

## CAPÍTULO 3

### Toxicidad no-órgano específico

*Autores: Leda Giannuzzi, Daniela Sedan y Cristian Oliver*

*Aportes de: Florencia Ortega y Ezequiel Ventosi*

En este capítulo se estudiará los diferentes mecanismos de toxicidad. Toxicidad y daño celular y tisular. Apoptosis, y necrosis. Metabolitos reactivos. Interacciones con macromoléculas. Estrés oxidativo. Formación de radicales libres y Toxicología del desarrollo.

#### **Mecanismos de toxicidad**

La Toxicología ha dejado de ser descriptiva para convertirse en mecanicista; trata de encontrar los mecanismos bioquímicos que expliquen la reacción entre un xenobiótico y las biomoléculas y el posterior proceso fisiopatológico. Luego de realizar los ensayos en animales es necesario interpretarlos. Existen gran cantidad de vías que pueden conducir al efecto tóxico. La interacción entre el toxico y el lugar de acción produce como resultado una disfunción que se manifiesta en el efecto tóxico. A veces el toxico no interactúa con el blanco específico sino que influye de manera desfavorable en el medio biológico produciendo la disfunción molecular, celular u orgánica celular que produce los efectos tóxicos. El proceso de toxicidad más complejo consta de varios pasos. En el primero paso, el toxico se distribuye hasta el lugar de acción (primer paso) donde interactúa con la molécula blanco endógena (paso 2) la cual altera ya sea la estructura o la función o ambas (paso 3). Esta alteración dispara los mecanismos moleculares, celulares y tisulares de reparación (cuarto paso). Cuando las alteraciones generadas por el toxico superan los mecanismos de reparación o cuando la reparación es incorrecta (Figura 1).

#### **Primer paso: el toxico final**

La interacción entre el tóxico y la molécula diana provoca alteraciones estructurales o funcionales que dan origen a la respuesta tóxica. La absorción, distribución hasta el lugar de acción, la reabsorción y la activación metabólica favorece la acumulación del xenobiótico en el lugar de acción. A estos procesos se contraponen la distribución hacia otros lugares diferentes del sitio de acción, la excreción y la inactivación los cuales dificultan la acumulación en la molé-

cula diana. El toxico final es el resultado de todos estos procesos. Si la inactivación no ocurre eficientemente y si el tóxico fue biotransformado en el tóxico final, ocurrirá la interacción entre el tóxico final y la molécula diana.



Figura 1: Posibles etapas del proceso de toxicidad luego de la exposición a un xenobiótico

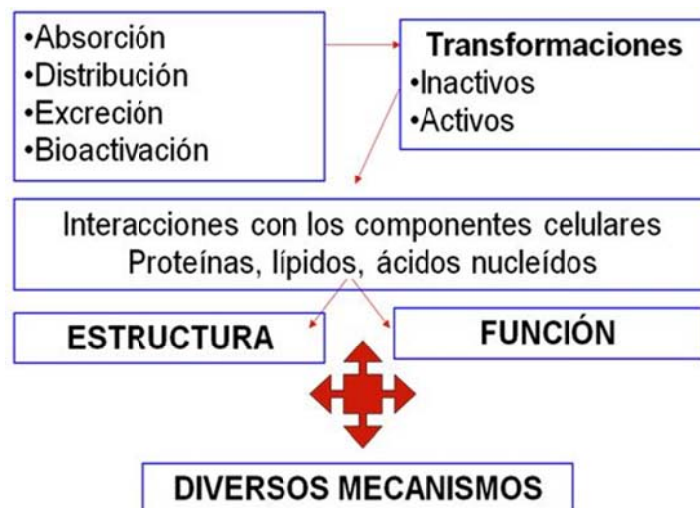


Figura 2: Proceso de administración de un xenobiótico en el primer paso del desarrollo de toxicidad

## Segundo paso: interacción entre el toxico final y la molécula diana

Producto de la interacción, se generan una serie de procesos bioquímicos secundarios que dan lugar a un daño o disfunción que se evidencia en la célula, las organelas, los tejidos, órganos o en el organismo entero. Las moléculas blanco más importantes toxicológica son los ácidos nucleídos (ADN, ARN), las proteínas y las membranas.

La interacción entre el toxico y la molécula blanco puede ocurrir mediante diferentes tipos de unión. Estos pueden ser enlaces covalentes, no covalente, reacciones de sustracción de hidrógeno, transferencia de electrones y reacciones enzimáticas.

Las uniones covalentes son irreversibles y altera la molécula endógena de manera permanente. Las sustancias electrofílicas suelen formar enlace covalente con las moléculas endógenas mediante la formación de un aducto covalente. Se produce un ataque electrofílico por parte del xenobiótico sobre los centros nucleofílicos de las macromoléculas como las proteínas, ácidos nucleídos. Los radicales libres neutros como el hidroxilo, el dióxido de nitrógeno y el tricloroetileno también reaccionan con unión covalente con estas moléculas.

Las uniones no covalentes son reacciones de puente hidrogeno o iónicas así como o interacciones apolares que ocurren sobre los receptores de membrana, o intramoleculares. También en los canales iónicos y algunas enzimas. Estas uniones son reversibles con baja energía de enlace.

Las reacciones de sustracción de hidrogeno ocurre entre los radicales neutros que sustraen fácilmente átomos de hidrogeno de compuestos endógenos y los convierten en radicales. Los radicales también extraen átomos de hidrogeno de grupos etilo de residuos de aminoácidos y de las proteínas convirtiéndolos en carboxilos que pueden formar puentes con ADN y otras proteínas.

Transferencia de electrones: los xenobióticos pueden intercambiar electrones en los procesos de oxidación o reducción que pueden conducir a sustancias toxicas. La oxidación de la hemoglobina a metahemoblobina por el nitrito es un ejemplo de esto.


Reacciones enzimáticas: pocas toxinas actúan enzimáticamente sobre proteínas. La toxina diftérica bloquea el factor de elongación en la síntesis proteica, la toxina del cólera activa la proteína G.

Los efectos de tóxicos sobre las moléculas dianas pueden ser diversos nombraremos los más relevantes.

