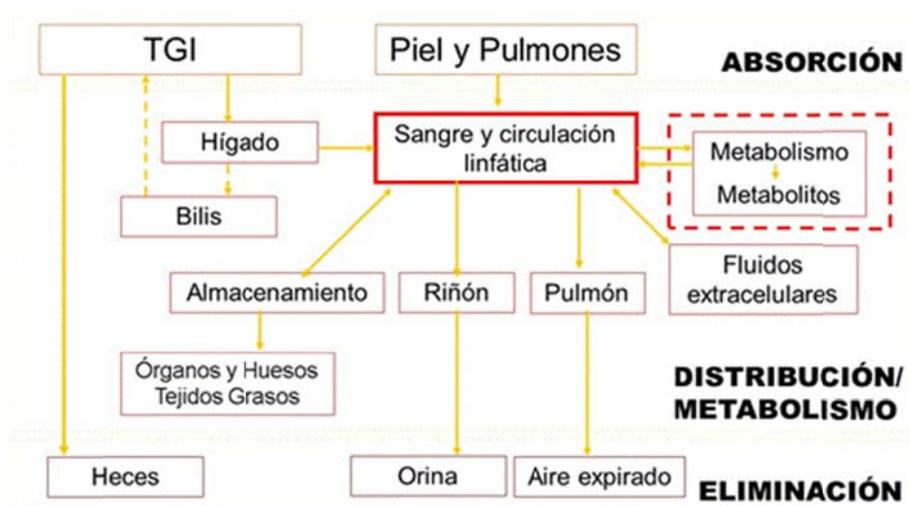


Figura 1: Vías de absorción, distribución y excreción de tóxicos en el organismo.

Una sustancia tóxica puede causar daño solo después de ser absorbida por el organismo.

Absorción

La **absorción** se define como el pasaje de un tóxico a través de una membrana hacia la circulación sanguínea. Esta puede ocurrir a través de la piel, tracto gastrointestinal, pulmones u otras vías de menor importancia.

La naturaleza de los efectos tóxicos de un producto químico depende de la concentración en los órganos objetivo. La concentración depende no solo de la dosis administrada sino también de otros factores: la absorción, distribución, unión a proteínas transportadores y excreción. Para ello, las sustancias deben atravesar membranas celulares (estratos bimolecular lípido-proteico).

El grado de absorción, distribución y excreción de tóxicos está influenciado por las propiedades físico químicas de éstos y de las moléculas que influyen en ese transporte.

La absorción depende de ciertas características de las sustancias químicas como ser el grado de ionización, la liposolubilidad. También depende del área en la cual se absorbe.

Existen conceptos importantes a tener en cuenta en este proceso. Los iones que forman hidratos de gran tamaño impiden el paso a través de la membrana o forman complejos tipo mucopolisacáridos. Las sustancias muy polares como las sales amonio cuaternario no se absorben.

Una molécula liposoluble se absorbe fácilmente. Para ácidos y bases débiles la absorción depende del grado de ionización que es función del pK de la sustancia y del pH del medio.

Existen diversos factores que influyen en estos procesos, entre ellos, la velocidad de absorción o la fracción de absorción. Una baja velocidad de absorción no permitirá alcanzar una concentración suficiente para causar toxicidad. Además, puede ocurrir que la distribución de la sustancia química no sea en el tejido blanco de acción y por ello, disminuye su toxicidad. Asimismo, la biotransformación del xenobiótico puede dar lugar a un compuesto más o menos tóxico con consecuencias en la concentración y toxicidad en el lugar de acción.

Por otra parte, si la sustancia química es eliminada rápidamente, menor será su concentración y por ende su toxicidad en el órgano. Si un compuesto se distribuye hacia el tejido adiposo es probable que su eliminación sea lenta dado que una concentración en plasma muy baja impide la eliminación renal o por otra vía rápida.

La piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal son las principales barreras que separan al organismo del medio que contiene gran cantidad de sustancias químicas. En los estudios toxicológicos experimentales a menudo se eligen otras vías como la intraperitoneal o la subcutánea.

Entre las diferentes vías de ingreso encontramos la intramuscular, la inhalatoria, a través de mucosas, la intraperitoneal, la rectal, la subcutánea, la intramuscular, la oral y la cutánea.

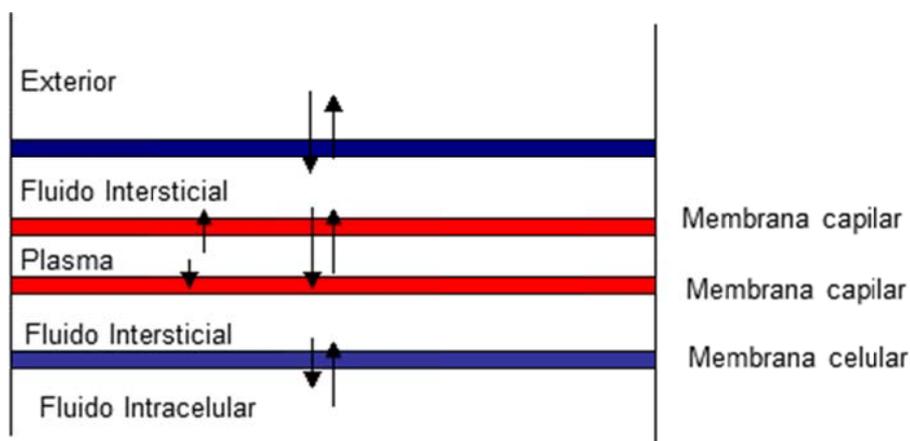


Figura 2: Absorción de los tóxicos

Los tóxicos atraviesan las membranas por mecanismos de transporte pasivo o activo. Las moléculas orgánicas lipofílicas difunden a través de la membrana por difusión simple. Las moléculas hidrofílicas pequeñas difunden por canales acuosos dependiendo de su gradiente de potencial químico. Para moléculas grandes, se forma un complejo liposoluble en la superficie de la membrana que difunde a favor de un gradiente de concentración. El mecanismo de transporte activo implica a un portador que desplaza células a través de una membrana en oposición a un gradiente de concentración. Requiere gasto de energía metabólica y puede ser inhibido por sustancias que interfieran en el metabolismo celular.

Sistema gastrointestinal (TGI)

El estómago es un sitio de absorción importante para ácidos débiles que existirán en la forma difusible no ionizada soluble de lípidos. La absorción en el intestino se realiza también por difusión y debido a su pH casi neutro, las bases y ácidos débiles no ionizados se pueden absorber con facilidad.

También existe reacciones con sustancias contenidas en el estómago (alimentos, medicamentos (gel de aluminio) o secreciones como mucina, pepsina, lipasa. Los metales tóxicos se absorben en baja cantidad.

El sistema digestivo puede visualizarse como un tubo que recorre todo el cuerpo. Su contenido debe ser considerado como exterior al organismo: los tóxicos no producirían daño hasta que no sean absorbidos por las paredes de algún tramo del TGI. La mayoría necesitará pasar a la sangre para ejercer su efecto. La absorción puede producirse en cualquier sitio a lo largo del TGI, desde la boca hasta el recto.

La nitroglicerina administrada sublingual se utiliza para tratar episodios de angina de pecho en personas que padecen la enfermedad de las arterias coronarias. Si el tóxico es un ácido o una base débil, se absorberá por difusión en aquella zona del tracto donde el pH asegure la máxima concentración de la forma no ionizada, la más liposoluble. Considerando que el jugo gástrico del estómago es muy ácido y que el contenido intestinal es prácticamente neutro, veremos que la absorción de un tóxico puede ser marcadamente distinta según la zona del TGI. Por ejemplo, la proporción de ácido benzoico o de anilina que existen en forma ionizada en el estómago y en el intestino se puede calcular así:

Para ácidos débiles

$$pK_a - pH = \log \frac{[\text{noionizada}]}{[\text{ionizada}]}$$

Ácido benzoico: pKa = 4
Estómago: pH 2

$$4 - 2 = \log \frac{[\text{noionizada}]}{[\text{ionizada}]}$$

Para bases débiles

$$pK_a - pH = \log \frac{[\text{ionizada}]}{[\text{noionizada}]}$$

Anilina: pKa = 5
Estómago: pH 2

$$5 - 2 = \log \frac{[\text{ionizada}]}{[\text{noionizada}]}$$

$$100 = \log \frac{[\text{noionizada}]}{[\text{ionizada}]}$$

$$1000 = \log \frac{[\text{ionizada}]}{[\text{noionizada}]}$$

La relación favorece la absorción en el estomago

Intestino pH= 6

Intestino pH=6

$$4 - 6 = \log \frac{[\text{noionizada}]}{[\text{ionizada}]}$$

$$5 - 6 = \log \frac{[\text{ionizada}]}{[\text{noionizada}]}$$

$$-2 = \log \frac{[\text{noionizada}]}{[\text{ionizada}]}$$

$$-1 = \log \frac{[\text{ionizada}]}{[\text{noionizada}]}$$

$$1/300 = \log \frac{[\text{noionizada}]}{[\text{ionizada}]}$$

$$1/10 = \log \frac{[\text{ionizada}]}{[\text{noionizada}]}$$

La relación favorece la absorción en el intestino

Podemos concluir que un ácido débil alcanza su máxima proporción de forma no-ionizada en el estómago (menor pH) y será predominantemente absorbido en ese comportamiento. Por otra parte, una base débil se absorberá preferentemente en el intestino (mayor pH). Debe considerarse además la capacidad del intestino delgado para absorber ácidos orgánicos débiles debido a su gran área absorptiva respecto a la del estómago y por ello, la cantidad absoluta que finalmente pasa de la sustancia es grande, aun cuando la forma no ionizada es proporcionalmente menor.

El TGI de los mamíferos posee sistemas especializados de transporte para la absorción de nutrientes y electrolitos: conocemos que los azúcares presentan un transportador particular; los aminoácidos son absorbidos de tres maneras diferentes; hay un transporte activo para las pirimidinas y los iones calcio, sodio y hierro tienen sistemas de transporte independientes. Los tóxicos aprovechan estos mecanismos fisiológicos para absorberse. Así es que 5-fluoruracilo (utilizada en terapia contra el cáncer) entrará como una pirimidina normal, el talio utiliza al transportador de hierro y el plomo con el transportador de calcio. La absorción de algunos metales es un proceso en dos etapas: el hierro difunde en las células intestinales y luego es transportado activamente a la sangre. El cobalto y el manganeso compiten con Fe en este sistema.

Pocos tóxicos que se absorben de modo activo en el TGI, la mayoría pasa por difusión simple. Debe considerarse que los mecanismos que regulan la absorción de tóxicos son de tipo generales. Si un compuesto tiene baja liposolubilidad, no significa que no será absorbido y por ello no tendrá efecto dañino; aún la entrada de una pequeña fracción de la dosis total puede

resultar tóxica. Los mecanismos que regulan la absorción de compuestos no liposolubles no están aún bien entendidos.

El epitelio del TGI tiene capacidad para absorber también materia particulada. Ejemplos de esto son ciertos colorantes azoicos o polímeros que pasan a las células intestinales como vesículas (por pinocitosis), siguen a la capa conjuntiva (lamina propria), y pasan finalmente al sistema linfático.

La estabilidad química de las sustancias frente al pH ácido del estómago, a las enzimas digestivas de éste y del intestino y a la flora intestinal es de importancia crucial en la toxicidad resultante. Por ejemplo, un veneno de víbora no es demasiado tóxico si es administrado oralmente, por la degradación enzimática que sufre en el TGI. En el estómago pueden formarse nitrosaminas carcinogénicas cuando debido al bajo pH, los nitritos utilizados como conservantes en chacinados reaccionan con aminos secundarias presentes naturalmente en frutas y pescado. La ingestión de nitratos en el agua de consumo es mucho más peligrosa en niños que en adultos, ya que ambos difieren en la calidad y ubicación de la flora intestinal que puede metabolizar nitrato a nitrito, un agente metahemoglobinizante. La flora intestinal es capaz también de realizar reducciones de grupos nitro-orgánicos, resultando en un factor carcinogénico para el hombre.

Varios factores son capaces de alterar la absorción gastrointestinal de tóxicos. Por ejemplo, el EDTA aumenta la permeabilidad de las membranas hacia todo tipo de compuestos debido a que secuestra al calcio. La alteración de la motilidad intestinal es otro factor importante pues a mayor tiempo de residencia mayor será la proporción absorbida y más interacciones adversas con la flora bacteriana pueden producirse. Las características físico-químicas de las sustancias influyen: la solubilidad en agua determinará qué proporción está efectivamente en solución y en contacto con el epitelio intestinal. A su vez el tamaño de partícula influye sobre la cinética de la disolución. Debido a esto el mercurio metálico tiene baja toxicidad oral y el óxido de As^{+3} varía su toxicidad de acuerdo con el tamaño de la partícula.

La velocidad de vaciamiento gástrico y la velocidad de tránsito intestinal también afectan la velocidad de absorción; si el xenobiótico pasa con rapidez por el intestino, no alcanza a entrar en contacto con la mucosa y sale intacto del tubo digestivo.

Luego de la absorción de un xenobiótico por vía oral, éste llega a la circulación general que depende de la cantidad absorbida por las células intestinales y de la biotransformación que ha sido realizada en dichas células, así como de la extracción hepática hacia la bilis. Este fenómeno de eliminación de las sustancias antes de su entrada a la circulación general se denomina **efecto del primer paso**. Es la inactivación que sufren en el hígado los xenobióticos antes de alcanzar el plasma.

Sistema respiratorio

El sitio de absorción son los alvéolos de los pulmones. La absorción se relaciona el área alveolar, el flujo sanguíneo y la proximidad de la sangre al aire alveolar. La absorción depende de la solubilidad del gas en sangre. La absorción de tóxicos gaseosos también aumenta en proporción a la diferencia de su presión parcial entre los alvéolos y la sangre venosa pulmonar.

En la Figura 3 se puede ver que cuando un tóxico gaseoso es inhalado, los tejidos toman el gas a partir de la sangre que los irriga. Los tejidos altamente vascularizados se saturarán rápidamente mientras que los poco vascularizados alcanzarán el equilibrio en mayor tiempo. La difusión de gas hacia la sangre ocurre hasta que las moléculas de gas en la sangre se equilibran con las moléculas de gas en el espacio alveolar. Una vez alcanzado el equilibrio la concentración de xenobiótico en sangre y en fase gaseosa es constante. Esta proporción de solubilidad se denomina coeficiente de reparto entre la sangre y el gas y es una constante de cada gas.

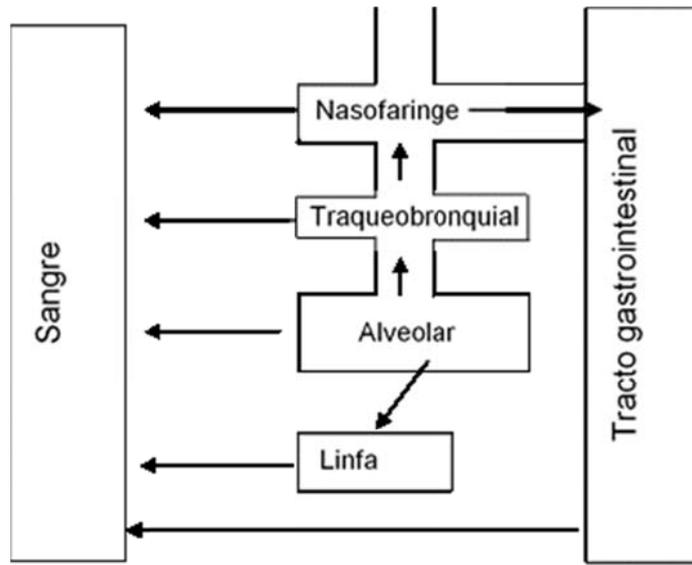


Figura 3: Esquema de la absorción y el transporte de sustancias químicas por el tracto respiratorio

Los factores ventilación, solubilidad, flujo sanguíneo pulmonar y diferencia de presión parcial alveolar sanguínea, pueden interaccionar entre sí. Si un gas es relativamente insoluble en sangre, la concentración alveolar iguala rápidamente la concentración inspirada y la absorción depende, principalmente del flujo sanguíneo a través del pulmón. Si un gas es muy soluble en sangre, la mayor parte del gas es retirado por la sangre hacia los tejidos y la absorción depende principalmente de la velocidad y profundidad de la respiración. Además, se absorben aerosoles (partículas sólidas o líquidas en fase gaseosa). Ej. Polvos, vapores, humos, pólenes y neblinas. El lugar de depósito de un aerosol en el tracto respiratorio es de gran importancia por combinación de fuerzas de absorción y mecanismos de remoción con la anatomía del tracto respiratorio.

Partículas entre 5 y 30 μ se depositan en la región nasofaríngea por impactación. Partículas entre 1 a 5 μ se depositan en la región traqueobronquial por sedimentación favorecido por la menor velocidad de la corriente aérea que permite la depositar por gravedad. Las partículas menores de 1 μ penetran en los alvéolos y se depositan por difusión. El movimiento browniano aumenta con la disminución del tamaño de partícula. La difusión es importante en los alvéolos.