Disfunción de la molécula blanco. Esto ocurre cuando el xenobiótico activa algunas proteínas imitando al ligando endógeno. También pueden actuar inhibiendo a la molécula diana por bloqueo del receptor, del neurotransmisor, de canales iónicos o enzimas. Algunas sustancias tóxicas activan la molécula objetivo, imitando ligandos endógenos. Por ejemplo, la morfina activa los receptores opioides, el clofibrato es un agonista en el receptor activado por el proliferador de peroxisoma y los ésteres de forbol y el plomo estimulan la proteína quinasa C. Más comúnmente, los productos químicos inhiben la función del objetivo molecular. Varios xenobióticos, como atropina, curare bloquean el receptor de neurotransmisores. La estricnina se une a sitios de unión al ligando o interfi-

riendo con la función de los canales iónicos. La tetrodotoxina y la saxitoxina, inhiben la apertura de los canales de sodio activados por voltaje en la membrana neuronal, mientras que el DDT y los insecticidas piretroides inhiben su cierre.

**Tabla 1: Ejemplos de sustancias electrofílicas y nucleofílicas**

Electrófilos	Débiles	Nucleófilos
Carbono en dobles enlaces (quinonas, cetonas $\alpha$ , $\beta$ -insaturadas)		Azufre en tioles (por ejemplo, residuos de cisteinil en proteínas y glutatión)
Carbono en epóxidos, lactonas de anillo tenso, haluros de arilo		Azufre en metionina
Iones de aril carbonium		Nitrógeno en grupos amino primarios y secundarios de proteínas
Iones carbonio de bencilicos		iones nitronio Nitrógeno en grupos amino en bases de purina en ácidos nucleídos
Iones de alquil carbonio		Oxígeno de purinas y pirimidinas en ácidos nucleídos. Oxígeno fosfato duro en ácidos nucleídos
	<b>Fuertes</b>	

Algunos tóxicos bloquean los transportadores de iones, otros inhiben el transporte de electrones en las mitocondrias y otros inhiben enzimas. Otros xenobióticos se unen a la tubulina (por ejemplo, vinblastina, colchicina, paclitaxel, el arsénico trivalente) o actina (p. ej., citocalasina B, faloidina) y afectan al ensamblaje (polimerización) y/o desmontaje (despolimerización) de estas proteínas del citoesqueleto. Por ello, la función de la proteína se deteriora cuando la conformación o estructura se altera por la interacción con el tóxico.

Los xenobióticos pueden modificar fracciones críticas (especialmente grupos tiol, que son esenciales para la actividad catalítica o el ensamblaje a macromoléculas complejas) de algunas proteínas que son esenciales para la actividad biológica y dar lugar a una transducción aberrante de la señal y deterioro de la homeostasis energética y metabólica de la célula.

También pueden dañar el DNA produciendo una replicación errada. Los xenobióticos pueden alterar la estructura primaria de las moléculas endógenas mediante la formación de puentes y fragmentación. Los puentes producen modificaciones que pueden afectar la estructura y el funcionamiento de las moléculas que unen. Las moléculas blanco son susceptibles al ataque de xenobióticos como los radicales peroxi-clorometilo y el radical oxidrilo que desencadena la peroxidación de lípidos mediante la sustracción de electrones de los

dobles enlace de los ácidos grasos destruyendo los lípidos de membranas celulares generando además radicales libres y compuestos electrofilicos que atacan al DNA.

Otra acción que puede ocurrir es la interacción entre el xenobiótico y proteínas que puede provocar la formación de nuevos antígenos. El diclorobenceno, la penicilina, el níquel, se unen a las proteínas de manera espontánea y adquieren reactividad, otras lo hacen luego del proceso de autoxidación o biotransformación enzimática.

Algunos xenobióticos alteran el micro ambiente biológico y generan una respuesta toxica. Entre estos encontramos sustancias químicas que alteran la concentración de hidrogeno, solventes y detergentes que alteran la composición físico química de la fase lipidica de las membranas y destruyen los gradientes en las membranas.

### **Tercer paso, alteración de la función celular**

Las características de la disfunción celular primaria causada por tóxicos depende de la función diana afectada. Si la molécula dañada interviene en la regulación celular (señalización), podrá ser alterada la función genética, la función celular o ambas funciones. Si la molécula blanco forma parte de un proceso que involucra la conservación del medio interno de la célula la alteración de la función puede ser letal para la célula. La reacción de xenobióticos con moléculas diana que desempeñan funciones externas influirá en el funcionamiento de otras células y de los sistemas orgánicos que lo integra.

Los tóxicos pueden causar un daño en la regulación celular. Las células están reguladas por moléculas de señalización que activan receptores celulares específicos unidos a transductores de señales que las envían a las zonas reguladoras de los genes, proteínas funcionales o ambos. La activación de los receptores puede alterar la expresión de los genes y modificar algunas proteínas de la fosforilización o ambas.

Una desregulación de la expresión génica puede ocurrir en elementos que son directamente responsables de transcripción o en la vía de la transducción de señal intracelular, es decir, en la síntesis, almacenamiento o liberación de moléculas de señalización celular.

### **Desregulación de transcripción**

La transcripción de información genética desde el ADN al ARNm se controla por la interacción entre factores de transcripción (FT) y la región reguladora o promotora de genes. El xenobiótico, al unirse a secuencias de nucleótidos en esta región, activa los FT que facilitan la formación del complejo de preiniciación, promoviendo la transcripción del gen adyacente. Los xenobióticos pueden interactuar con el FT (u otros componentes del complejo de preiniciación) y con la región promotora del gen.