La remoción alveolar se realiza por tres mecanismos:

- 1) Transporte hasta la capa mucociliada y de allí al sistema gastrointestinal
- 2) Fagocitosis por los macrófagos
- 3) Sistema linfático donde algunas partículas permanecen por períodos prolongados.

La eliminación de partículas de los alveolos es muy ineficiente, el primer día solo se elimina un 20% de las partículas y la porción que permanece más de 24 horas se elimina muy lentamente. La velocidad de depuración puede inferirse a partir de la solubilidad del compuesto en el líquido pulmonar, cuanto menor sea la solubilidad menor será la velocidad de eliminación.

Piel

La absorción percutánea ocurre a través de la piel (**epidermis** epitelio queratinizado estratificado escamoso, **dermis** capa fibroelástica rica en vasos y nervios e **hipodermis** tejido conectivo y adiposo). El espesor de la epidermis varía considerablemente dependiendo de su localización. La permeabilidad de la piel depende de la capacidad de difusión como del grosor del estrato córneo. Este es más grueso en la palma de las manos (entre 400-600 μ en zonas callosas) que, en brazos y espalda, piernas y abdomen (8-15 μ).

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.

El área de la epidermis representa un área de cien mil veces mayor que las otras vías de absorción. Los tóxicos difunden por la piel según sea su liposolubilidad. El tetracloruro de carbono y cloroformo penetran fácilmente por esta vía y pueden producir daño hepático severo. Los éteres glicólicos se absorben rápidamente por esta vía y producen toxicidad sistémica. Trabajadores que aplican pesticidas indica que la ruta dérmica gran potencial para la exposición ocupacional. Fosfatos orgánicos, paratión, malatión, insecticidas nicotínicos pueden ser absorbidos por la vía dérmica. Se ha informado efectos tóxicos en niños que han estado en contacto con contenedores vacíos de pesticidas tóxicos.

En 1980 en Argentina la absorción del derivado mercurial acetato de fenilmercurio por vía percutánea a través de pañales de tela que habían sido tratados en lavanderías con este compuesto provocaron una serie de reacciones en lactantes como ser sudoración, irritabilidad, alteraciones gastrointestinales, insomnio, mareos, anorexia y ftofobia.

Otras sustancias químicas que producen quemaduras por contacto por piel en bajas concentraciones son las mostazas nitrogenadas (β , β diclorodietil sulfuro o los análogos de lewisita clorovinil diclorarsina. Además, los gases nerviosos como Sarin se absorben por piel intacta.

El estrato córneo juega un rol crítico en la abrasión o remoción de esta capa provocando un aumento abrupto en la permeabilidad de la epidermis. El contenido de agua desempeña un papel importante en el proceso. El contenido normal (90 g agua/g tejido seco) aumenta la permeabilidad del estrato córneo.

La permeabilidad cutánea depende de la especie. La piel de la rata y conejo es más permeable que la del conejo. La del humano es similar al cobayo, mono y cerdo.

La absorción por piel incluye la difusión de sustancias a través de las capas inferiores de la epidermis (estrato granuloso, espinoso y germinativo) y de la dermis. Estas capas presentan un efecto barrera menor al del sustrato corneo y contiene un medio de difusión acuoso poroso y no selectivo. Los tóxicos cruzan esta zona mediante difusión y alcanzan la circulación general mediante los capilares venosos y linfáticos de la dermis.

Otras vías de absorción

Estas vías se utilizan en estudios de animales de laboratorio. Por la vía enteral, los tóxicos ingresan directamente en el aparato gastrointestinal. Los tóxicos administrados intraperitonealmente se absorben a través de la circulación portal y llegan primero al hígado antes de alcanzar los demás órganos y pueden incorporarse a la circulación general y distribuirse en otros órganos.

Distribución

Después que una sustancia química entra en la sangre, se distribuye rápidamente por todo el cuerpo. La velocidad de distribución en cada órgano está relacionada con el flujo sanguíneo a través del órgano, la facilidad con que el producto atraviesa la pared capilar local, la membrana celular y la afinidad de componentes del órgano con el xenobiótico.

Barreras

La **barrera hematoencefálica** está ubicada en la pared capilar. No es un obstáculo absoluto para el pasaje de tóxicos hacia el sistema nervioso central (SNC) pero es menor permeable que otras zonas del cuerpo. Las sustancias tienden a pasar por el endotelio capilar mismo. La acción de barrera hacia el pasaje de tóxicos es debido a razones tanto fisiológicas como anatómicas. Entre ellas podemos citar a la unión muy estrecha que presenta el epitelio capilar del SNC dejando pocos poros entre las células. Además, las células endoteliales de los capilares contienen proteínas mdv dependientes de ATP. La proteína mdv expulsa gran cantidad de sustancias fuera de la célula. Crea un flujo de expulsión de la célula dependiente de ATP con una amplia especificidad de sustrato. Existe como mecanismo de defensa contra sustancias xenobióticas.

Otra causa es que los capilares están rodeados por prolongaciones de células de la glía (astrocitos). Por último, las concentraciones de proteínas en el líquido intersticial son mucho menor que en otros líquidos del cuerpo que limita el movimiento de sustancias insolubles en agua mediante transporte paracelular. En medio fundamentalmente acuoso el transporte es posible cuando los compuestos están unidos a proteínas.

La baja concentración de proteínas del líquido intersticial del cerebro y el enlace a proteínas no sirve como mecanismo para la transferencia de sustancias tóxicas de la sangre al cerebro. Por ello, la penetración de sustancias tóxicas en el cerebro depende de su liposolubilidad. El metil mercurio entra en el cerebro con facilidad y su toxicidad principal se manifiesta en el sistema nervioso central. En contraste, compuestos inorgánicos del mercurio insolubles en lípidos no entran al cerebro con facilidad ejerciendo su efecto tóxico en el riñón.

La barrera hematoencefálica está poco desarrollada en el niño al nacer por eso algunas sustancias químicas son más tóxicas en recién nacidos que en adultos. El plomo produce encefalopatías en ratas recién nacidas, pero en adultas debido al desarrollo de la barrera.

La **barrera placentaria** difiere anatómicamente entre diversas especies animales. El número de capas cambia a medida que progresa la gestación. Posee sistemas de transporte activo y enzimas de biotransformación que protege al feto de ciertas sustancias. Las sustancias difunden desde la sangre de la madre al feto. La concentración de las sustancias en los diversos tejidos del feto dependerá cada tejido para concentrar el tóxico.

La concentración de metil mercurio puede ser mayor en ciertos órganos fetales como cerebro debido a que la barrera sanguínea fetal es menos efectiva que en el adulto.

El **eritrocito** desempeña un papel interesante en la distribución de ciertos tóxicos. Su membrana representa un obstáculo para el pasaje del mercurio inorgánico, pero no para el alquilmercurio. Existe afinidad en el citoplasma del eritrocito por alquilmercurio. Debido a ello, la concentración de compuestos inorgánicos de mercurio en los eritrocitos es solo casi la mitad que en el plasma mientras que la de metil mercurio en el eritrocito es casi 10 veces mayor que en el plasma.

Almacenamiento de sustancias tóxicas en tejidos

La unión de un compuesto químico a un tejido puede dar lugar a una mayor concentración en el tejido. Los tóxicos se concentran en un tejido específico que puede ser el lugar de acción tóxica o no. En la medida que los tóxicos son biotransformados o excretados se irán liberando desde los depósitos. Por ello, la vida media del tóxico puede ser muy larga.

Las proteínas del plasma unen constituyentes fisiológicos normales en el cuerpo, así como compuestos extraños. La mayoría de los xenobióticos se unen a la albúmina y por lo tanto no están disponibles de inmediato para su distribución al espacio extracelular.

La albúmina puede unir Ca, Cu, Zn, bilirrubina, ácido úrico, vitamina C, adenosina, tetraciclina, cloranfenicol, digoxina, ácidos grasos, suramina, penicilina, salicilato, colorantes ácidos, sulfamidas, estreptomycin, rojo fenol, histamina, tiroxina, barbitúricos, entre otros). Debido a la reversibilidad del enlace, la sustancia química enlazada puede ser separada de la albúmina. La

importancia toxicológica de esto se manifiesta con la posible inducción del estado de coma por la administración de fármacos de sulfonamida a pacientes que toman medicamentos antidiabéticos. Estos medicamentos se unen a las proteínas, pero pueden ser reemplazados por las sulfonamidas con mayor afinidad por las proteínas del plasma. Por lo tanto, los medicamentos antidiabéticos liberados pueden provocar un coma hipoglucémico.

El hígado y el riñón tienen una mayor capacidad de enlace de sustancias químicas. Esta característica se puede relacionar con sus funciones excretorias y metabólicas.

Ciertas proteínas se han identificado por sus propiedades de enlace específico por ejemplo las metalotioneínas que son importantes en el enlace cadmio en el hígado y riñón y en la posible transferencia del metal del hígado al riñón. La unión de una sustancia a una proteína de un órgano puede aumentar su concentración en un órgano con rapidez. El plomo luego de 30 minutos de administración se encuentra 50 veces más concentrado en hígado que en plasma.

El tejido adiposo es un importante depósito de almacenamiento de sustancias liposolubles como DDT, bifenilos policlorados (PCB). Las concentraciones en plasma de las sustancias almacenadas en grasas pueden aumentar marcadamente como resultado de la movilización de la grasa que sigue luego de un adelgazamiento brusco.

Los huesos es el sitio principal del almacenamiento de sustancias tóxicas como fluoruros, plomo y estroncio. El almacenamiento se realiza a través de una reacción de adsorción de intercambio entre los tóxicos alojados en el líquido intersticial y los cristales de hidroxapatita del mineral óseo. En virtud de la similitud de tamaño y carga, los iones fluoruro reemplazan fácilmente al OH^- y el calcio puede ser reemplazado por el plomo o estroncio. Estas sustancias almacenadas pueden ser liberadas por el intercambio iónico y por disolución de cristales óseos a través de la actividad osteoclástica.

Excreción

Se excretan las sustancias químicas originales o sus metabolitos y/o como conjugados de ellas. La ruta principal de excreción es la orina, pero el hígado y los pulmones también son importantes.

Excreción urinaria se realiza por los mismos mecanismos que se utilizan en la eliminación de productos finales del metabolismo: filtración glomerular, difusión tubular y secreción tubular.

Los capilares glomerulares tienen poros grandes (40 Å), la mayoría de las sustancias se filtrarán en el glomérulo salvo aquellas que sean muy grandes 60000 de peso molecular o que estén ligadas a proteínas plasmáticas. Luego, será **reabsorbida** en forma pasiva por las células tubulares si tiene un alto coeficiente de partición lípido/agua o bien permanecerá en el lumen tubular y será excretada si se trata de un compuesto polar. El pH de la orina influye en la reabsorción de compuestos. En la Figura 4 se observa que el fenobarbital (barbitúrico de características ácidas) es más retenido en el organismo cuando la orina es ácida. En cambio, si la orina es alcalina la depuración por el riñón aumenta considerablemente.

Un tóxico se puede excretar también a través de los túbulos hacia la orina por difusión pasiva. Como la orina normalmente es ácida, éste proceso desempeña un papel importante en la excreción de gases orgánicos. Los ácidos orgánicos tienen poca probabilidad de ser excretados por difusión pasiva a través de las células tubulares. No obstante, a menudo los ácidos débiles se metabolizan en ácidos más fuertes y aumentar las formas iónicas que no se reabsorben a través de las células tubulares y son excretadas.

Ciertas sustancias tóxicas pueden ser secretadas por las células de los túbulos proximales hacia la orina. Existen dos mecanismos distintos, uno para ácidos orgánicos (conjugados con ácido glucurónico y sulfato) y otro para bases orgánicas. Los tóxicos unidos a proteínas también pueden ser excretados por orina siempre que el enlace sea reversible. Además, xenobióticos de características químicas similares compiten por el mismo sistema de transporte. Ejemplo el promenecid aumenta el nivel sérico de la penicilina y prolonga su actividad bloqueando su excreción tubular.

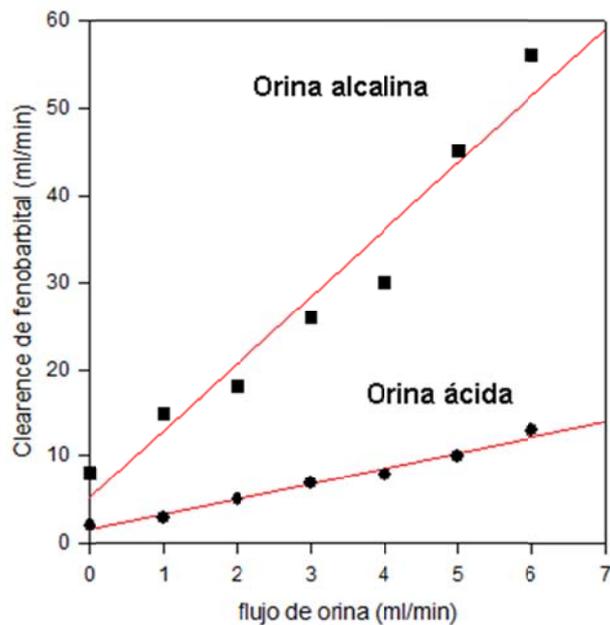


Figura 4: Eliminación por orina del fenobarbital en orina ácida y alcalina

Algunas sustancias se excretan por orina mediante secreción activa. La Fig. 5 muestra las diferentes familias de transportadores presentes en el riñón. Los transportadores oat, se sitúan en la membrana basolateral del túbulo proximal. La familia de oct capta determinados cationes. Una vez que los xenobióticos se encuentran en las células tubulares serán segregados hacia el lumen por las proteínas mdry mrp. El transportador de catión orgánico octn2 y el transportador de pépticos PEP2 reabsorben las sustancias químicas desde el lumen tubular. A diferencia de lo que ocurre en la filtración los tóxicos unidos a proteínas estos pueden acceder al transporte activo.

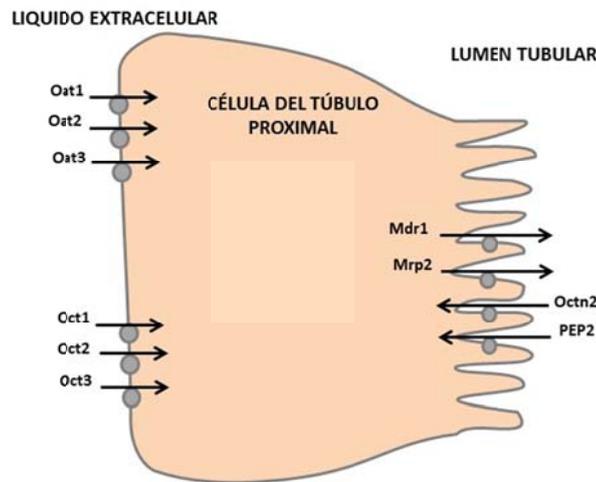


Figura 5: Modelo esquemático que muestra los sistemas de transporte en el túbulo proximal del riñón. Transportadores de aniones orgánicos (oat), Transportadores de cationes orgánicos (oct), proteína de multiresistencia (mdr) y transportadores de pépticos (PEP)

Muchas funciones de los riñones no están desarrolladas al nacer por ello algunos xenobióticos se eliminan más lentamente en los recién nacidos y puede resultar ser más tóxicos en ellos. Es posible estimular el desarrollo del transportador de ácidos orgánicos mediante la administración de sustancias que son excretadas por este transportador. En el túbulo proximal se reabsorben las proteínas plasmáticas que se han filtrado en el glomérulo. Por ello un toxico unido a estas proteínas puede ser transportado al interior de la célula y causar efecto tóxico.

Excreción biliar

El hígado es otro órgano importante para la excreción de sustancias tóxicas, en especial para compuestos de alta polaridad (aniónicos y catiónicos) que se encuentran unidos a proteínas plasmáticas, así como para compuestos de pesos moleculares mayores de 300. Estos compuestos en la bilis no son reabsorbidos en la sangre y se excretan por materia fecal. Hay excepciones como los conjugados con glucurónido que se hidrolizan por la flora intestinal haciendo posible la reabsorción de sustancias tóxicas libres. Compuestos que se excretan por vía biliar son: digoxina, verde de indocianina, la oubaína y más notable el dietilestilbestrol (DES). En animales de laboratorio, es posible observar que si los conductos biliares se ligan la toxicidad puede aumentar 130 veces.

La Fig. 6 muestra los numerosos transportadores que contienen los hepatocitos que trasladan las sustancias extrañas desde el plasma al hígado y desde el hígado hasta la bilis.

Hígado

El péptido taurocolato dependiente de sodio (Ntcp), presente en la cara sinusoidal del hepatocito transporta los ácidos biliares como taurocolatos hacia el hígado, mientras que la proteína excretora de sales biliares (bsep) transporta los ácidos biliares afuera de los hepa-

tocitos hacia los canalículos biliares. En la membrana sinusoidal del hepatocito existen numerosos transportadores el oatp1 y 2, el transportador específico del hígado (1sp), los transportadores de cationes orgánicos (oct), que introducen los xenobióticos en el hígado. Luego el xenobiótico en el hepatocito es transportado hacia la sangre o bilis o bien ser bio-transformado hasta convertirse en un compuesto hidrosoluble que será transportado hacia la bilis o nuevamente a la sangre.

Las proteínas de multiresistencia (mdr1) y (mpr2) transportan los xenobióticos hacia la bilis mientras que las mpr3 y mpr6 devuelven los xenobióticos hacia la sangre.

Una vez en la bilis alcanza el intestino y el compuesto puede reabsorberse o eliminarse por heces. Muchos compuestos orgánicos se conjugan antes de ser excretados por la bilis. Sin embargo, la flora intestinal puede hidrolizar los conjugados de glucurónico y sulfato proporcionándole lipofiliidad para ser reabsorbido y acceder al ciclo enterohepático.

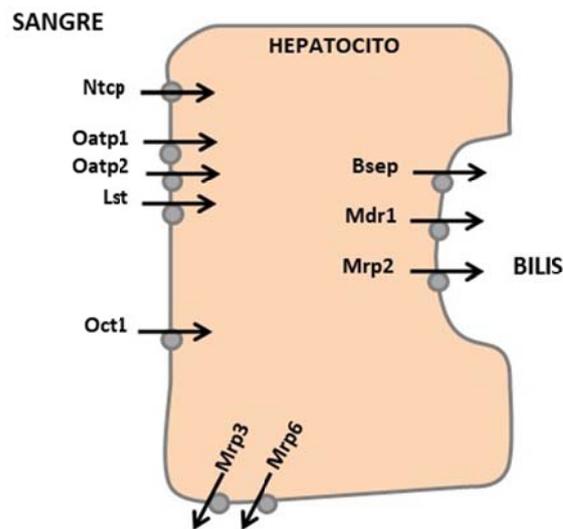


Figura 6: Modelo esquemático del sistema de transporte en el hígado Péptido- α -taurocolato dependiente de sodio (Ntcp), Polipéptido transportadores de aniones orgánicos (oatp), Transportadores específico del hígado (1sp), proteínas secretoras de sales biliares (bsep) Transportadores de cationes orgánicos (oct), proteína de multiresistencia (mdr) y (mpr).

Pulmones

Las sustancias que existen en fase gaseosa a la temperatura del cuerpo, se excretan por los pulmones. Los líquidos volátiles también se excretan en aire espirado. La excreción de sustancias tóxicas por los pulmones se realiza por difusión simple a través de las membranas celulares.

Otras vías de excreción

Leche: la excreción se realiza por difusión simple. Como la leche es ligeramente ácida, los compuestos básicos alcanzarán un nivel más elevado en la leche que en el plasma mientras que sucede lo contrario para los compuestos ácidos. Los compuestos lipofílicos (DDT, PCB) alcanzarán un nivel superior en leche que en plasma debido a su contenido graso. Otras vías son el sudor y la saliva

Niveles de sustancias tóxicas en el organismo

La naturaleza e intensidad de los efectos tóxicos de un producto químico depende de su concentración en el lugar de acción es decir la dosis efectiva que difiere de la dosis administrada. Como el nivel del tóxico en la sangre se determina con mayor facilidad, en especial en cierto intervalo de tiempo, es el parámetro que se emplea a menudo en estudios toxicocinéticos. La influencia en el nivel de excreción se visualiza en los ejemplos en los cuales la sacarina es excretada con rapidez por lo que su nivel en sangre disminuye rápidamente aún después de una administración repetida. Por otra parte, el metil mercurio se excreta muy lentamente y su acumulación gradual culmina en un nivel casi estable solo después de 270 días.

Biotransformación de tóxicos

Muchos productos químicos sufren biotransformaciones (transformación metabólica) mientras están en órganos y tejidos. La biotransformación se define como: *la suma de procesos por el cual los compuestos químicos extraños son sujetos a cambios químicos por los organismos vivos*. El sitio más importante para que ocurran las biotransformaciones es el **hígado**; otros órganos donde la biotransformación ocurre son pulmones, estómago, intestino, piel, riñones, glándulas adrenales, testículos, ovarios, placenta, etc. La capacidad hepática para biotransformar tóxicos, reside fundamentalmente en las células epiteliales.

Los organismos animales han desarrollado un número de procesos bioquímicos que convierten a los compuestos lipofílicos en metabolitos más hidrofílicos. Este aumento en la hidrosolubilidad reduce su partición en membranas biológicas y su distribución en tejidos, reduciendo así la reabsorción de compuestos en los túbulos renales e intestino y promueve la excreción de los mismos por la orina heces y bilis. Se sabe que no siempre las biotransformaciones de sustancias biológicamente activas en el organismo conducen a la inactivación. El proceso de biotransformación tiene importancia crucial en la manifestación tóxica de un xenobiotico. En la mayoría de los casos la biotransformación puede disminuir la toxicidad de los compuestos, pero en otros casos, puede aumentarla. Muchas veces el compuesto original no es tóxico, pero sí lo es su producto de biotransformación, ese es el caso del metanol o el etanol donde su biotransformación conduce a metabolitos tóxicos como formaldehído y acetaldehído respectivamente.

Muchas de las reacciones de biotransformación metabólica que culminan en la producción de metabolitos inactivos de compuestos endógenos, generan metabolitos biológicamente activos de compuestos exógenos. La biotransformación ocurre tanto sobre xenobióticos como en diversos compuestos endógenos como esteroides, vitaminas y ácidos grasos. El proceso de biotransformación se ha dividido en dos grandes grupos de actividad enzimática: reacciones de fase I y reacciones fase II, tal como se presenta en la Figura 7.

Luego, los metabolitos activados podrán reaccionar con macromoléculas como los ácidos nucleídos, las proteínas, los lípidos, interactuar con receptores, enzimas y producir los efectos

biológicos que conducirán a la sintomatología observada. Los productos de biotransformación, ya sea los metabolitos activos como los inactivos, así como el tóxico original pueden seguidamente ser eliminados mediante la excreción siendo la vía renal una de la más importante.

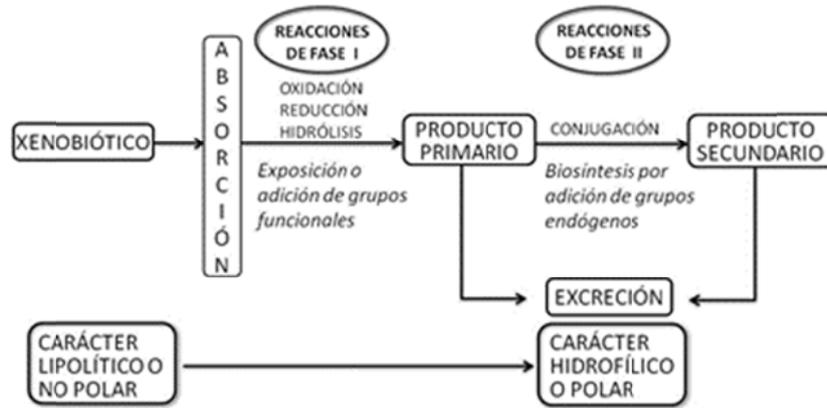


Figura 7: Integración del proceso de biotransformación de xenobióticos

En términos generales podemos decir que la biotransformación es la conversión de sustancias químicas endógenas y exógenas en compuestos más hidrofílicos. En la biotransformación participan un pequeño grupo de enzimas que presentan una amplia afinidad por el sustrato. Las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por la biotransformación permiten variar los efectos biológicos de las sustancias. Algunas de las enzimas que participan en este proceso son inducibles, es decir se sintetizan en respuesta al xenobiótico, sin embargo, la mayoría de las enzimas son constitutivas, es decir, responsables de los procesos vitales fundamentales, y su síntesis se realiza en ausencia de un estímulo externo. La manera en la cual los compuestos se vuelven más hidrosolubles es mediante el proceso de biotransformación que introducen grupos polares en partes de la molécula de menor polaridad.

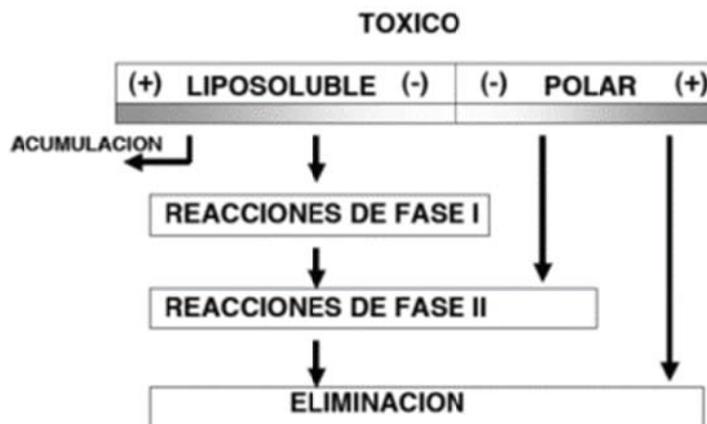


Figura 8: Fases de la biotransformación de tóxicos

Como se mencionó anteriormente, este proceso ocurre en dos etapas:

- En **fase I** cursan con transformación de determinados grupos funcionales en otros nuevos. Por ejemplo un alcohol se puede transformar en un aldehído, o un éster se hidroliza para dar un ácido y un alcohol, o un resto no polar de un hidrocarburo alifático o aromático se oxida para dar un alcohol o un fenol de naturaleza polar, etc.
- En la **fase II** ocurren reacciones de conjugación donde se combinan los xenobióticos o los metabolitos que resultan de la fase I, con moléculas endógenas de bajo peso molecular, como el sulfato, el ácido glucurónico, la glicina, el agua, grupos metilo, etc.

Es importante la existencia de estas dos etapas ya que, no siempre la biotransformación que ocurre en la etapa I, produce una pérdida de actividad biológica indeseable para el organismo o en el grado de hidrosolubilidad que permite la excreción rápida.

Las reacciones de biotransformación de los xenobióticos se clasifican según sean de funcionalización (fase I) o de biosíntesis (fase II).

Las reacciones de fase I exponen o introducen un grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH₂, o COOH) al xenobiótico original y comprenden reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Estas reacciones pueden dar origen a un pequeño aumento de hidrofilia.

La biotransformación de fase II abarcan reacciones de glucuronización, sulfonación (sulfatación), acetilación, metilación, conjugación con glutatión (síntesis de ácidos mercaptúricos), conjugación con aminoácidos como la glicina, taurina y el ácido glutámico. La mayoría de las reacciones provocan un importante aumento en la hidrofilia del xenobiótico y ello favorece la excreción. Los productos de estas reacciones de conjugación, son en general, más polares y de menor actividad biológica. Esta reacción de conjugación ocurre sobre un grupo funcional del xenobiótico o en sus metabolitos, por ejemplo, un alcohol, un fenol, un resto carboxilo de un ácido, un amino, etc.

Las reacciones de la etapa I se denominan reacciones de funcionalización donde a los xenobióticos se exponen los grupos funcionales. Estas reacciones son de oxidación, reducción o procesos de hidrólisis.

Las reacciones de la etapa II presentan reacciones de síntesis que conducen a la formación de glucurónidos, acetamidas, ácidos mercaptúricos, ácidos hipúricos, metilaminas, etc.

Dentro de la célula en particular, gran parte de la actividad metabolizante reside en el retículo endoplásmico y en el citosol, aunque también pueden efectuarse biotransformaciones en mitocondrias, cubierta nuclear y membrana plasmática. La mayor parte de las reacciones correspondientes a la etapa I, se producen en el retículo endoplásmico, tanto en su componente rugoso como en el liso. Una fracción menor de esos procesos pueden realizarse en la membrana externa de la envoltura nuclear.

Las enzimas que catalizan los procesos en la etapa II ocurren predominante en el citosol, como la *sulfotransferasa*, la *metil transferasa*, mientras que la enzima *glucuronil transferasa* y la *epóxidohidratasa* están ubicadas en el retículo endoplásmico. Las reacciones de acetilización ocurren fundamentalmente en las mitocondrias y en el citosol.

Biotransformaciones de fase I y fase II

Con la homogenización y la centrifugación diferencial de los tejidos, el retículo endoplasmático y los fragmentos de membrana, forman microvesículas llamadas microsomas. Los microsomas son artefactos del retículo endoplasmático formadas artificialmente a través ruptura de las células eucariotas. Se aíslan por centrifugación diferencial a 10000 g y 100000 g.

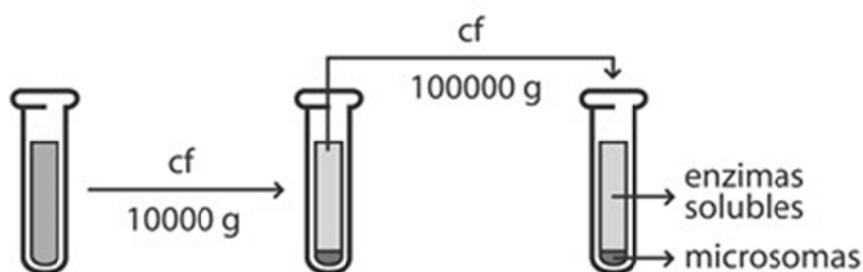


Figura 9: Separación de los microsomas

En el primer paso, las enzimas y los microsomas solubles permanecerán en el sobrenadante. En el segundo paso, solamente enzimas solubles permanecen en el sobrenadante y los microsomas sedimentan. Los microsomas son herramientas para el estudio de metabolismo in vitro.

Caracterización de enzimas microsomales de fase I

La Fig. 10 muestra las transformaciones que provocan los procesos de oxidación, reducción e hidrólisis, que productos se forman y se mencionan algunos ejemplos de compuestos que son procesados de ese modo. Se conocen los siguientes procesos: oxidación alifática, hidroxilación aromática, epoxidación, desaminación oxidante, N-desalquilación, O-desalquilación, S-desalquilación, N-oxidación, N-hidroxilación, P-oxidación, sulfoxidación, desulfuración. Las reducciones de sustancias tóxicas pueden llevarse a cabo por enzimas reductasas que llevan a cabo reacciones de nitroreducción, azoreducción.

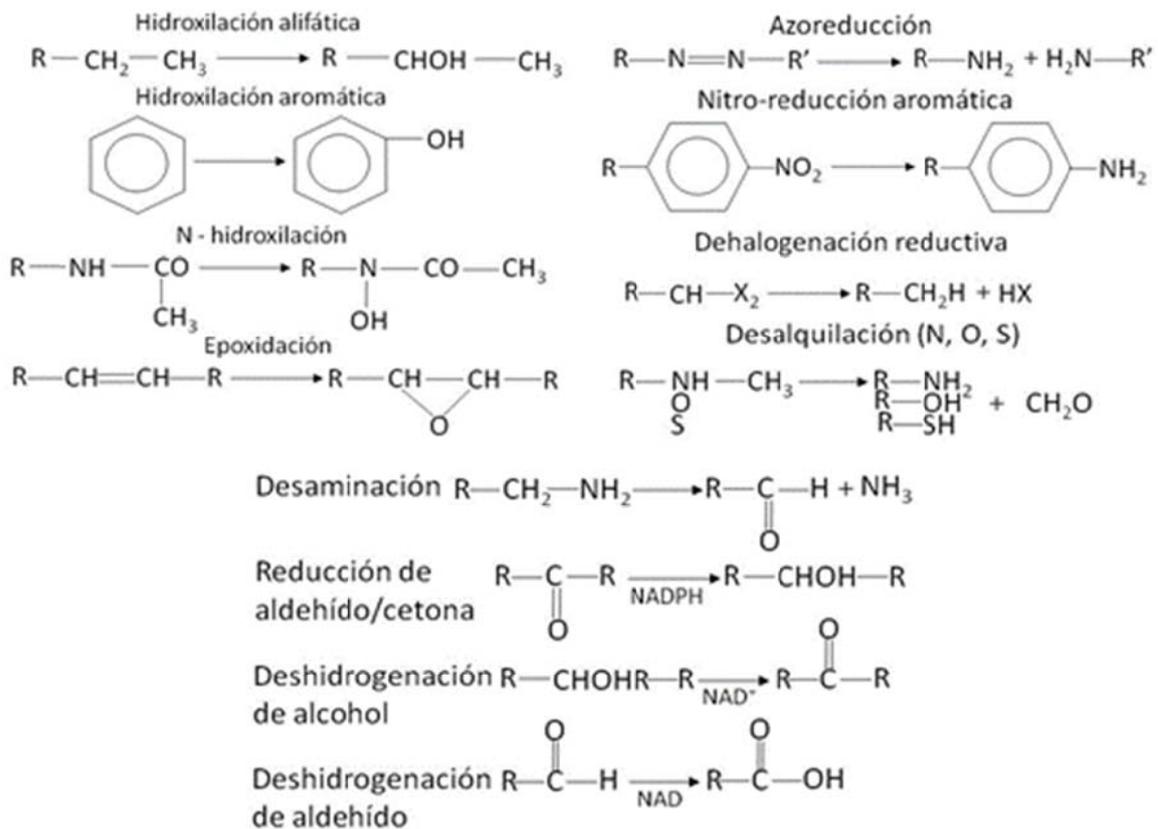


Figura 10: Reacciones de biotransformación

Oxidaciones

Existen una gran variedad de enzimas que realizan oxidaciones, se describirán solo las de mayor relevancia toxicológica. Entre ellas podemos nombrar: Alcohol deshidrogenada (ALD), aldehído deshidrogenada (ALDH), monoaminooxidasa (MAO), la cooxidación dependiente de peroxidasas y flavinmonooxigenasas y el citocromo P-450.