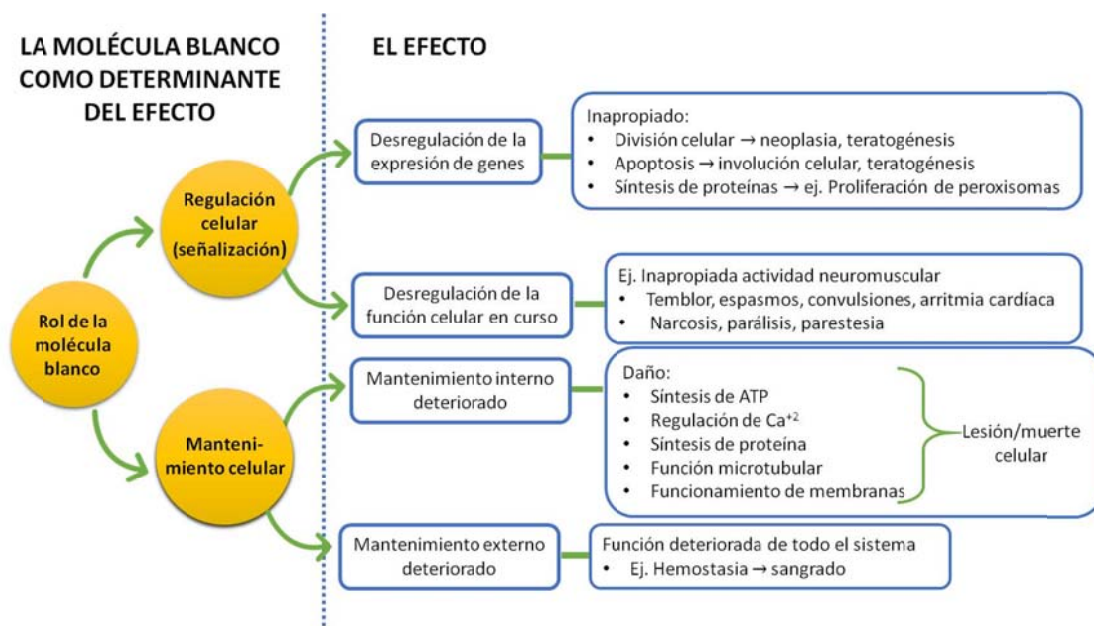


Figura 3: Tercer paso en el proceso de toxicidad

### Desregulación de la transcripción por productos químicos que actúa a través de factores de transcripción activados por ligando

Muchos xenobióticos, como las hormonas (por ejemplo esteroides, hormonas tiroideas) y vitaminas (retinoides y vitamina D), influyen en la expresión de genes al unirse a los FT y los activan. Los xenobióticos pueden también imitar a los ligandos naturales. Por ejemplo, los ésteres de ftalatos sustituyen a los ácidos grasos poliinsaturados como ligandos del receptor proliferador de peroxisomas (PPAR) y xenoestrógenos como el dietilestilbestrol, DDT, metoxicloro sustituyen al estradiol.

Muchos compuestos naturales o xenobióticos al administrarse en dosis extremas o en períodos críticos durante la ontogénica influyen en la expresión génica.

### Desregulación de la traducción de señales

Las moléculas extracelulares de señalización como los factores de crecimiento, las citocinas, las hormonas y los neurotransmisores pueden también activar los FT a través de los receptores de superficie celular y de los circuitos intracelulares de transducción de señales. Puede ocurrir que los transductores de señales se activen mediante la fosforilación catalizada por la proteína quinasa y se inactivan mediante la desfosforilación llevada a cabo por la proteína fosfatasa. Los xenobióticos pueden causar una transducción aberrante de la señal mediante una alteración de la fosforilación de las proteínas. Pueden interrumpir la interacción normal proteína- proteína formando interacciones anormales o alterando la síntesis o la degradación de las proteínas de degradación de las proteínas de señalización. Estas interacciones influyen en la progresión del ciclo celular. Puede ocurrir que los xenobióticos faciliten la fosforilación de los transductores de señales y promover la mitosis y la formación de tumores. Los ésteres del forbol y la fumoricina activan la proteína quinasa C (PKC) debido a su similitud con el diacilglicerol (DAG) que es activador fisiológico de PKC. El plomo imita a

otro activador fisiológico de la PKC, el calcio, que pone en marcha una cascada de señales de quinasas que estimulan la señalización mitógena y permite la unión de factores de transcripción al DNA. También la fosforilación aberrante de proteína puede disminuir la desfosforilación que llevan a cabo las fosfatasas. La inhibición de fosfatasas parece ser el mecanismo fundamental del efecto mitógeno de varias sustancias químicas involucradas en el stress oxidativo y la radiación UV. La protein fosfatasa A (PP2A) elimina un fosfato activador de una protein quinasa que desencadena la mitosis. Existen otras fosfatasas de unión que son inhibitoras y mantienen bajo control la transmisión de señales y pueden ser alteradas.

## **Regulación anómala de las células eléctricamente excitables**

Las neuronas, los miocitos, las células del músculo esquelético, cardíaco y liso, son células excitables y pueden ser afectadas por xenobióticos. La liberación de neurotransmisores (NT) y la contracción muscular está regulada por transmisores y moduladores que sintetizan y liberan las neuronas. En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de xenobióticos que interfieren en estos mecanismos. La perturbación de la actividad celular puede deberse a alteraciones en 1) la concentración del NT, 2) la función del receptor, 3) la transducción de señales intracelular y 4) procesos de finalización de la señal.

### **Alteración de la concentración del NT**

Los xenobióticos pueden modificar la concentración del NT en la sinapsis al interferir en su síntesis, almacenamiento y liberación.

### **Interacción entre el xenobiótico y el Receptor del NT**

Muchos xenobióticos interactúan con el receptor de los NT y actúan como agonistas los que se unen al receptor e imitan al ligando natural, 1) antagonistas, se unen al receptor en el sitio del ligando natural sin activar al receptor, 2) activadores, 3) inhibidores se unen a la zona del receptor no involucrada en la unión al ligando natural. Los agonistas y los activadores reproducen la respuesta mientras que los antagonistas y los inhibidores bloquean las respuestas fisiológicas de los ligandos naturales.

### **Interacción entre el xenobiótico y la transducción de señales**

Muchos xenobióticos alteran la actividad neuronal o muscular mediante su acción sobre la traducción de las señales. Los canales de Na dependiente del voltaje aumentan las señales excitatorias generadas por los canales catiónicos los que son activados o inhibidos según diversos xenobióticos (Tabla 2).