Alcohol deshidrogenasa

El alcohol se metaboliza en el organismo fundamentalmente por dos enzimas hepáticas, la *alcohol deshidrogenasa* (ADH) y la *acetaldehído deshidrogenasa* (AIDH). La acumulación del primer metabolito de la degradación del alcohol, el acetaldehído, es el responsable de importantes efectos en la intoxicación tanto aguda como crónica (Fig. 11).

La enzima *alcohol deshidrogenasa* es una enzima citosólica presente en diversos tejidos como el hígado, riñones, pulmones, mucosa gástrica. Existen 4 clases de ADH, las de clase I (α -ADH, β -ADH y γ -ADH) son las responsables de oxidación del etanol y otros alcoholes alifáticos pequeños. La de clase II (δ -ADH) se expresa sobre todo en el hígado donde oxidan preferentemente alcoholes aromáticos y alifáticos mayores. La de clase III (χ -ADH) oxidan preferentemente alcoholes de cadena larga (pentanol y mayores) y alcoholes aromáticos. Las de clase IV (ϵ -ADH y μ -ADH) no se expresan en el hígado y son activas para la oxidación del retinol.

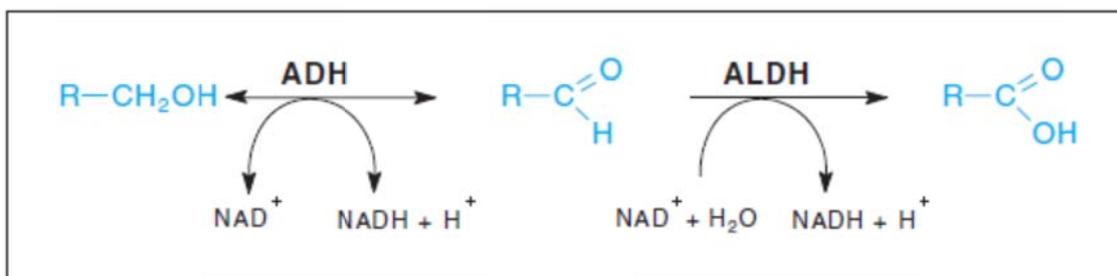


Figura 11: Oxidación de alcoholes a aldehídos y a ácidos carboxílicos por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH)

La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) presenta diversas isoenzimas, codificadas por al menos, cinco genes diferentes. Se clasifican en tres clases de acuerdo con: su movilidad electroforética, sus propiedades inmunológicas, la especificidad de sustrato y su sensibilidad frente a inhibidores.

La enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) oxida los aldehídos para formar ácidos carboxílicos utilizando NAD^+ como cofactor. Tienen también actividad estearasa.

Las distintas ALDH se distinguen por su secuencia primaria de aminoácidos y por su estructura cuaternaria. La ALDH es una enzima microsomal y gracias a su elevada afinidad por los aldehídos simples como el acetaldehído.

Está además ampliamente demostrado el carácter heredable del desarrollo de alcoholismo mediante estudios epidemiológicos realizados en gemelos di- y monocigóticos y en hijos de padres alcohólicos adoptados por familias no alcohólicas. No obstante, el establecimiento de un patrón genético de riesgo debe tomar en consideración el polimorfismo de la ADH, el de la ALDH, el del CYP-450IIE1 (responsable del MEOS) y quizás también los de la transferrina y la GGT (gamma glutamil transpeptidasa), ambas polimórficas y afectadas por la ingesta crónica de alcohol.

La ALDH2 es una enzima mitocondrial que, en virtud de su alta afinidad, es principalmente responsable de la oxidación de aldehídos simples, tales como acetaldehído (K_m para acetaldehído $<5 \mu M$ a pH 7,4). Un polimorfismo genético para ALDH2 se ha documentado en humanos. Un alto porcentaje (45 a 53 %) de la población japonesa, china, coreana, taiwanesa y vietnamita son deficientes en actividad de ALDH2 debido a una mutación puntual. Este alélico inactivo, la variante de ALDH2 se conoce como ALDH2*2, para distinguirla de la enzima activa, de tipo salvaje, ALDH2*1. Esta misma población (es decir, los asiáticos del Pacífico) también tiene una alta incidencia de la forma atípica de ADH (es decir, ADH*2), lo que significa que rápidamente convierten el etanol en acetaldehído, pero solo convierten lentamente el acetaldehído en ácido acético. También tienen una prevalencia relativamente alta de una deficiencia de actividad de ADH clase IV, que afecta el metabolismo gástrico del etanol). Como resultado, muchos asiáticos experimentan un síndrome de rubefacción después del consumo de alcohol debido a una rápida acumulación de acetal-

dehído, que desencadena la dilatación de los vasos sanguíneos faciales a través de la liberación de catecolaminas. Los nativos americanos también experimentan un síndrome de rubor después de consumir alcohol, aparentemente porque expresan otra variante alélica de ALDH2 y / o porque la oxidación de acetaldehído en los eritrocitos de la sangre se ve afectada en estos individuos, posiblemente debido a la expresión de una forma variante de ALDH1. Las variantes genéticas funcionales de ADH que rápidamente convierten el etanol en acetaldehído (es decir, ADH*2) y las variantes genéticas de ALDH que desintoxican lentamente acetaldehído, protegen contra el consumo excesivo y el alcoholismo.

La inhibición de ALDH por disulfiram (Antabuse) provoca una acumulación de acetaldehído en alcohólicos. El efecto desagradable (nauseas) del acetaldehído sirve para disuadir el consumo continuado de etanol. Sin embargo, es importante tener en cuenta que una predisposición hacia el alcoholismo no está simplemente determinada por factores que afectan la farmacocinética del etanol y sus metabolitos. Estudios en humanos y roedores implicados en el receptor de serotonina 1b, receptor de dopamina D2, triptófano hidroxilasa y neuropéptido han sido propuestas como dianas candidatas de susceptibilidad genética en la acción farmacodinámica de etanol. Las deficiencias genéticas en otras ALDH afectan el metabolismo de otros aldehídos, que es la base subyacente de ciertas enfermedades. Por ejemplo, deficiencia de ALDH4 perturba el metabolismo de la prolina y causa hiperprolinemia de tipo II, cuyos síntomas incluyen retraso mental y convulsiones. Una deficiencia de ALDH10, que desintoxica los aldehídos grasos, perturba el metabolismo de los lípidos de la membrana. Esta es la base subyacente del síndrome de Sjörger-Larson, cuyos síntomas incluyen ictiosis (retraso mental y hemiplejia o tetraplejia espástica progresiva).

Las consecuencias toxicológicas de una deficiencia heredada o adquirida de ALDH (inducida por fármacos) ilustran que los aldehídos son más citotóxicos que los alcoholes correspondientes. Esto es especialmente cierto para el alcohol alílico ($\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{OH}$), que se convierte por ADH en la acroleína altamente aldehído hepatotóxica ($\text{CH}_2 = \text{CHCHO}$) La oxidación de etanol por ADH y ALDH conduce a la formación de ácido acético, que se oxida rápidamente a dióxido de carbono y agua. Sin embargo, en ciertos casos, los alcoholes se convierten en ácidos carboxílicos tóxicos, como en el caso de metanol y etilenglicol, que se convierten a través de intermedios de aldehído en ácido fórmico y en ácido oxálico, respectivamente. Los ácidos fórmico y oxálico son considerablemente más tóxicos que el ácido acético. Por esta razón, el envenenamiento con metanol y etilenglicol es comúnmente tratado con etanol, que inhibe competitivamente la oxidación de metanol y etilenglicol por ADH y ALDH. El potente inhibidor de ADH, el 4-metilpirazol (fomepizol) también se usa para tratar el envenenamiento por metanol y etilenglicol.

La monoaminoxidasa (MAO): interviene en la desaminación oxidativa de aminas primarias, secundarias y terciarias como las catecol aminas y de numerosos xenobióticos. La desaminación oxidativa de aminas primarias produce amoniaco más un aldehído mientras que la de una amina secundaria da lugar a una amina primaria y un aldehído. Los aldehí-

dos formados por la MAO suelen luego seguir oxidándose por otras enzimas para producir los ácidos carboxílicos correspondientes. La MAO se localiza en el cerebro y en la membrana externa de las mitocondrias en el hígado, los riñones, intestino y plaquetas. El sustrato es oxidado por la MAO la cual a su vez se reduce mediante FAD. El oxígeno incorporado procede del agua. El ciclo catalítico se completa mediante la reoxidación de la enzima reducida $FADH_2 \rightarrow FAD$ por el oxígeno lo que genera peróxido de hidrogeno.

Otros dos sistemas enzimáticos oxidativos son de importancia en la biotransformación de xenobióticos son el sistema flavinmonooxigenasa y el citP-450.

El sistema flavinmonooxigenasa se ubica en el hígado, riñones y pulmones y presenta una o más monooxigenasa que contienen FAD (flavinmonooxigenasa FMO o aminoxidasa) las cuales oxidan los heteroátomos nucleofílicos de nitrógeno, azufre y fósforo de diversos xenobióticos.

El grupo prostético flavin es característico de este tipo de enzima y es especialmente versátil en su funcionamiento como ciclo redox. El ciclo catalítico se muestra en la Fig. 12.

Este sistema microsomal cataliza el ataque oxidativo sobre grupo nucleofílicos (heteroátomos N y S) de varios xenobióticos. Las reacciones catalizadas por este sistema son oxidaciones de aminas alifáticas, aromáticas, así como amidas entre otras. La familia de genes de la FMO de los mamíferos consta de cinco enzimas microsómicas que requieren NADPH y O_2 siendo muchas de las reacciones catalizadas por FMO son también llevadas a cabo por el sistema citocromo P-450. Una vez que la molécula de FAD se reduce a $FADH_2$ mediante NADPH el cofactor $NADP^+$ oxidado permanece unido a la enzima. El $FADH_2$ se une a continuación al oxígeno para formar un peróxido que es relativamente estable. Durante la oxidación de los xenobióticos se transfieren peróxidos $X \rightarrow X_o$. El último paso del ciclo catalítico implica la reconversión del FAD a su estado oxidado y la liberación de $NADP^+$. Este paso final es la etapa limitante de la velocidad y ocurre tras la oxidación del sustrato.

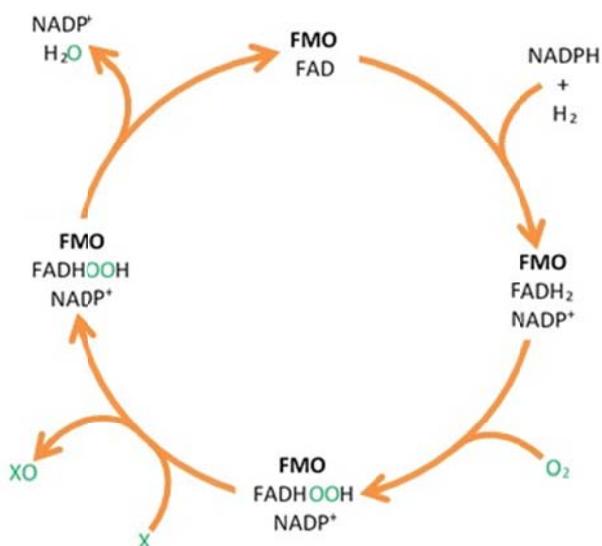


Figura 12: Ciclo catalítico de la flavinmonooxigenasas

Citocromo P-450

Entre las enzimas de biotransformación de fase I, el sistema del citocromo P-450 ocupa el primer lugar en términos de versatilidad catalítica y el gran número de xenobióticos desintoxica o activa a intermediarios reactivos. La actividad catalítica del sistema monooxigenasaes capaz de llevar a cabo una variedad de diferentes reacciones con un gran número de sustratos. Esta capacidad está basada en la presencia de una variedad de isoenzimas del citocromo P-450. La mayor concentración de enzimas P-450 involucrado en la biotransformación xenobiótica se encuentra en el retículo endoplásmico del hígado (microsomias), pero las enzimas P-450 están presentes en prácticamente todos los tejidos. En el hígado, las enzimas microsómicasP-450 juegan un papel muy importante en la determinación de la intensidad y la duración de la acción de los fármacos, y también juegan un papel clave en la desintoxicación de xenobióticos. Las enzimas P-450 en el hígado y los tejidos extrahepáticos desempeñan un papel importante en la activación de los xenobióticos a los metabolitos tóxicos y/o tumorigénicos.

Las enzimas mitocondriales del P-450 desempeñan un papel clave en la biosíntesis o el catabolismo de las hormonas esteroides, los ácidos biliares, las vitaminas liposolubles, los ácidos grasos y los eicosanoides, lo que indica la versatilidad catalítica del citocromo P-450.

Todas las enzimas P-450 son proteínas que contienen hemo. El hierro hemo en el citocromo P-450 está usualmente en el estado férrico (Fe^{3+}). Cuando se reduce al estado ferroso (Fe^{2+}), el citocromo P-450 puede unirse a ligandos como el O_2 y el monóxido de carbono (CO). El complejo entre el citocromo ferroso P-450 y el CO absorbe la luz al máximo a 450 nm, de la cual el citocromo P-450 deriva su nombre.

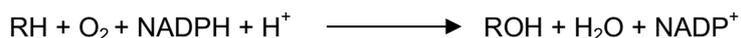
La familia de enzimas del citocromo P-450 constituye el principal catalizador de las reacciones de fase I. Las enzimas del citocromo P-450 son proteínas de membrana con grupo hemo. Dichas hemoproteínas están en estrecha relación con una segunda proteína de membrana, la NADPH-citocromo P-450 reductasa a una razón aproximada de diez moléculas de citocromo P-450 por una de reductasa. La flavoproteína reductasa contiene cantidades equimolares de flavina-adeninadineucleótido (FAD) y es la fuente que provee uno o dos electrones, necesarios para la reacción de oxidación. La interacción entre las proteínas del citocromo P-450 y su reductasa se ve facilitada por la bicapa lipídica en la que están incluidas.

El citocromo P-450 y su reductasa, forman un acople multienzimático que presenta cierta movilidad en las membranas del retículo endoplásmico. El componente lipídico del sistema, es un fosfolípido, la fosfatidilcolina. Otros fosfolípidos y algunos detergentes no iónicos pueden reemplazar a este componente. La función de estos fosfolípidos parece ser que facilitan la transferencia de electrones al citocromo P-450. También se observó que el componente lipídico aumenta la afinidad de los sustratos y del citocromo *P-450 reductasa* por el citocromo P-450. El citocromo P-450 está ampliamente distribuido en la naturaleza, se lo ha encontrado en: bacterias, insectos, animales y en plantas. Participa activamente en el metabolismo de sustratos endógenos como, por ejemplo, ácidos grasos, prostaglandinas y esteroides (ej., colesterol,

hormonas esteroideas, vitamina D, ácidos biliares). Básicamente, este sistema agrega grupos oxidrilos a los xenobióticos.

Ciclo catalítico del citocromo P-450 dependiente del Sistema monooxigenasa

La reacción catalizada por el citocromo P-450 es la monooxigenación donde se incorpora un átomo de oxígeno en un sustrato, designado RH, y el otro es reducido a agua con equivalentes reductores derivados de NADPH, de la siguiente manera:



Durante la catálisis, el citocromo P-450 se une directamente al sustrato y al oxígeno molecular, pero no interactúa directamente con NADPH o NADH. El mecanismo por el cual el citocromo P-450 recibe electrones de NAD(P)H depende de su localización subcelular. En el retículo endoplásmico, que es donde la mayoría de las enzimas P-450 involucradas en la biotransformación xenobiótica están localizadas, los electrones son transmitidos desde NADPH al citocromo P-450 a través de una flavoproteína llamada NADPH-citocromo P-450 reductasa. Dentro de esta flavoproteína, los electrones se transfieren del NADPH al citocromo P-450 a través de FMN y FAD.

Los fosfolípidos y el citocromo b_5 también desempeñan un papel importante en las reacciones del citocromo P-450. El citocromo P-450 y NADPH-citocromo P-450 reductasa se encuentran en la bicapa fosfolipídica del retículo endoplásmico, lo que facilita su interacción. El citocromo b_5 puede donar el segundo de los dos electrones requeridos por el citocromo P-450. El citocromo b_5 también puede aumentar la afinidad aparente con la cual ciertas enzimas P-450 se unen a sus sustratos; por lo tanto, el citocromo b_5 puede aumentar V_{\max} y/o disminuir la K_m aparente de las reacciones del citocromo P-450. En ambos casos, el citocromo b_5 aumenta V_{\max} / K_m , que es una medida de la eficiencia catalítica y aclaramiento intrínseco.

Los microsomas hepáticos contienen numerosas formas de citocromo P-450 pero solo una forma única de NADPH-citocromo P-450 reductasa y citocromo b_5 . Para cada molécula de NADPH-citocromo P-450 reductasa en microsomas de hígado de rata, hay de 5 a 10 moléculas de citocromo b_5 y de 10 a 20 moléculas de citocromo P-450.

La reductasa P-450 puede transferir electrones mucho más rápido que el citocromo P-450 puede usarlos, lo que explica la baja proporción de citocromo NADPH P-450 reductasa para el citocromo P-450 en microsomas hepáticos.

El ciclo catalítico del citocromo P-450 se muestra en la Fig. 13. La primera parte del ciclo implica la activación del oxígeno y la parte final involucra la oxidación del sustrato, lo que conlleva la abstracción de un átomo de hidrógeno o un electrón del sustrato seguido de rebote de oxígeno (radical recombinación). Después de la unión del sustrato a la enzima P-450, el hierro hemo se reduce del estado férrico (Fe^{3+}) al ferroso (Fe^{2+}) mediante la adición de un electrón único de NADPH-citocromo P-450 reductasa. La reducción del citocromo P-

450 se ve facilitada por la unión del sustrato. El oxígeno se une al citocromo P-450 en su estado ferroso, y el complejo $\text{Fe}^{2+} \text{O}_2$ se convierte en un complejo $\text{Fe}^{2+} \text{OOH}$ mediante la adición de un protón (H^+) y un segundo electrón, que se deriva del NADPH-citocromo P-450 reductasa o citocromo b_5 . La introducción de un segundo protón divide el complejo $\text{Fe}^{2+} \text{OOH}$ para producir agua y un complejo $(\text{FeO})^{3+}$, que transfiere su átomo de oxígeno al sustrato. La liberación del sustrato oxidado regenera el citocromo P-450 en su estado inicial. Si el ciclo catalítico se interrumpe (desacopla) luego de la introducción del primer electrón, el oxígeno se libera como anión superóxido (O_2^-).

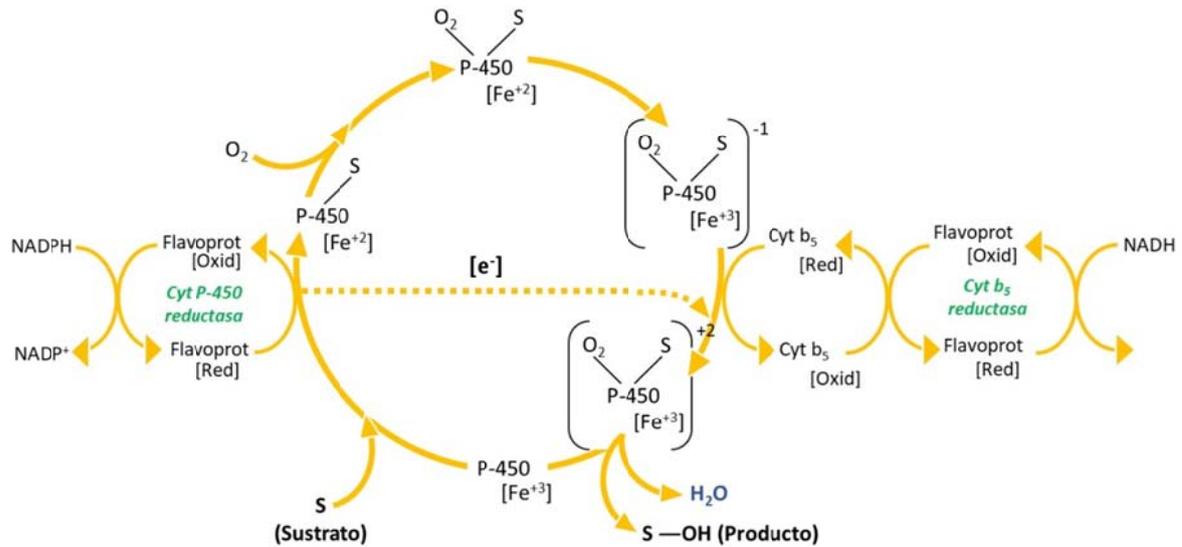


Figura 13: Ciclo catalítico en el cual se utiliza oxígeno y NADPH, produciéndose agua, NADP^+ y el sustrato es oxidado.

El citocromo P-450 cataliza varios tipos de reacciones de oxidación, que incluyen:

1. Hidroxilación de un carbono alifático o aromático.
2. Epoxidación de un doble enlace
3. Heteroátomo (S-, N- e I-) oxigenación y N-hidroxilación
4. Desalquilación de heteroátomo (O-, S-, N- y Si-)
5. Transferencia grupal oxidativa
6. Escisión de ésteres
7. Deshidrogenación

Las enzimas del citocromo CYP-450 involucradas en la oxidación de los pro-carcinógenos a formas carcinogénicas, está codificado por una superfamilia de genes. La expresión de estos genes, se encuentra regulada por factores ambientales, genéticos y a menudo, presentan grandes variaciones individuales.

Las enzimas constitutivas del sistema CYP-450 constituyen una gran superfamilia de proteínas hemo-tiolato involucradas en el metabolismo de una amplia variedad de compuestos endó-

genos y exógenos. Generalmente, actúan como oxidasas terminales en la cadena de transferencia de electrones.

Los sistemas enzimáticos aislados, han sido usados para definir los roles de enzimas individuales en varios procesos metabólicos. La oxidación se puede llevar a cabo en diversas reacciones y con frecuencia se forma más de un metabolito.

La superfamilia de los CYP se divide en familias y subfamilias definidas en base de la homología de secuencia aminoacídica.

Existe una nomenclatura para las isoenzimas del citocromo CYP-450. Las letras mayúsculas CYP indica que la isoenzima es de origen humano. Estas van seguidas de un número arábigo que indica la familia de la isoenzima o isoforma: CYP1. Las subfamilias se designan poniendo a continuación una letra mayúscula: CYP1A. El último número arábigo caracteriza la isoenzima individual: CYP1A1. En humanos se han identificado 12 familias y 20 subfamilias del gen del citocromo P-450, y a menudo en una sola célula existen diversas isoformas. La mayoría de los procesos de biotransformación es llevada a cabo por 3 familias de: CYP1, CYP2 y CYP3; dentro de estos la subfamilia CYP3A4 es la más abundante en humanos. La CYP3A4 es la principal isoforma metabolizadora de muchos de los medicamentos. Existe considerable variación entre individuos en cuanto al contenido de cada isoforma de CYP, habiéndose observado diferencias de hasta 6 veces para el CYP3A4, de hasta 10 veces para el CYP2A6 y de hasta 50 veces para el CYP2D6.

Este último polimorfismo divide a la población en fenotipos: metabolizadores rápidos y metabolizadores lentos. Entre el 5% y el 10% de la población caucásica y entre el 1% y el 2% de la asiática pertenece al segundo fenotipo. Algunos individuos son metabolizadores ultrarrápidos de la debrisoquina, lo cual correlaciona con el grado de amplificación del gen CYP2D6. En el caso del CYP2C19, la incidencia de metabolizadores lentos varía entre el 2% y el 6% en los caucásicos y entre el 18% y el 22% en los asiáticos.

Las enzimas CYP1A1, CYP2C, CYP2D6 y CYP2E1 son las enzimas polimórficas más importantes. Se describen a continuación las principales características de algunas de las enzimas de fase I.

CYP-4501A1 (actividad Arilhidrocarburo hidroxilasa, (AHH))

Son enzimas inducibles que interactúan con moléculas de estructura planar como TCDD, 3-metilcolantreno, benzo-a-pireno o naftoflavona. Se encuentran en placenta, piel, linfocitos y pulmón y parecen estar ausentes en el hígado. Su importancia radica en que ser las enzimas responsables de la activación metabólica de sustancias cancerígenas y teratógenas. Su actividad basal es baja y la presencia del xenobiótico induce su síntesis. Su actividad está regulada por el gen Ah que codifica la síntesis de un receptor citosólico AHR al que se une el xenobiótico. El complejo receptor-xenobiótico es transferido al núcleo, lo que induce la síntesis de CYP1A1. Existen dos alelos del locus Ah de forma que su expresión da lugar a individuos con actividad alta, intermedia y baja de la enzima. Los de actividad alta e intermedia son susceptibles al efecto carcinogénico por producir con facili-

dad el metabolito reactivo (epóxido), mientras que los de actividad baja son resistentes. La mutación, que da lugar al incremento de la actividad, consiste en un cambio de adenina a guanina en la región 3' lo que origina un polimorfismo de restricción (RFLP) detectable con la restrictasa msp1.

Asociadas a estas enzimas, la **epóxido hidroxilasa (EH)**, catalizan la transformación de los epóxidos a metabolitos más polares, jugando un papel importante tanto en la inactivación como en la activación de xenobióticos, dependiendo de los casos. Así, por ejemplo, inactiva los epóxidos de los hidrocarburos policíclicos generados por el sistema citP-450 formando dioles, o dihidrodioles, pero en ocasiones estos dihidrodioles son metabolizados de nuevo por el citP-450 a diol epóxidos altamente reactivos. Se encuentran en todos los tejidos. Se han caracterizado en mamíferos cinco clases de EH, inmunológica y estructuralmente diferentes, de las cuales dos participan en el metabolismo de xenobióticos, una soluble citosólica y otra microsómica polimórfica (EHm), cuyo gen se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 1. Se induce por diferentes sustancias, como el fenobarbital, el 2-acetilaminofluoreno o la aflatoxina B. El polimorfismo de la EHm es complejo, habiéndose detectado sustituciones de bases en la región codificante del gen, lo que determina distintos polimorfismos de restricción (RFLP) que afectan a la secuencia de aminoácidos de la enzima en dos lugares diferentes y otras, en la región flanqueante no codificante, que afectan a la regulación de la síntesis. La distribución de las frecuencias de los distintos polimorfismos, varía según las poblaciones.

CYP-4502C

Son enzimas responsables del metabolismo de numerosas sustancias entre ellas el diazepam, el omeprazol y el proguanil. El 2-3% de los individuos caucásicos y el 13 % de los no caucásicos son metabolizadores pobres, con un riesgo mayor a fallo terapéutico con la administración de estos medicamentos.

CYP-4502D6

Fue el primero de los polimorfismos oxidativos descrito al observar una eliminación lenta y un efecto farmacodinámico prolongado del fármaco hipertensivo debrisoquina. Este efecto aparece en aproximadamente un 8% de la población caucásica. Poco después se descubrió la oxidación defectuosa de la esparteína. Se demostró que tanto la 4-hidroxilación de la debrisoquina como la oxidación de la N-esparteína estaban determinadas por un mismo locus con dos variantes alélicas. La codeína, la mayoría de los fármacos antiarrítmicos de clase I, algunos antagonistas de los receptores b-adrenérgicos y del Ca^{2+} entre otros, se metabolizan por CYP2D6, siendo estas enzimas hepáticas las responsables de la mayoría de las reacciones adversas a medicamentos.

CYP-4502E1

En humanos este citocromo se encuentra en el hígado y en los linfocitos de sangre periférica. Forma el sistema oxidativo microsómico del etanol (MEOS) y está codificado por un gen que presenta varios polimorfismos de restricción detectables con las restrictasas Pst1 y Rsa1. Este sistema enzimático es responsable del metabolismo del etanol, de anestésicos volátiles como el halotano, y del relajante muscular cloroxazona, así como de la activación del acetaminofeno (paracetamol) a su metabolito arilado.

Todas estas enzimas comparten las siguientes características:

1. Poseen un grupo hemo;
2. Son enzimas de membrana unidas firmemente a la porción intracelular;
3. Utilizan para oxidar los sustratos al NADPH o al NADH y un átomo de oxígeno derivado del O₂ atmosférico y, los hidrogeniones se transfieren al citP-450 mediante una segunda enzima acoplada, la NADPH-citP-450 reductasa;
4. Están codificadas por una super familia de genes, dispersos por todo el genoma, que a su vez se agrupan en distintas familias, de las cuales, las más importantes son la I y la II.

Cooxidación de xenobióticos por prostaglandina H sintetasa

Otros caminos diferentes pueden ser involucrados en la oxidación de xenobióticos. La prostaglandina H sintasa (PHS) es la enzima responsable de la biosíntesis de prostaglandinas y es capaz de oxidar a benzopireno (BP) a quinonas. Dos actividades catalíticas copurificadas con la PHS (ácido graso ciclooxigenasa y prostaglandina peroxidasa).

La enzima ciclooxigenasa cataliza la oxidación de araquidónico a prostaglandina G₂ (también llamado hidroxindoperóxido) y la prostaglandina peroxidasa cataliza la reacción prostaglandina G₂ correspondiente alcohol (prostaglandina H₂). Prostaglandina sintasa es la mayor fuente de alquil hidroperóxidos producido durante el metabolismo normal.

La oxidación de xenobióticos mediante peroxidases implica una transferencia directa del peróxido de hidrógeno al xenobiótico, como se muestra en la Fig. 14 para la conversión del sustrato X al producto XO. Durante la reducción de un hidroperóxido por las peroxidases, los xenobióticos que pueden actuar como donantes de electrones como las aminas, y los fenoles también pueden oxidarse y formar radicales libres.

La mayoría de los tejidos que tienen actividad prostaglandina sintetasa son capaces de oxidar ciertos xenobióticos aún si los tejidos tienen bajo contenido de cit P-450. El acetaminofeno, el cual es activado a un intermediario reactivo por P-450 puede ser activado por prostaglandina sintasa en la medula del riñón. Este tejido es bajo en actividad cit P-450 pero en presencia de ácido araquidónico activa al acetaminofeno a un intermediario reactivo que se une a macromoléculas

La vejiga posee alta actividad prostaglandina sintasa. Se ha propuesto que varios carcinógenos de vejiga o de riñón son metabolizados activamente por prostaglandina sintasa.

Por. ej. el carcinógeno de vejiga 2-amino 4-5 nitrofuriltiazol puede ser activado por la prostaglandina sintasa por el mecanismo de cooxidación en el epitelio de la vejiga a metabolitos capaces de unirse al RNA o DNA. Alimentando a ratas con aspirina la lesión producida en la vejiga por el carcinógeno 5 nitrofurano es inhibida, lo que sugiere que prostaglandina sintasa está involucrada en la activación metabólica del 5 nitrofurano debido a que la aspirina inhibe la prostaglandina sintasa.

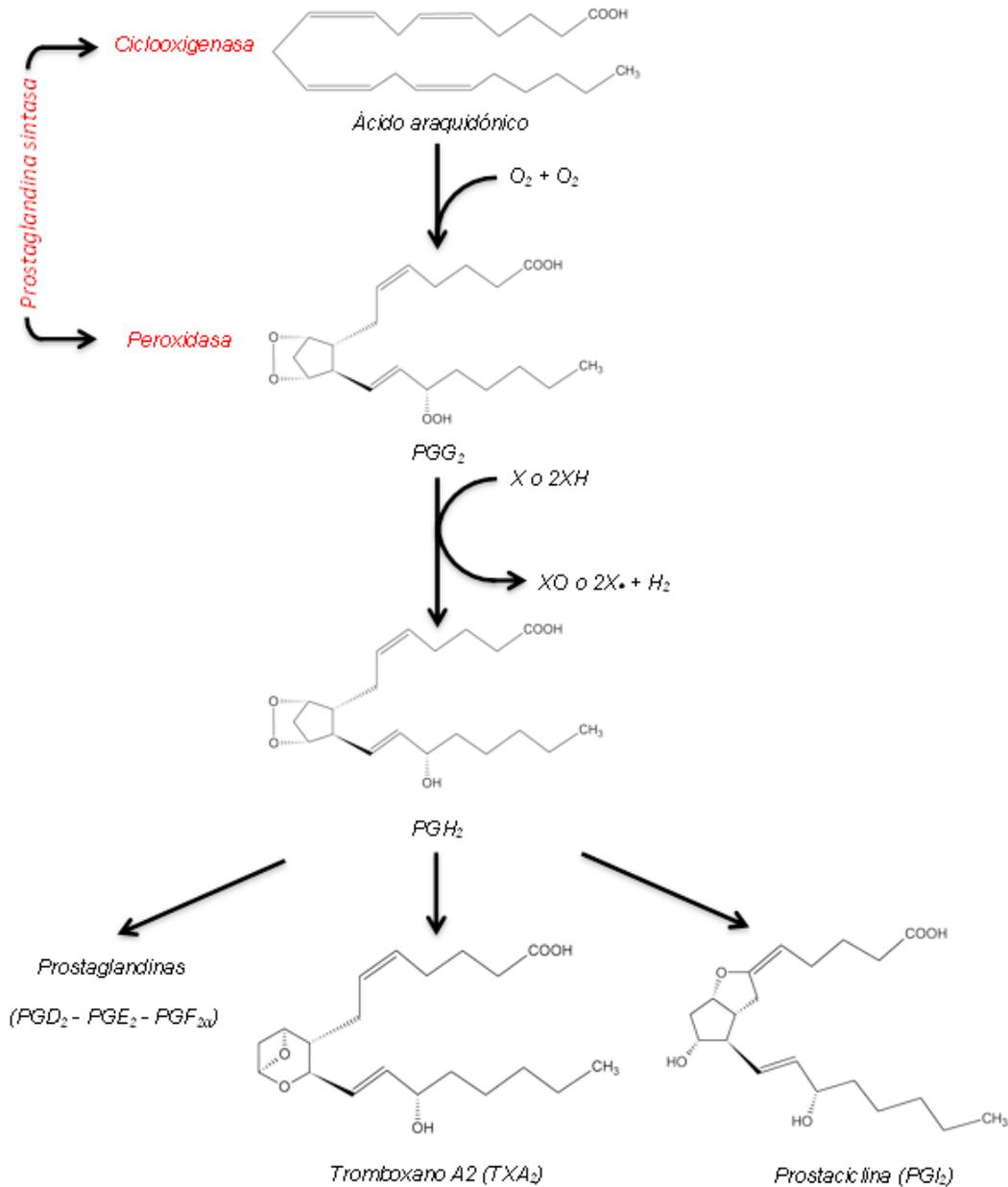


Figura 14: Co-oxidación de xenobióticos durante la conversión de ácido araquidónico a PGH₂ por la prostaglandina sintasa

Hidrólisis

La hidrólisis de ésteres, amidas y tiésteres del ácido carboxílico están catalizadas por las carboxilesterasas y dos esterasas la acetilcolinesterasa de la membrana de los eritrocitos y

las pseudocolinesterasas conocida también como butirilcolinesterasa encontradas en suero. Las esterasas son importantes en limitar la toxicidad de los organofosforados los cuales que inhiben la acetilcolinesterasa e impiden la acción del neurotransmisor acetilcolina.