**Tabla 2: Sustancias que actúan sobre los neurotransmisores y alteración de la regulación de las células**

Receptor/Canal/Bomba		Agonistas/activador		Antagonistas/inhibidores	
Nivel	Localización	Sustancia	Efecto	Sustancia	Efecto
Receptor Nicotínico Acetilcolina	Musculo esquelético	Nicotina, anatoxina	Fibrilación muscular luego parálisis	Tubocurarina α Bungarotoxina α Cobrotoxina Ind. Toxina botulínica Pb, anestésicos	Parálisis muscular
	Neuronas		Activación neuronal		Inhibición muscular
Receptor muscarínico de Acetilcolina	Musculo cardiaco	Ind: inhibidores de ChE	Disminución de la frecuencia y contractibilidad cardiaca	Atropina, fármacos pseudotropinicos	Aumento de la frecuencia cardiaca
Receptor Muscarínico Acetilcolina	Musculo liso	Ind: inhibidores de ChE	Espasmos musculo liso, salivación, lagrimeo	Atropina, Fármacos pseudo Atropinicos Antidepresivos triciclicos	Relajación musculo liso → parálisis intestinal, disminución salivación
Receptor Muscarínico Acetilcolina	Neuronas del SNC	Oxotremolina Ind: Inhibidores de ChE	Activación neuronal → convulsión		
Receptor 5HT	Musculo liso	Alcaloides ergotaminicos	Vasoconstricción isquemia → hipertensión arterial	ketanserina	Efectos antidotos de intoxicación por ergotaminicos
Receptor α adrenérgico	Musculo liso, muscular	Adrenalina, Noradrenalina, cocaína, tiramina, anfetamina, antidepresivos triciclicos	Vasoconstricción isquemia → hipertensión arterial	prozosina	Efectos antidotos de intoxicación por agonistas receptor α
Receptor β adrenérgico	Musculo cardiaco	Adrenalina, Noradrenalina, cocaína, tiramina, anfetamina, antidepresivos triciclicos	Aumento de la excitabilidad y la contractibilidad cardiaca	Atenolol, metropropol	Efectos antidotos de intoxicación por agonistas receptor β
Receptor de glutamato	Neuronas SNC	N metil aspartato Cainato, donoato Quisqualato Ind: hipoxia, HCN Liberación Glutamato	Activación neuronal → convulsiones excitotoxicidad	Fenciclidina Ketamina Anestésicos generales	Inhibición neuronal, anestesia Protección contra la excitotoxicidad



Receptor GABA	Neuronas del SNC	Sedantes, barbitúricos, Benzodiacepinas, Anestésicos, alcohol (etanol)	Inhibición neuronal → sedación anestesia general, coma depresión de centros vitales	Picrotoxina, insecticidas ciclodienos, lindano. Ind: isoniazida	Activación neuronal → temblores, convulsiones
Receptor de Glicina	Neuronal SNC, moto neuronas	Anestésicos generales	Inhibición de neuronas motoras	Estricnina Ind: toxina tetánica	Desinhibición de las neuronas motoras → convulsión tetánica
Receptor opiáceo	Neuronas del SNC y neuronas viscerales	Morfina y análogos	Inhibición neuronal → anestesia, depresión respiratoria, retención urinaria, estreñimiento	Naloxona	Efectos antidotos de la intoxicación por opiáceos
Canal de Na <sup>+</sup> dependiente del voltaje	Neuronas, células musculares	Aconitina, toxinas de escorpión, Batracotoxina, Ciguatoxina, DDT, piretroides	Activación neuronal → convulsión	Tetradotoxinasaxitoxina, anestésicos locales, fenitoína, quinidina	Inhibición neuronal → parálisis anestésica, acción anticonvulsiva
Canal Ca <sup>2+</sup> dependiente del voltaje	Neuronas, células musculares	Atrotoxina ? Latrotoxina ?	Activación neuronal y muscular, lesión celular	Pb	Inhibición neuronal → parálisis
Canal de K <sup>+</sup> activado por voltaje	Neuronas, células musculares	Pb <sup>2+</sup>	Inhibición neuronal	Ba, apanina (veneno de abeja)	Activación neuronal y muscular → espasmos, convulsiones

Ind: acción indirecta, es decir alterando el neurotransmisor; ChE: colinesterasa

## Deterioro del mantenimiento del medio celular interno: mecanismos de muerte celular por tóxicos

Para sobrevivir las células deben 1) sintetizar moléculas endógenas 2) agrupar complejos macromoleculares 3) mantener el medio interno 4) producir energía para actual.

Las sustancias que alteran estas funciones ponen en peligro la vida de la célula. Se conocen tres alteraciones bioquímicas críticas que provocan la muerte de la célula que son: la disminución de ATP, el aumento del ion calcio y la hiperproducción de especies oxígeno reactivas (ROS) y especies nitrógeno reactivas (NOS).

### Disminución de ATP

Son muchas e importantes las funciones que cumple el ATP en la célula. Es la fuente principal de energía. Se utiliza ATP en numerosas reacciones bioquímicas y se incorpora a los cofactores y a los ácidos nucleídos. Es utilizado en la contracción muscular, para polimeriza-

ción del cito esqueleto, el mantenimiento de la motilidad celular, la división celular, el transporte vesicular y la morfología de las células. También el ATP impulsa los transportadores iónicos que conservan las condiciones esenciales para las diversas funciones celulares.

El ATP se forma en la mitocondria mediante la fosforilación oxidativa en un proceso de varios pasos, cada uno de los cuales puede ser inhibido por la acción de diversos xenobióticos como se presenta a continuación:

1. Inhibidores de la entrega de hidrógeno a la cadena de transporte de electrones que actúa sobre /como
  - 1.1. Glicólisis (crítica en neuronas): hipoglucemia; yodoacetato y  $\text{NO}^+$  en GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa)
  - 1.2. Gluconeogenesis (crítica en células tubulares renales): consumidores de coenzima
  - 1.3. Oxidación de ácidos grasos (crítica en el músculo cardíaco): hipoglicina, ácido 4-pentenoico
  - 1.4. Piruvato deshidrogenasa: arsenito, DCVC (diclorovinil cisteína), p-benzoquinona
  - 1.5. Ciclo de citrato
    - 1.5.1. Aconitasa: fluoroacetato, ONOO-
    - 1.5.2. Isocitrato deshidrogenasa: DCVC
    - 1.5.3. Succinato deshidrogenasa: malonato, DCVC, PCBD-cys, 2-bromohidroquinona, ácido 3-nitropropiónico, cis-crotonalide, fungicidas
  - 1.6. Agotadores de TPP (inhiben Piruvato Deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa KGDH): etanol
  - 1.7. Consumidores de coenzima A: 4- (dimetilamino) fenol, p-benzoquinona
  - 1.8. Consumidores de NADH
    - 1.8.1. Activadores de poli (ADP-ribosa) polimerasa: agentes que causan daño en el ADN (por ejemplo, metil nitroso guanidina, peróxido de hidrógeno, ONOO-)
2. Inhibidores del transporte de electrones que actúan sobre / como
  - 2.1. Inhibidores de complejos de transporte de electrones
    - 2.1.1. NADH-coenzima Q reductasa (complejo I): rotenona, amital, paraquat
    - 2.1.2. Citocrome Q-citocrome c reductasa (complejo III): antimicina-A, mixotiazol
    - 2.1.3. Citocromo oxidasa (complejo IV): cianuro, sulfuro de hidrógeno, azida, formiato, NO, fosfina ( $\text{PH}_3$ ).
    - 2.1.4. Inhibidores múltiples: dinitroanilina y herbicidas difeniléter, ONOO.
    - 2.1.5. Aceptores de electrones:  $\text{CCl}_4$ , doxorubicina, menadiona.
3. Inhibidores del suministro de oxígeno a la cadena de transporte de electrones.
  - 3.1. Productos químicos que causan parálisis respiratoria: depresores del sistema nervioso central (por ejemplo, opiáceos), convulsivos.
  - 3.2. Productos químicos que alteran el intercambio gaseoso pulmonar:  $\text{CO}_2$ , "irritantes pulmonares profundos" ( $\text{NO}_2$ , fosgeno, perfluoroisobuteno).
  - 3.3. Productos químicos que inhiben la oxigenación de Hb: monóxido de carbono, sustancias químicas que forman metahemoglobina.

3. 4. Productos químicos causantes de isquemia: alcaloides ergot, cocaína.
4. Inhibidores de la fosforilación de ADP.
  - 4.1. ATP sintasa: oligomicina, citoxina, DDT, clordecona
  - 4.2. Translocador de nucleótidos de adenina: atractilósido, DDT, ácidos grasos libres, lisofosfolípidos.
  - 4.3. Transportador de fosfato: N-etilmaleimida, mersalil, p-benzoquinona.
  - 4.4. Productos químicos que disipan el potencial de la membrana mitocondrial (desacopladores).
    - 4.4.1. Cationóforos: herbicidas de pentaclorofenol, dinitrofenol, benzonitrilo, tiadiazol, salicilato, fármacos catiónicos, anfifílicos (amiodarona, perhexilina), valinomicina, gramicidina, calcimicina
    - 4.4.2. Productos químicos que permeabilizan la membrana interna mitocondrial: pentacloro butadieniel-cys, clordecona.
5. Productos químicos que causan daño en el ADN mitocondrial y/o alteración de la transcripción de proteínas mitocondriales claves.
  - 5.1. Medicamentos antivirales: zidovudina, zalcitabina, didanosina, fialuridina.
  - 5.2. Cloranfenicol (cuando se sobredosifica).
  - 5.3. Etanol (cuando se consume crónicamente).

#### **Aumento del ion calcio dentro de la célula**

Existe una diferencia de 10,000 veces entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y la citosólica la cual se mantiene por la impermeabilidad de la membrana plasmática a  $\text{Ca}^{2+}$  y por los mecanismos de transporte que eliminan el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma.

Resulta importante mantener la impermeabilidad de la membrana plasmática a los iones calcio así como los mecanismos de transportes que extraen calcio a efectos de mantener la regulación y mantenimiento de los niveles del ion. El calcio es bombeado afuera del citoplasma a través de la membrana plasmática y además quedar retenido en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias (Figura 4).

Existen sustancias tóxicas que aumentan los niveles de calcio porque facilitan la entrada de calcio o inhiben la salida. La apertura de los canales de calcio y la alteración de la membrana plasmática hace que el calcio se desplace hacia el exterior en contra de un gradiente desde el líquido extracelular al citoplasma. Otros tóxicos pueden causar la fuga del calcio del retículo endoplasmático o de las mitocondrias y aumentar la concentración intracelular. También pueden ser inhibidos los transportadores o el consumo de fuerza impulsora. Un aumento de calcio intracelular es nocivo para la célula porque puede dar lugar a 1) agotamiento de las reservas energéticas secundario a la inhibición de ATPasa que participa en la fosforilación oxidativa 2) disfunción de los microfilamentos 3) activación de enzimas hidrolíticas 4) formación de ROS NOS.

Hay al menos tres mecanismos por los cuales las concentraciones elevadas y sostenidas en  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular influyen desfavorablemente en el equilibrio de la energía celular.

- Primero, las altas concentraciones citoplásmicas de  $\text{Ca}^{2+}$  provocan un aumento de la captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del transportador de difusión facilitada de  $\text{Ca}^{2+}$  que utiliza como fuerza impulsora el potencial de membrana negativo del interior mitocondrial. En consecuencia, la captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  disipa el potencial de membrana y se inhibe la síntesis de ATP. Además, los productos químicos que oxidan el NADH mitocondrial activan un transportador que extrae  $\text{Ca}^{2+}$  desde la matriz. La consiguiente incorporación y exportación continua de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  ciclismo") por las mitocondrias compromete aún más la fosforilación oxidativa.
- En segundo lugar, el  $\text{Ca}^{2+}$  también puede alterar la síntesis de ATP causando daño oxidativo a la membrana interna por mecanismos.
- En tercer lugar, un aumento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico no solo perjudica la síntesis de ATP, también aumenta el consumo de ATP por la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa que continúa trabajando para eliminar el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Un segundo mecanismo por el cual un aumento descontrolado de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma causa lesión celular es la disociación microfilamental. Los filamentos de actina mantienen la morfología celular mediante la unión de los filamentos a proteínas de unión de actina en la membrana plasmática.

Un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico provoca la disociación de los filamentos de actina, -actinina y fodrina, dos proteínas que promueven el anclaje del filamento a la membrana plasmática. Esto representa un mecanismo que conduce a la formación de ampollas en la membrana plasmática, una condición que predispone la membrana a la ruptura.