Las carboxilesterasas son glicoproteínas presentes en suero y en la mayoría de los tejidos. Estas enzimas hidrolizan numerosos compuestos lipídicos endógenos y xenobióticos, esteres, amidas, y generan metabolitos activos. Además, pueden transformar a los xenobióticos en metabolitos tóxicos o carcinogénicos.

La enzima epóxido hidrolasa cataliza la adición de agua a epóxidos de alquenos o óxidos de areno. La enzima se encuentra en todos los tejidos. En mamíferos existen 5 variedades microsómica, hidrolasa soluble, la epóxido hidrolasa del colesterol y la hepoxilina hidrolasa. Estas últimas tres parecen catalizar epóxidos endógenos. Es una enzima inducible de los microsomas hepáticos. Su indicción está asociada a la del P-450.

Reducción

Algunos metales y xenobióticos con grupos aldehído, cetona, disulfuro, sulfoxido, quinona, nóxido, alqueno, azo, o nitro pueden sufrir reacciones de reducción.

La reducción de grupos azo y nitro esta catalizada por la flora gastrointestinal y dos enzimas hepáticas el citocromo P-450 y la NADPH-quinona oxido reductasa conocida como DT diaforasa. Estas reacciones requieren NADPH y son inhibidas por oxígeno, por ello el ambiente anaerobio del tubo digestivo distal es adecuado para la reducción de grupos azo y nitro.

La reducción de grupos carbonilos como los aldehídos son reducidos a alcoholes primarios y las cetonas a alcoholes secundarios por la alcohol deshidrogenasa y una familia de carbonilo reductasa. Esta enzima depende de NADPH y se encuentra en sangre y otros tejidos. La hepática se encuentra en el citosol.

La reducción de grupos disulfuros a partir de glutatión y esta catalizado por la glutatión reductasa.

Reducción de grupos sulfoxidos y N-oxidos: la enzima tioredoxina se encuentra en el citosol de las células hepáticas y renales y reducen los grupos sulfoxidos formados por el P-450. Cuando la tensión de oxígeno es baja, la reducción dependiente de NADPH de los grupos N-oxido puede ser catalizada por el citocromo P-450 o por la NADPH citocromo P-450 reductasa en los microsomas.

La reducción de grupos quinonas se realiza por la NADPH quinonaoxidoreductasa (DT diaforasa) a hidroquinonas. Esta enzima es una flavoproteína citosólica y opera en ausencia de consumo de oxígeno. Esta vía no genera stress oxidativo. Una segunda vía de reducción de grupos quinona llevados a cabo por la NADPH citocromo P-450 reductasa produce la formación de radicales libres semiquinona. El estrés oxidativo que acompaña la autooxidación del radical libre genera anión superóxido, peróxido de hidrogeno, y otras especies reactivas de oxígeno que son citotóxicos.

Deshalogenación. Existen tres grandes mecanismos para deshalogenar: 1) deshalogenación reductiva en el que se sustituye el halógeno por hidrogeno, la deshalogenación oxidativa

donde se sustituye el halógeno por oxígeno, y deshalogenación doble donde se sustituye dos halógenos de carbonos adyacentes y formar un doble enlace.

Reacciones enzimáticas de fase II

Las reacciones biotransformación de fase II son reacciones de síntesis. Requieren energía y cofactores de alta energía.

Glucuronosiltransferasas

Representa una de las principales reacciones de fase II en la conversión de xenobióticos y compuestos endógenos apolar y compuestos solubles en agua. El resultante glucuronido es eliminado del cuerpo en la orina y en la bilis. Esta reacción ocurre con para un amplio rango de sustratos y en una gran variedad de especies. La enzima UDP glucuronosiltransferasa cataliza la reacción entre UDP-ácidoglucurónico y el grupo funcional sobre la molécula aceptora (Fig. 15).

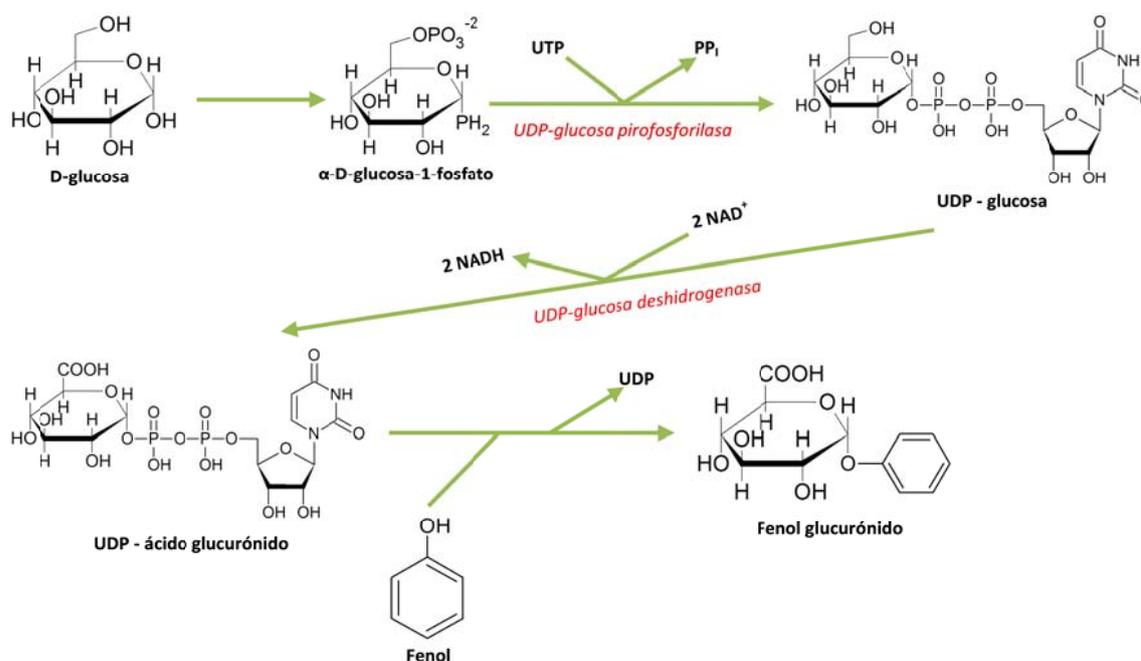


Figura 15:Glucuronizacion del fenol

La enzima está ubicada en el retículo endoplásmico de diversos tejidos. El hígado es cuantitativamente el tejido más importante que la contiene, pero la actividad está presente también en riñón, intestino, piel, cerebro.

Grupos funcionales que conjugan con el glucurónido son: alcoholes alifáticos, alcoholes aromáticos, ácidos carboxílicos, aminas alifáticas, aromáticas primarias y secundarias y grupos funcionales sulfhidrilos. Se forman O- N y S glucurónido.

Los conjugados son excretados por orina o bilis dependiendo del tamaño del aglicon (compuesto original o metabolito de fase I). Los conjugados glucuronizados pueden ser sustratos de la glucuronidasa presente en lisozomas de algunas células de mamíferos y en la flora intestinal. Así esta enzima puede liberar el aglicon que puede reabsorberse y entrar en el ciclo denominado circulación enterohepática. Compuestos en esta vía tienden a tener alta vida media y tener una biotransformación más intensa antes de ser eliminados.

Debido a su susceptibilidad a ser degradados fácilmente, los glucurónidos pueden servir como potencial transporte de compuestos activos del hígado hacia el órgano blanco. El ejemplo más citado es el N-glucuronido de N-hidroxilarilamina. Estos derivados han sido implicados en cáncer de vejiga producido por 2- naftil-amina, 4 aminofenilo y compuestos relacionados. El compuesto es primero hidroxilado en el hígado para luego subsecuentemente formarse el derivado N-glucuronido de la hidroxilarilamina. Este compuesto se acumula en la orina y es luego hidrolizado a pH ácido a N-hidroxylamina. Este compuesto espontáneamente se convierte en el electrofílico ión nitronio como se muestra en la siguiente reacción (Fig. 16).

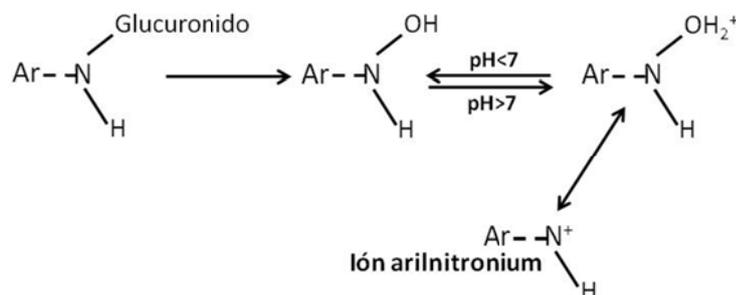


Figura 16: Activación metabólica de aminas aromáticas vía glucuronización.

Sulfotransferasa

En mamíferos la reacción de sulfatación se realiza sobre grupos hidroxílicos. La enzima se encuentra predominantemente en hígado, riñón, intestino, pulmón. Su función primaria es transferir sulfatos inorgánicos a los grupos hidroxilos presentes en fenoles y alcoholes alifáticos.

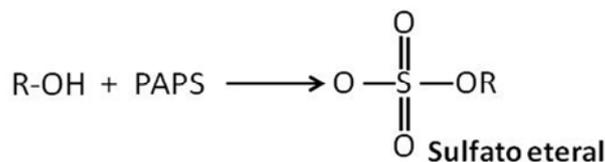


Figura 17: Transferencia de grupos sulfatos a grupos hidroxilos por sulfatación

PAPS (fosfoadenosinfosfo sulfato). Como detoxificación, la sulfatación es considerada de importante significado. Los productos de sulfatación son sulfatos orgánicos ionizados más fácilmente excretados que los compuestos originales. Numerosos compuestos de bajo peso molecular como catecolaminas, hidroxil esteroides y ácidos biliares son sulfatados (Fig. 17).

La actividad de estas enzimas varía con el sexo y la edad.

En estas reacciones el grupo SO_3^- del PAPS involucra un ataque nucleofílico del oxígeno fenólico o del nitrógeno amina sobre el átomo de S con el subsecuente desplazamiento de adenosin -3-5 difosfato (Fig. 18).

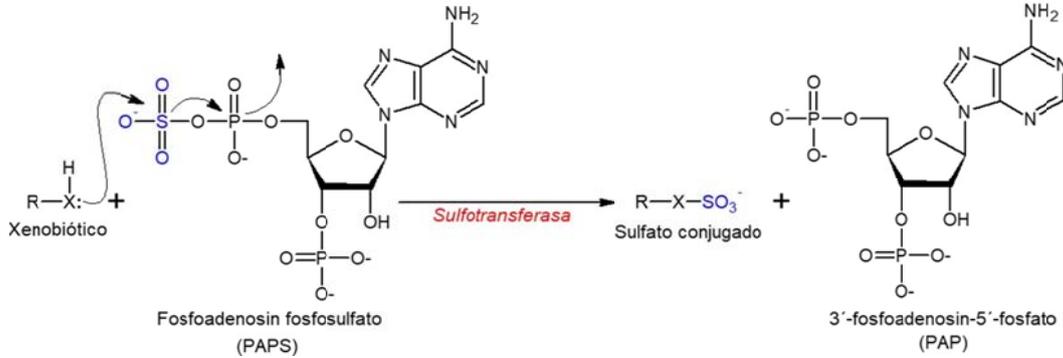


Figura 18: Síntesis de un sulfato conjugado por sulfotransferasa

La sulfonación tiene alta afinidad, pero baja capacidad para conjugar fenoles.

La principal reacción alternativa para fenoles es la glucuronización tiene baja afinidad, pero alta capacidad.

Tabla 1: Capacidad de biotransformación llevada a cabo por enzimas de fase II

Capacidad	Reacción
Alta	Glucuronización
Media	Amino ácido conjugación
Baja	Sulfato, glutatión conjugación
Variable	Acetilación

Luego de la administración de bajas dosis de fenol, el principal conjugado fenólico puede ser el éster sulfato (Fig. 19).

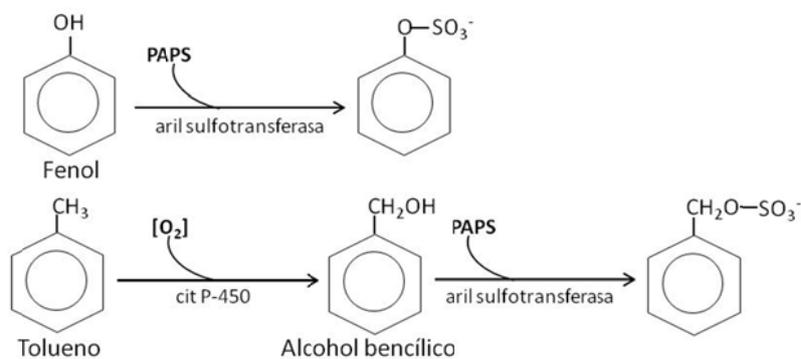


Figura 19: Catalización de la sulfatación del fenol por la enzima sulfotransferasa

Sin embargo a dosis de fenol mayores aparece un desproporcionado incremento en la cantidad de glucuronizado conjugado. La posible explicación del hecho es, una posible inhibición por sustrato de la transferasa observado in vitro con preparaciones purificadas de acilsulfotransferasa. Debido a que la glucuronización es la vía principal de conjugación en la mayoría de las especies animales, la sulfonación es una vía de menor importancia para facilitar la excreción de alcoholes hidrofóbicos y fenoles. Sin embargo, la ruta preferencial puede ser influenciada por la dosis.

Existen ejemplos en que la sulfatación resulta en una intoxicación.

Ciertos compuestos sulfatos conjugados son químicamente inestables y se degradan a potentes especies electrofílicas. Ejemplo: N-O sulfato éster de N hidroxí- 2- acetilaminofluoreno(Fig. 20).