Un tercer evento por el cual las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son perjudiciales para las células es la activación de las enzimas hidrolíticas que degradan las proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleídos. Muchas proteínas de membrana son el objetivo de proteasas neutras activadas con  $\text{Ca}^{2+}$  o calpaínas. La hidrólisis mediada por calpaína de las proteínas de unión a actina también puede causar formación de ampollas en la membrana. La activación indiscriminada de fosfolipasas por  $\text{Ca}^{2+}$  causa la ruptura de la membrana en forma directa o por la formación de detergentes. La activación de endonucleasa dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  causa la fragmentación de la cromatina.

Niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  puede bloquear la topoisomerasa II en una forma que escinde al DNA. En resumen, la hipercalcemia intracelular se activa por varios procesos que interfieren con la capacidad de las células para mantener su integridad estructural y funcional.

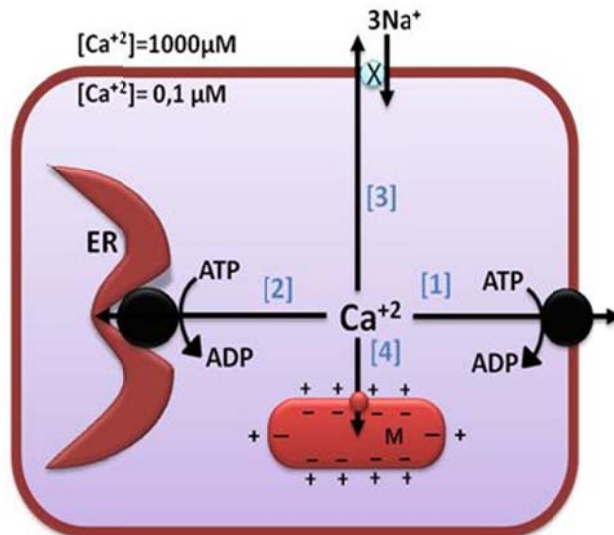


Figura 4: Mecanismos para la eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma: 1) El bombeo mediado por  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa hacia el espacio extracelular, 2) incorporación al retículo endoplásmico (ER) impulsado por un gradiente iónico, 3) expulsar al espacio extracelular por el intercambiador de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  y 4) ingreso a las mitocondrias (M, por un transportador de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

### Sustancias que inducen la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ en el citoplasma

1. A través de canales activados por ligando en neuronas:
  - 1.1. Agonistas del receptor de glutamato ("excitotoxinas"): glutamato, kainato, domoato
  - 1.2. Agonistas de receptores de capsaicina: resiniferatoxina
2. A través de canales de voltaje activado: maitotoxin (?),  $\text{HO} \cdot$
3. A través de "poros recién formados": maitotoxina, anfotericina B, clordecona, metilmercurio, alquilatinas
4. A través de la membrana celular alterada:
  - 4.1. Detergentes: detergentes exógenos, lisofosfolípidos, ácidos grasos libres.
  - 4.2. Enzimas hidrolíticas: fosfolipasas en venenos de serpiente, fosfolipasa A2 endógena.
  - 4.3. Peroxidantes de lípidos: tetracloruro de carbono.
  - 4.4. Toxinas citoesqueléticas (al inducir la formación de ampollas en la membrana): cito-calasinas, faloidina.
5. Desde las mitocondrias:
  - 5.1. Oxidantes de NADH mitocondrial: alloxan, t-BHP, NAPBQI, divicina, hidroperóxidos de ácidos grasos, menadiona,
  - 5.2. Otros: óxido de fenilarsina, gliotoxina,  $\cdot \text{NO}$ ,  $\text{ONOO}^-$
6. Desde el retículo endoplásmico:
  - 6.1. Activadores del receptor  $\text{IP}_3$ :  $\gamma$ -HCH (lindan),  $\text{IP}_3$  formado durante la "excitotoxicidad"
  - 6.2. Activadores del receptor de Ryanodine: -HCH

## **Sustancias químicas que inhiben la exportación de $\text{Ca}^{2+}$ del citoplasma**

### **(inhibidores de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en la membrana celular y/o retículo endoplásmico)**

1. Aglutinantes covalentes: acetaminofeno, bromobenceno,  $\text{CCl}_4$ , cloroformo, 1,2 dicloroetileno
2. Oxidantes tiol: cistamina (formación de disulfuro mixto), diamida, t-BHP,  $\text{O} \cdot^-$   
2 y generadores  $\text{HOOH}$  (por ejemplo, menadiona, diquat)
3. Otros: vanadate,  $\text{Cd}^{2+}$
4. Productos químicos que alteran la síntesis de ATP mitocondrial

## **Hiperproducción de ROS y NOS**

Muchos xenobióticos como los metales de transición pueden formar ROS y NOS. La hipercalcemia intracelular puede causar la hiperproducción de ROS y NOS debido a que el calcio ayuda a generar una o ambas especies mediante la activación de las deshidrogenasas del ciclo del ácido cítrico y de la sintasa de NO.

La interacción entre los trastornos metabólicos anuncia un desastre celular. Los principales procesos bioquímicos descritos anteriormente pueden interactuar entre sí y aumentarse de diversas formas:

1. Al agotarse las reservas de ATP priva de energía a las bombas de calcio de la membrana plasmática produciendo la elevación de los niveles de calcio en el citoplasma. El flujo de calcio hacia el citoplasma hace que el potencial de membrana de la mitocondria disminuya e impide la acción de la ATP sintasa.
2. La hipercalcemia intracelular facilita la formación de ROS y NOS, inactivan oxidativamente la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante oxidación que a su vez, agrava la hipercalcemia.
3. Los ROS y NOS también pueden agotar las reservas de ATP. El radical  $\text{NO} \cdot$  es un inhibidor reversible de la citocromo oxidasa, el catión  $\text{NO}^+$  (nitrosonio) inactiva gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, alterando la glucólisis, mientras que el radical  $\text{ONOO}^-$  irreversiblemente la cadena respiratoria. Por lo tanto,  $\text{NO} \cdot$  y  $\text{ONOO}^-$  inhiben síntesis celular de ATP.
4. Además,  $\text{ONOO}^-$  puede inducir roturas monocatenarias de ADN, que activan la polimerasa (PARP). Como parte de la estrategia de reparación, la PARP activada transfiere numerosos fragmentos de ADP-ribosa desde el  $\text{NAD}^+$  a proteínas nucleares y a la propia PARP. El consumo de  $\text{NAD}^+$  compromete severamente la síntesis de ATP mientras que la re-síntesis de  $\text{NAD}^+$  consume ATP, una de las consecuencias de la alteración al daño del ADN por  $\text{ONOO}^-$  es el déficit de energía celular.