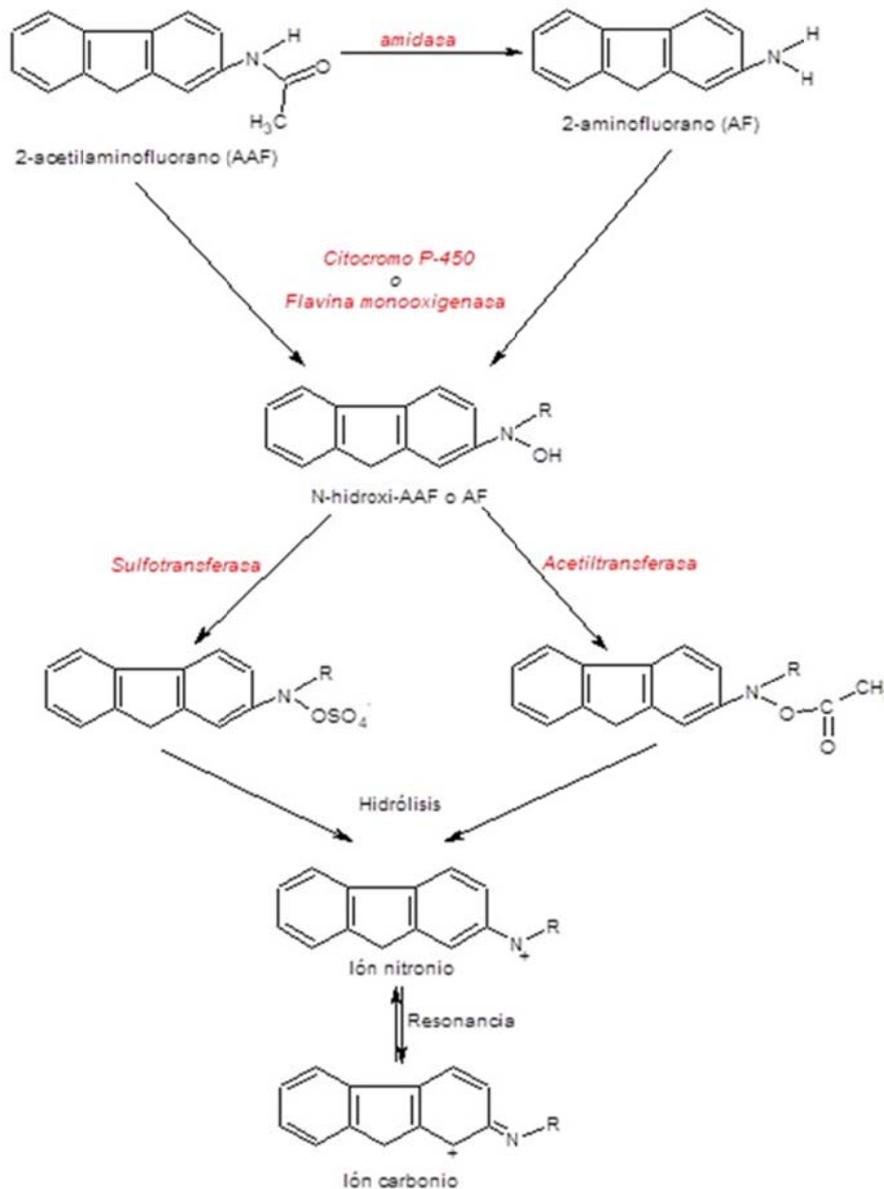


Figura 20: Activación metabólica del 2 acetilaminofluoreno a metabolitos reactivos capaces de unirse covalentemente a macromoléculas.

El sulfato conjugado es excretado por orina. Algunos de estos conjugados pueden ser degradados enzimáticamente por las arilsulfatasas presentes en la microflora, pero alguna actividad está asociada al retículo endoplásmico y lisosomas.

Conjugación Glutathion S- transferasas

Glutathion S transferasa (GST) es una familia de enzimas que catalizan el paso inicial en la formación de N-acetil cisteína (ácido mercaptúrico). GST está ubicada en el citoplasma y en el retículo endoplasmático. Su concentración en el citosol es 4 a 40 veces mayor que en el retículo endoplasmático. Se halló actividad enzimática de GST en testículo, hígado, riñón y glándulas adrenales. La enzima presenta gran número de isoformas que presentan sobre solapamiento en la selectividad del sustrato.

El cofactor para la reacción es el glutathion (GSH), compuesto por glicina, ácido glutámico y cisteína (Fig. 21).

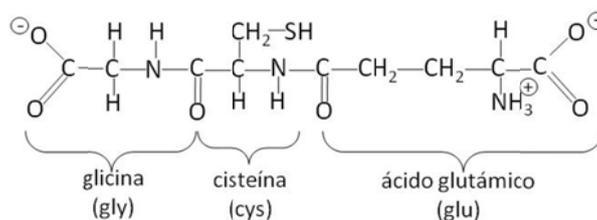


Figura 21: Estructura del glutathion reducido

La enzima cataliza la reacción del grupo nucleofílico sulfhidrido del GSH con compuestos conteniendo grupos de carbono electrofílicos (Fig. 22).

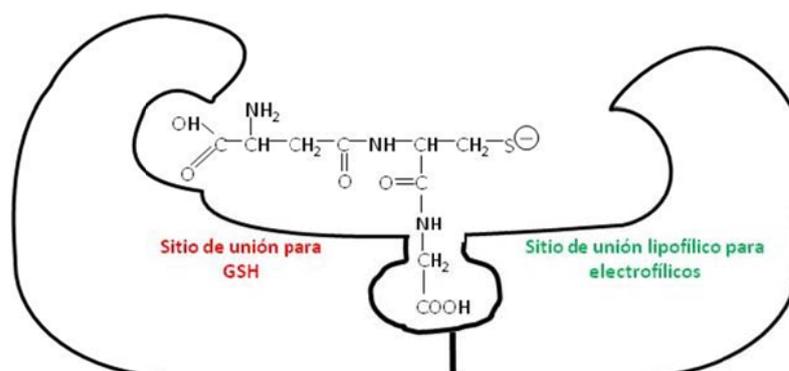
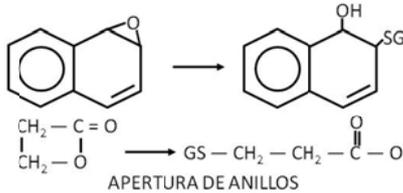
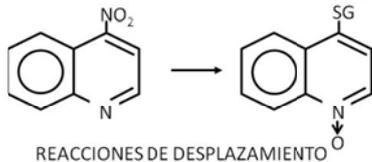
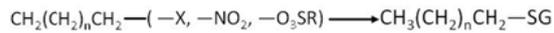


Figura 22: Ilustración del sitio activo de la enzima glutathion transferasa

El glutathion es sintetizado en el citosol en la mayoría de las células vía ciclo gamma glutamil. Los xenobióticos que actúan como sustratos para Glutathion S transferasa se han descrito en cuatro categorías:

- Reacción con: a) carbonos electrofílicos, b) nitrógeno, c) azufre y d) oxígeno (Fig. 23).

REACCIONES CON CARBONO ELECTROFÍLICO



REACCIONES CON NITRÓGENO ELECTROFÍLICO



REACCIONES CON SULFURO ELECTROFÍLICO



REACCIONES CON OXÍGENO ELECTROFÍLICO



Figura 23: Ejemplos de reacciones catalizadas por la glutatión S-transferasa

Los compuestos sustratos de GST deben tener las siguientes características:

- Debe ser hidrofóbico en algún grado
- Contener algún carbono electrofílico
- Debe reaccionar no enzimáticamente con el GSH a una velocidad medible

Los conjugados GST son luego clivados a derivados cisteína por enzimas localizadas en el riñón. Estos derivados son luego acetilados para dar N-acetil cisteína conjugados (mercaptúrico) que son fácilmente excretados por orina.

Existe considerable evidencia indicando que la glutatión S-transferasa actúa para detoxificar intermediarios reactivos producidos por el sistema P-450. Por ejemplo: bromobenceno, cloroformo, y acetaminofeno son biotransformados por P-450 a productos altamente reactivos. Estos compuestos pueden interactuar con macromoléculas o unirse con GSH y prevenir la unión covalente de intermediarios reactivos vitales para la célula. Intermediarios reactivos pueden disminuir las reservas celulares del GSH. Mientras el GSH es el cofactor para glutatión peroxidasa, esta disminución puede promover la peroxidación de lípidos. La conjugación con glutatión, no siempre produce metabolitos inocuos y fácilmente excretables. En algunos casos, el tiempo de residencia del conjugado con glutatión en el cuerpo es prolongado. Esto puede resultar en la formación de metabolitos que son más tóxicos que los compuestos originales.

Metilación

Es reacción común para el metabolismo de compuestos endógenos, pero no es cuantitativamente importante en biotransformación de xenobióticos.

La metilación difiere de otros tipos de conjugación en que, se enmascaran grupos funcionales. Esto puede reducir la solubilidad en agua de los químicos y pueden participar en otras reacciones de conjugación. Los grupos funcionales involucrados en la metilación son aminas

aromáticas y alifáticas N-heterociclos, mono y polihidrofenoles, compuestos conteniendo sulfhidrico, metabolitos aromáticos y alifáticos.

En reacción de metilación, el grupo metilo es transferido al xenobiotico con un enlace de alta energía. SAM (S-Adenosin metionina). El grupo metilo se une al ion sulfonio en SAM y presenta características de ión carbonio, es transferido por un ataque nucleofílico del oxígeno del alcohol, el nitrógeno amino o el grupo sulfotiol al grupo metilo, dando S adenosihomocisteína y el sustrato metilado como producto.

La O- metilación es de primera importancia y es catalizada por la COMT (catecol orto metil transferasa). Esta enzima soluble está en hígado y riñón, cataliza la reacción solo con catecol y fenoles monohidrometilado.

Varias transferasas específicas han sido descritas, las transferasas específicas (histamina e indol) y las transferasas no específicas (N metil transferasa). La transferasas no específicas N metil transferasa es capaz de reaccionar con una variedad de aminas exógenas y endógenas primarias, secundarias y terciarias como serotonina, benzilamina, anfetamina y piridina.

La S- Metil transferasas cataliza la reacción en la cual el SH₂ es metilado a metanotiol que es luego metilado a dimetil sulfuro. Una gran fuente de sustratos para S-metil transferasas parecen ser ahora el tioeter de glutatión conjugados, el glutatión es hidrolizado a cisteína y conjugados en el riñón previo acetilarse y excretarse.

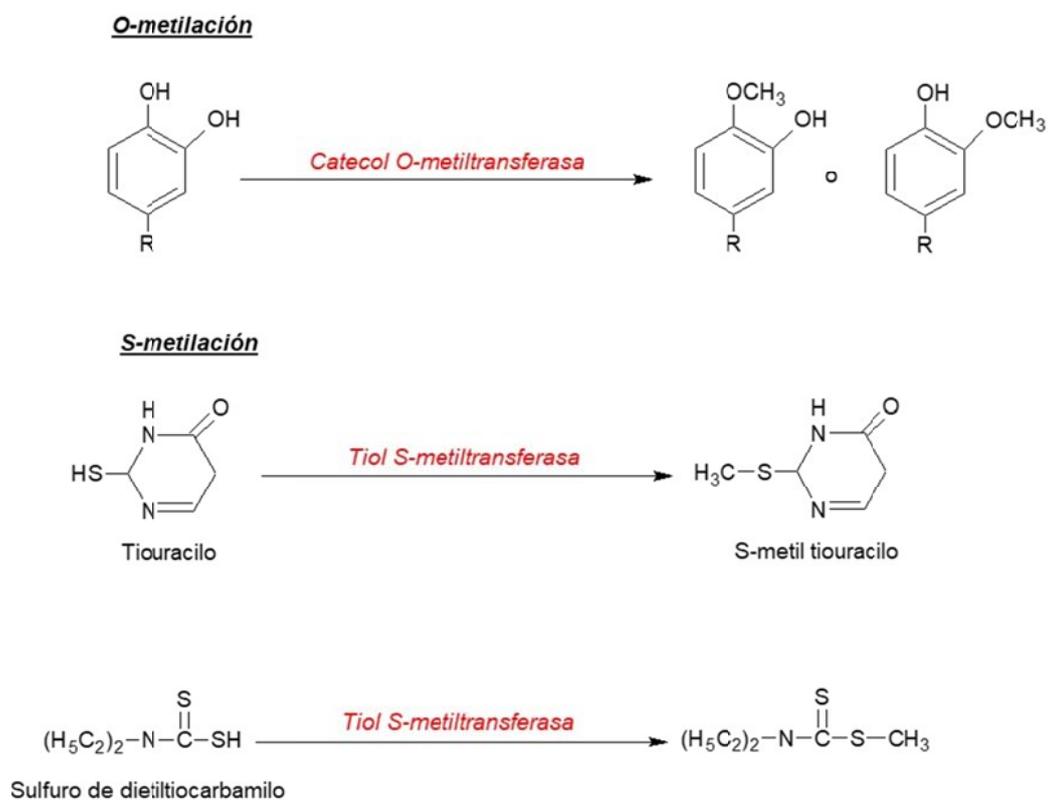


Fig. 24: Reacciones de Metilacion

N- acetil transferasas

Es la principal ruta de biotransformación de las arilaminas. Los substratos de la enzima N-acetil transferasas incluyen: aminas aromáticas primarias, hidrazinas, hidrazidas, sulfonamidas y ciertas aminas alifáticas aromáticas.

Las enzimas que catalizan la acetilación de las aminas son designadas como acetil CoA: amina N-acetil transferasas. El cofactor en acetilCo A N-acetil transferasa es una enzima citosólica de numerosas especies. Se conocen muchas formas de las transferasas. El perro y otras especies relacionadas son deficientes N-acetil transferasas y son incapaces de acetilar un amplio número de substratos.

El polimorfismo de la acetilación ha sido informado en humanos, ratones, conejos, y algunos monos. El polimorfismo es de origen genético. Es la aparición simultánea en la población de genomas que muestran las distintas variantes alélicas de un mismo gen.

Estos individuos han sido clasificados como *acetiladores rápidos* (heterocigota y homocigota dominante) y *acetiladores lentos* (homocigota recesivos) basados en su capacidad para acetilar isoniazida (antituberculoso), hidrazina (antihipertensivo), procainimida (antiarrítmico), fenelzina (inhibidor de la Monoamino Oxidasa) y fenacetina (analgésico).

Se han identificado varias mutaciones que suponen un fallo en la expresión de la enzima. Existen grandes variaciones raciales en la distribución de los fenotipos. El alelo responsable de la acetilación lenta es máxima en oriente medio, llegando a 90% en algunas poblaciones árabes y mínima en esquimales y japoneses (5-10%). Además de los dos fenotipos descritos se ha demostrado la existencia de un fenotipo con velocidad de acetilación intermedio.

La Fig. 25 presenta ejemplos de O acetilación de N-hidroxi-2AF (acetaminoflreno) y además substratos de N acetiltransferasa NAT1 y NAT2.

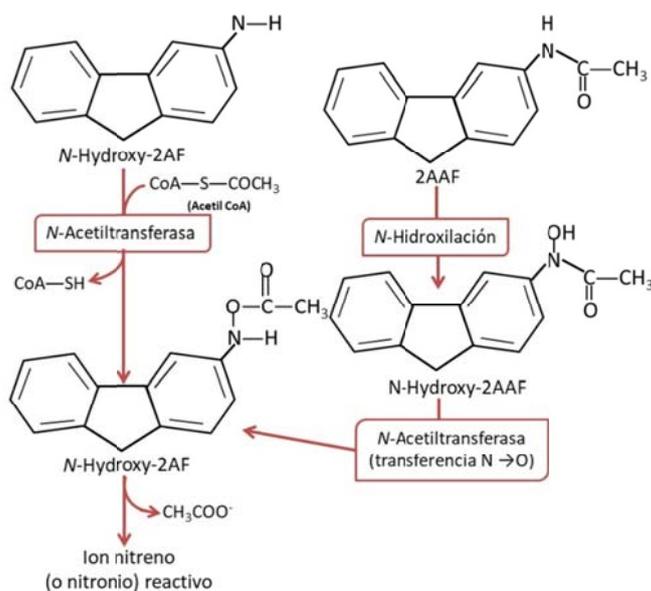


Figura 25: Reacción de la enzima N-acetiltransferasa en la O-acetilación del N-hidroxi-2aminofluoreno

La acetilación de las arilaminas ocurre en dos pasos secuenciales. Inicialmente el grupo acetilo de la Acetil CoA es transferido N-acetiltransferasa a la forma acetil- N-acetil transferasa como un intermediario. El segundo paso es acetilación del grupo amino de la arilamina sustrato con regeneración de la enzima. La interacción entre el grupo amino y grupo acetilo resulta en la formación de una unión amida. La amida es relativamente estable a deacetilasas, amidasas. Así, la producción de N-acetil conjugado dependerá de la velocidad relativa de acetilación y deacetilación.

La acetilación es otro ejemplo de reacciones de conjugación que enmascara grupos funcionales. Algunos N- acetil derivados son menos solubles en agua que los compuestos originales. N-acetil derivados de ciertas sulfonamidas has sido informadas que precipitan en el túbulo del riñón pudiendo resultar en daño al riñón.

Rodanasa

Reacción de detoxificación del CNH esta catalizada por una enzima mitocondrial del hígado. El tiosulfato actúa como donador de azufre así el producto de reacción tiocianato es menos tóxico que CNH:



Conjugación con aminoácidos

Una importante reacción de xenobióticos con grupos carboxílicos es la conjugación con varios aminoácidos. Esta reacción resulta en la formación una amida (péptido) entre el ácido carboxílico del ácido y el grupo amino del aminoácido.

Substratos incluyen: ácidos orgánicos, arilacético, ácido aril sustituido acrílico.

La reacción más común involucra glicina, conjugación con glutamina (más predominante en humanos y ciertos monos) y conjugación con ornitina (reptiles y pájaros). La Taurina sirve como acil aceptor para la conjugación con ácidos biliares.