## **Transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) y el peor resultado: Necrosis**

La captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , la disminución del potencial de membrana mitocondrial, la formación de ROS y NOS, el agotamiento del ATP y las consecuencias de los trastornos metabólicos primarios (p. ej., acumulación de compuestos inorgánicos fosfato, ácidos grasos

libres y lisofosfátidos) son factores que causan un aumento abrupto en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial denominada MPT.

Esto se cree que es causado por proteínas mal plegadas de la membrana interna y externa, que se agregan y abren un poro proteináceo ("megacanal") que abarca ambas membranas mitocondriales. Como este poro es permeable a solutos de tamaño 1500 Da, su apertura permite la libre afluencia en el espacio de matriz de protones, causando la disipación rápida y completa del potencial de membrana, detiene la síntesis de ATP, así como la afluencia osmótica de agua, lo que resulta en la hinchazón mitocondrial. El  $\text{Ca}^{2+}$  que se acumuló en el espacio de la matriz fluye a través del poro, inundando el citoplasma.

Tales mitocondrias no solo son incapaces de sintetizar ATP sino que incluso perder los recursos restantes porque la despolarización de la membrana interna fuerza a la ATP sintasa a operar en el reverso, como una ATPasa, hidrolizando ATP a ADP. En este escenario, incluso la glucólisis puede verse comprometida por el suministro insuficiente de ATP a las enzimas glucolíticas (hexoquinasa, fosfofructoquinasa). Una completa catástrofe bioenergética se produce en el metabolismo de la célula por los trastornos provocados por la sustancia tóxica (Figura -7) que es tan extenso que la mayoría o todas las mitocondrias en la célula se someten a MPT, causando el agotamiento del ATP celular. Los procesos de degradación ya delineados (p. Ej., Oxidativo y la degradación hidrolítica de macromoléculas y membranas, así como la desintegración del soluto intracelular y la homeostasis volumétrica) se completarán, causando una falla completa en el mantenimiento de la estructura celular y funciones que culminan en la lisis celular **o necrosis**

**El término oncosis** (del griego *onkos*, hinchazón) se ha propuesto, en sustitución al de necrosis, para situaciones patológicas en que la principal característica de la célula enferma es su inflamación o balonamiento, seguido de formación de vesículas y estallido.

La **oncosis o necrosis** es un fenómeno pasivo; no está programado genéticamente.

Se inicia por la acción de un tóxico que altera las estructuras o funciones celulares un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, que se traduce en entrada de agua e iones acompañada de disminución de la capacidad para bombear iones, lo que lleva a hinchazón y posibilidad de rotura. Ello lleva a un incremento de la concentración citosólica de calcio, el cual activa las fosfolipasas que, a su vez, degradan a los fosfolípidos y se produce rotura de membranas y fragmentación de orgánulos, con hinchazón y estallido celular, cuyo contenido (enzimas lisosómicas) afecta a las células vecinas lo que induce una respuesta inflamatoria en el tejido.

La necrosis celular es un proceso desordenado e independiente de energía, presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática, además hay una clara disfunción en la mitocondria y aumento en el volumen celular, desencadenando citólisis y posteriormente liberando todo el material citoplasmático hacia el exterior de la célula, produciendo procesos inflamatorios y necróticos en los tejidos afectados.

## Una consecuencia alternativa de la TMP: la apoptosis

Las sustancias químicas que afectan desfavorablemente el metabolismo energético celular a la homeostasis del calcio y el estado oxidación-reducción que finalmente producen la necrosis también pueden provocar apoptosis.

El término **apoptosis** se aplica a la muerte que acontece en el recambio celular fisiológico, que elimina las células dañadas, precancerosas o en número excesivo (como un antónimo de mitosis); pero se ha visto que la apoptosis también puede inducirse por xenobióticos. Es un fenómeno biológico básico de cinética de la renovación celular; aunque supone una forma de muerte y eliminación de células, se conserva la arquitectura del tejido. Participa ampliamente en la organogénesis, en la resolución de los procesos inflamatorios, en el control del crecimiento de los tumores, en los procesos inmunitarios, la defensa ante los virus, etc.

La forma de muerte celular reconocida como apoptosis fue intuida por el patólogo alemán Virchow (1821-1902), y se confirmó posteriormente por los hallazgos ultraestructurales con microscopía electrónica que indujeron a denominarla "necrosis por encogimiento o contracción". La célula afectada muere pero, a diferencia de la necrosis no se lesionan los tejidos vecinos y no hay respuesta inflamatoria.

La apoptosis es la muerte celular por un proceso activo, controlado genéticamente, que elimina células no necesarias o dañadas. Se origina por lesión o modificación del ADN nuclear, la cual lleva a cambios en la estructura que conducen a la fragmentación celular sin respuesta inflamatoria.

Apoptosis es un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteína proteasas denominadas *caspasas* (en inglés: cysteinyl aspartate-specific proteases) y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula.

La apoptosis es un mecanismo de respuesta biológica cuando la célula percibe un conflicto entre las señales que recibe, procedentes del interior o del exterior. Por ello, no es correcto interpretar la apoptosis exclusivamente como "muerte celular programada", ya que también es inducida por agentes externos.

La apoptosis es un fenómeno activo que supone la activación de determinados genes ("genes de muerte") cuya expresión da lugar a la síntesis de varias proteínas que pueden actuar bien como reguladores de la transcripción y frenando la proliferación celular o bien como activadores de enzimas proteolíticas (endonucleasas, caspasas, topoisomerasas, transglutaminasas, etc.), que alteran o fragmentan proteínas y ADN. Se han descubierto también genes que frenan la apoptosis actuando sobre aquellos, pero que, a su vez, pueden ser inhibidos, con lo que quedan libres de actuar los apoptóticos.