La reacción se realiza en dos pasos. El primer paso involucra la activación del ácido a tioéster derivado de coenzima A. La energía de esta reacción esta como ATP. La enzima que cataliza esta reacción ATP dependientes la CoA ligasa. La coenzima A tioéster es transferida al grupo amino del amino acido aceptor. La ligasa de N acyltransferasa es una enzima soluble, pero es también activa con la matrix de hígado y mitocondrias. La conjugación con aminoácido es un sistema con alta afinidad y media a baja capacidad. Cuando la dosis se incrementa el sistema comienza a saturarse y predomina otra forma de eliminar (glucuronización). Los amino ácidos conjugados son eliminados primariamente por orina. La adición de aminoácidos a los endógenos puede facilitar la eliminación de xenobióticos porque incrementa su capacidad para interactuar con el sistema aniónico de transporte orgánico en el túbulo del riñón

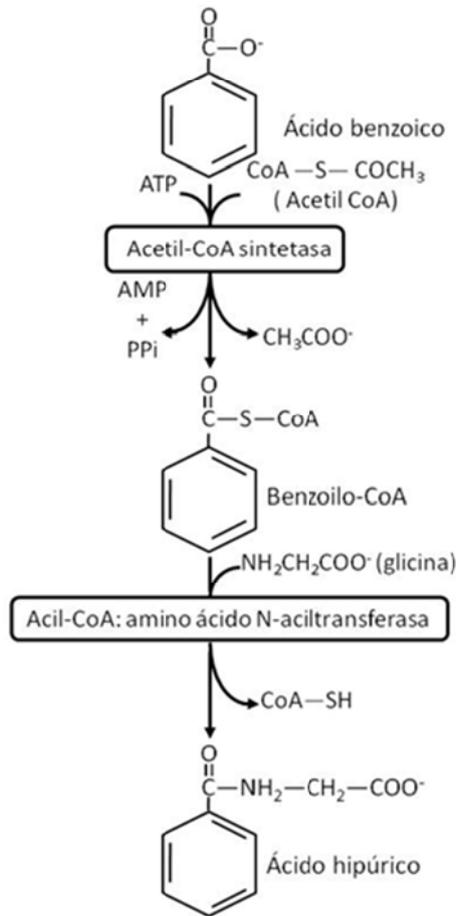


Figura 26: Conjugación de ácido carboxílico con aminoácidos

Biotransformación extrahepática

Los principales tejidos extra hepáticos donde ocurre la biotransformación, se encuentran involucrados en la absorción y excreción de químicos. Estos tejidos son: pulmón, riñón, piel y mucosa gastrointestinal. La velocidad de biotransformación puede no ser tan rápida como en el hígado y la capacidad total es generalmente baja. El hígado es una mezcla de células homogéneas con igual capacidad de biotransformación. En los tejidos extra hepáticos, las enzimas de la biotransformación son generalmente concentradas en una o dos células, que corresponden a un pequeño porcentaje del total de células en un órgano.

Tabla 2. Principales células de órganos involucradas en la biotransformación

Órgano	Células
Hígado	Hepatocito (células parenquima)
Riñón	Células del túbulo proximal (segmento S3)
Pulmón	Células Claras, tipo II, células nasales
Intestino	Mucosa
Piel	Células epiteliales
Testículos	Células Sertori, túbulos seminíferos

Biotransformación por microflora intestinal

Las células microbianas presentan un potencial de biotransformación semejante al hígado. Más de 400 bacterias del intestino difieren como resultado de las dietas y daños que influyen en la modificación de los xenobióticos. Las biotransformaciones en el intestino generalmente producen metabolitos menos solubles en agua y debido al estado anaeróbico del intestino se producen reacciones de reducción. Además, la presencia de enzimas de conjugación (beta glucuronidasa y arilsulfatasa), las modificaciones producidas por el hígado hacen que se excreten en la bilis. Tal desconjugación promueve la recirculación enterohepática.

Factores que afectan la velocidad de biotransformación de Xenobioticos

Factores intrínsecos relacionados al químico. Un factor que controla la biotransformación de compuestos extraños al organismo es la concentración del compuesto en el centro activo de la enzima involucrada en la biotransformación. La concentración en el sitio activo depende de propiedades fisicoquímicas de los compuestos tanto como de la dosis. Entre los factores que afectan la concentración intracelular de xenobióticos se encuentra la lipofiliidad del xenobiótico que controla la absorción, la dosis, la unión a proteínas, así como la ruta de administración.

Un importante factor que controla la solubilidad en agua de compuestos extraños son los grupos ionizables en la molécula. Los compuestos que contienen amina, carboxilos, fosfatos, sulfatos, hidroxil fenólicos y otros compuestos que a pH fisiológico son generalmente más solubles en agua y menos fácilmente transportados a través de la membrana que, los compuestos que no contienen esos grupos.

Si el xenobiótico se encuentra unido a proteínas, la concentración de sustancia en el sitio activo será menor. La capacidad de unión resulta de la presencia en la proteína de regiones hidrofóbicas que unirán grupos lipofílicos capaz de formar uniones puente hidrógeno y de tipo electrostático. La albúmina tiene la capacidad de unir en forma no específica a xenobióticos. La unión resulta en una disminución en la biotransformación y produce un efecto definido en el clearance del xenobiótico por las enzimas de biotransformación.

Dosis o concentración de exposición

Ciertas enzimas tienen alta afinidad, pero baja capacidad para biotransformar compuestos xenobióticos. Estos caminos metabólicos rápidamente se saturan al incrementar la dosis. Así, el porcentaje de dosis para biotransformar por este camino puede decrecer.

Sin embargo, una baja capacidad y alta afinidad puede biotransformar un gran porcentaje de la dosis administrada. El acetaminofeno es un excelente ejemplo: a bajas dosis (15 mg/Kg) más del 90% de la dosis se excreta como sulfato. Altas dosis (300 mg/Kg) el 43% se excreta como sulfato, pero también se excreta como glucurónido o mercaptúrico en orina. Existen una gran variedad de factores que dependen del huésped, entre ellos mencionaremos:

Tabla 3. Variables del huésped que afectan la biotransformación de xenobióticos

Variables del huésped que afectan la biotransformación de xenobióticos	
Inhibidores	Embarazo
Inductores	Estrés
Especie	Hipofisectomía
Cepa	Adrenalectomía
Edad	Tiroidectomía
Sexo	Diabetes
Dieta	Hepatitis
Ayuno	Castración
Hora del día	Ictericia obstructiva, Cirrosis
Época del año	Hepatomas

Cualquier factor que modifique el contenido del P-450, la actividad de la P-450 reductasa o los niveles de NADPH, tendría efecto sobre la biotransformación de xenobióticos y por ello sobre la duración y la intensidad de sus acciones biológicas. Como consecuencia de la relativa baja especificidad, gran cantidad de compuestos pueden competir por los sitios activos y así alterar sus respectivas biotransformaciones.

Las diferencias individuales pueden ser muy grandes y fácilmente observables en el hombre. Ellas han sido verificadas para el metabolismo de anticoagulantes como la warfarina y el dicumarol, así como para fármacos como la fenilbutazona, la antipirina o la difenilhidantoína. Estas variaciones también se deben a factores cuantitativos.

El sexo es otra variable importante. La rata macho tiene mayor capacidad para la biotransformación y ello parece deberse a una mayor afinidad a los sustratos por el CYP-450.

La edad puede tener influencia en la biotransformación. El feto humano tiene más capacidad metabólica para xenobióticos que el equivalente de los animales, siendo el P-450 un 60-70 % y su P-450 reductasa un 30 % del de los adultos. Existe también un decaimiento en los contenidos de P-450 y P-450 reductasa en la vejez.

El desbalance hormonal influye profundamente sobre la biotransformación de xenobióticos. En animales adrenalectomizados, tiroideclomizados, hipofisectomizados o con diabetes aloxánica cursan con una biotransformación de muchos sustratos enlentecida. También el sexo influye en el proceso. Las hormonas modulan, ya sea el contenido de P-450 o la actividad de la P-450 reductasa o la afinidad del P-450 por el sustrato. Además, el ritmo circadiano modula los niveles de corticosterona y ello influye en la biotransformación durante el día.

La dieta influye en la biotransformar xenobióticos; dietas pobres en proteínas y altas en hidratos de carbono y grasa disminuyen el proceso mientras que dietas ricas en proteínas la aumentan. Enfermedades hepáticas influyen en la biotransformación. En la ictericia obstructiva y en los cánceres hepáticos, también hay disminución de esta actividad.

Distintas especies pueden presentar diferencias en la biotransformación tanto cualitativas como cuantitativas. Las cualitativas son principalmente en las reacciones de fase II mientras que en los procesos de fase I existen diferencias cuantitativas en particular en el contenido de P-450 y de P-450 reductasa. Existen también variaciones entre las cepas de una misma especie. Estas diferencias pueden ser de dos a tres veces en ratas o ratones, mientras que puede presentarse diferencias de veinte veces en cepas de conejo.

Inducción de las enzimas de biotransformación

El sistema P-450 resulta ser fácilmente inducido. La inducción es una respuesta adaptativa que protege a las células de los xenobióticos tóxicos al aumentar la actividad de detoxificación. Entre los inductores encontramos fármacos (hipnóticos, sedantes, gases anestésicos, estimulantes del SNC, anticonvulsivantes, tranquilizantes, antipsicóticos, hipoglicémicos, alcaloides, hormonas, esteroides, etc.), contaminantes ambientales (plaguicidas, herbicidas, hidrocarburos policíclicos provenientes de procesos de combustión, aditivos alimentarios, etc.).

Los inductores aumentan el contenido de P-450 hepático y algunos también la actividad de la P-450 reductasa. Los citocromos CYP1A1, CYP2C9, CYP2E1 y CYP3A4 humanos son inducibles. Aunque en algunos casos la inducción es producida por el aumento en la transcripción del gen correspondiente. También se han descritos mecanismos no transcripcionales. La troleandomicina, por ejemplo, no incrementa la síntesis de CYP3A4 sino que reduce su tasa de degradación. La inducción de CYP2E1 por etanol, acetona e isoniazida también es mediada por mecanismos no transcripcionales. La inducción de enzimas metabolizantes puede producir una reducción de la toxicidad al facilitar la eliminación del xenobiótico o puede llevar a un aumento de la misma al incrementar la formación de metabolitos reactivos.

El proceso de inducción involucra tanto un aumento de la síntesis como una disminución de la degradación proteica. La proporción en que cada uno de estos factores participa en la inducción varía con cada compuesto. Estos procesos suelen ir acompañados de efectos en el turnover del RNA y de los fosfolípidos y a su vez por proliferación del retículo endoplásmico liso de las células epiteliales hepáticas.

La inducción enzimática requiere de síntesis de novo. Cientos de químicos han mostrado que inducen actividad monooxigenasa y se llaman agentes microsomal inductores. La magnitud, duración del incremento en la actividad monoaminooxidasa es conocida que varía con el agente inductor y la dosis y el substrato usado para evaluar la actividad de la enzima, la especie, la cepa, el sexo del animal, la duración de la exposición y el tejido en el cual la actividad enzimática es medida. Cuando la inducción ocurre en el hígado, el próximo efecto es un aumento en la excreción del químico del cuerpo.

La mayoría de los estudios incluyen al fenobarbital e hidrocarburos aromáticos policíclicos como inductores. Ellos inducen ciertas actividades de la monoaminooxidasa y producen diferentes efectos morfológicos y bioquímicos en el hígado.

También pueden ser inducidos otras enzimas microsomales. Las enzimas microsomales UDP glucuronil transferasa y la epóxido hidrolasa son inducidas por fenobarbital, 3 metilcolantreno y compuestos relacionados. Stilbeno oxido, acetilaminofluoreno y ciertos bifenilos policlorados son buenos inductores de epóxido hidrolasa. Antioxidantes como BHT butilhidroxi tolueno y BHA son potentes inductores de epóxido hidrolasa en ratones, pero no en ratas.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son efectivos en inducir enzimas extrahepáticas principalmente en pulmón, riñón, tracto intestinal y piel.

Entre las enzimas inducibles citosólicas la Glutathion S-transferasa es inducible por metilcolantreno, fenobarbital y oxido de stilbeno. La inducción puede ser entre 2 a 3 veces.

BHA es el más efectivo inductor de transferasa citoplasmática en ratones y menos efectivo en ratas.

Inhibición de la biotransformación de enzimas

Existen inhibidores con alta afinidad por P-450, el mejor conocido es el difenilpropilacetato de dietilaminoetanol (SKF 525) que ha demostrado un 100% de inhibición de varias isoformas del CYP-450. También existen compuestos como el CCl₄, la alil-isopropilacetamida y otros que in vivo destruyen al P-450. Un efecto similar, puede ser logrado con inhibidores de la síntesis del hemo como el 3-amino-1,2,4-triazol o el cloruro de cobalto. Es posible disminuir el proceso global de la hidroxilación de la P-450 reductasa con sustancias como la cistamina.

La inhibición del metabolismo ocurre cuando decrece la capacidad de una enzima o sistema enzimático de metabolizar compuestos exógenos. Esto incluye todos los posibles mecanismos inhibitorios tales como competición por sitios activos o cofactores de las enzimas, inhibición del transporte de componentes en sistemas multienzimático, disminución de la biosíntesis o incremento en la ruptura de enzimas o cofactores tanto como en cambios alostéricos en la conformación enzimática aun pérdida de la función tejido (necrosis hepática).

Agentes que afecten la síntesis de proteínas inhiben la biotransformación de enzimas tanto como las enzimas necesarias para la producción de cofactores.

Administración aguda de cloruro de cobalto, disminuye síntesis de CYP-450 por inhibición de síntesis de hemo tanto como su efecto inducible sobre hemo oxigenasa enzima que convierte hemoproteína en biliverdina. .

Existen muchas sustancias químicas que afectan los niveles de cofactores necesarios o especies conjugadas. Ej.: L metionina S.sulfoxine y butioninasulfoximina inhibe síntesis glutatión. Dietil maleato, glicidol, reduce los niveles de almacenamiento de GSH en tejidos.

La galactosamina inhibe la síntesis de UDP-glucuronido y disminuye los niveles hepáticos de uridina, mientras que el borneol y la salicilamina conjuga con ácido glucuronido. El efecto de estos químicos puede ser la reducción en la capacidad formar glucurónido o glutathion conjugados.

La inhibición enzimática, causada por macrólidos, antifúngicos azoles, bloqueadores de los canales de calcio, fármacos antivirales y el jugo de pomelo, produce una menor actividad de

CYP3A4, provocando un aumento en los niveles plasmáticos y toxicidad de los medicamentos metabolizados por este, como por ejemplo, la ciclosporina A.

El CO y el etilsocianide actúan como ligando del hemo reducido y compiten con el ligando endógeno oxígeno. CO es un potente inhibidor de reacciones oxidativas. El CO inhibe CYP-450 mediante reacción reductiva.

La inhibición competitiva de dos xenobioticos por la unión por unión al sitio del CYP50 es bastante frecuente. Esta competición resulta en una mutua inhibición del metabolismo. El grado de inhibición depende de la relativa afinidad de xenobioticos por el sitio de unión con drogas que contienen nitrógeno, tales como imidazoles, piridinas y quinolonas, los cuales no sólo pueden unirse al grupo hemo de los CYP, sino a las regiones lipofílicas de la proteína. La quinidina y la quinina son inhibidores reversibles de la hidroxilación de la debrisoquina catalizada por la subfamilia CYP2D. Varios agentes antimaláricos son inhibidores reversibles del CYP, pero no actúan a través de su anillo de quinolona sino por sus grupos amino sustituyentes. Muchas drogas, incluyendo alquilaminas, antibióticos macrólidos e hidrazinas, son metabolizados por enzimas CYP para dar metabolitos que forman complejos estables con el grupo hemo de los CYP, inactivándolos.

Diferentes formas P-450 presentan diferentes sensibilidades a la acción inhibitoria de químicos. Algunos químicos actúan como inhibidores suicidas del P-450. Luego que el xenobiotico activa al CYP-450, el metabolito reactivo se une covalentemente al N pirrol del grupo hemo y produce la destrucción del hemo y pérdida de la actividad CYP-450. Varios halógenos alcanos (CCl₄), alquenos (cloruro de vinilo), el secobarbital inhiben reacciones catalizadas por CYP-450.

In vivo la evaluación resulta más complicada. Muchos químicos producen múltiples efectos, tales como inhibición de reacciones de fase I y II. La inhibición puede ser más pronunciada en algunas isoenzimas P-450 y variar en animales tratados con inductores respecto a los controles.

Bibliografía

- Lehman L. D. and MacKeeman Chapter 5, Absorption, distribution and excretion of toxicants. en: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th edition by Curtis D. Klaassen (Editor) By McGraw-Hill Professional. 2001
- Parkinson A. and Ogilvie B. W. Chapter 6, Biotransformation of xenobiotic en: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th edition (2001): by Curtis D. Klaassen (Editor) By McGraw-Hill Professional.2001.