El primer cambio bioquímico en la apoptosis es la modificación del potencial de membrana mitocondrial, con liberación de citocromo c. La presencia de éste en el citosol activa a distintas enzimas proteasas como las caspasas y las endonucleasas.



Las caspasas son proteasas, enzimas que participan en la apoptosis; otras proteasas diferentes que también participan en la apoptosis son las calpaínas (que fueron las primeras enzimas reconocidas como implicadas), catepsinas, granzimas, serina-proteasas, proteasosomas, etc. Las caspasas son aspartasas C-cisteína; es decir, cortan a las proteínas por el ácido aspártico, y tienen cisteína en el centro activo de la enzima. Se sintetizan en forma inactiva, como procaspasas que han de ser activadas por las caspasas inductoras, para iniciar lo que se conoce como **cascada proteolítica**, en la que participan también otras proteínas como la p-53, las Apf (factor activador de proteasa apoptótica), las FAS, las Bax, etc., que son proapoptóticas, y las Bcl (expresadas por protooncogenes del cromosoma 18), que son antiapoptóticas. Se conocen actualmente casi 15 caspasas que se dividen, según su intervención en la cascada proteolítica, en tres grupos: inductoras, ejecutoras e inductoras-ejecutoras. Una vez activadas, las caspasas ejecutoras fragmentan el citoesqueleto y el núcleo; en esto último colabora una **endonucleasa** (ADNasa) activada.

Otra enzima que participa en estos procesos es la **topoisomerasa**, capaz de cortar una o dos hebras del ADN, lo que permite un giro o relajación transitoria de la doble hélice que favorece el acceso a la información genética; ello da lugar a una sobreexpresión de las caspasas y otras proteínas con inducción de la apoptosis.

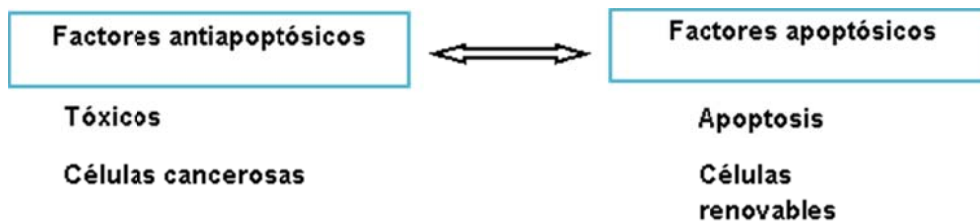
Se ha clasificado los métodos de detección de apoptosis en: 1) alteraciones citomorfológicas; 2) fragmentación de ADN; 3) detección de caspasas, fragmentación de sustratos, reguladores e inhibidores; 4) alteraciones de membrana; y 5) ensayos mitocondriales. Todos y cada uno de ellos tienen ventajas y desventajas tanto técnico-científica

La detección de la aparición de apoptosis en un órgano por estudio histológico es difícil, porque no se produce inflamación y los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados. Puede realizarse mediante citometría de flujo para el recuento de células apoptóticas y por cuantificación inmunoquímica de fragmentos nucleosómicos.

Una técnica de cuantificación histoquímica denominada T.U.N.E.L. (en inglés: Terminal dUTP Nick End-Labeling) consistente en marcar células que han sufrido daño al DNA por acción de endonucleasas. Estas células se pueden marcar y visualizándolas en microscopio de luz, de fluorescencia o citómetro de flujo.

La apoptosis también puede ser revelada a partir de una cuantificación de la actividad enzimática de caspasas, informada como un marcador eficiente, por ejemplo, si se aplica el sustrato de reconocimiento a la caspasa-3 (efectora) siendo esta actividad determinada por varias técnicas como Western blot, Inmunoprecipitación e Inmunohistoquímica

Puede decirse que en situación de normalidad existe un equilibrio entre distintos factores que favorecen la apoptosis y los que se oponen a ella, equilibrio que puede ser alterado por intervención de un tóxico:



En las células percederas o renovables prevalecen los genes proapoptóticos, mientras que en las células cancerosas los antiapoptóticos. Cuando los genes de uno u otro signo experimentan mutaciones o cambios cuantitativos en su expresión, tienen lugar distintas patologías como cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades degenerativas, etc.

Cuando se inicia la apoptosis se observa al microscopio óptico y al electrónico una condensación de la cromatina, adoptando el núcleo forma de media luna creciente, lo que presagia la aparición de vesículas y fragmentación; el citoplasma se retrae, el agua pasa al retículo endoplásmico, cuyas cisternas se dilatan y se abren poros en la membrana que sirven de canales para la salida del agua. Los orgánulos se aproximan, pero las mitocondrias no presentan las alteraciones propias de la oncosis. Finalmente, la célula lesionada es fagocitada por macrófagos o por las células vecinas.

Tóxicos como el metilmercurio incrementa la fragmentación del ADN en regiones del sistema nervioso.

Aunque por su trascendencia fisiopatológica son importantes las afectaciones de las células nobles o parenquimatosas de los principales órganos (hepatocito, neumocito, neurona, nefrona), también presenta especial interés la alteración de las células que forman las paredes de los vasos sanguíneos, concretamente, del endotelio, por el extenso territorio anatómico que abarca.

**Tabla 3. Diferencias entre apoptosis y oncosis**

<b>Variables</b>	<b>Apoptosis</b>	<b>Oncosis</b>
Origen	Programación genética	Accidental
Especificidad celular	Si	No
Proceso	Activo, consumo de energía	Pasivo
Tamaño celular	Disminuye, condensación del núcleo	Aumento
Membrana plasmática	Se conservan	Se desintegran
Orgánulos	Se conservan	Se desintegran
Cromatina	Se agregan a la membrana	Flocula
ADN	Fragmentación a nucleosomas	Roturas al azar
Cuerpos apoptoticos	Se forman	No, lisis total

¿Qué determina la forma de muerte celular? Muchos xenobióticos pueden causar tanto apoptosis como necrosis. Xenobióticos, como el hepatotóxico 1,1-dicloroetileno, tioacetamida y el cadmio y la ocratoxina nefrotóxica pueden causar tanto apoptosis como necrosis.

### La disponibilidad de ATP determina la forma de la muerte celular

Hay algunas características comunes en el proceso de apoptosis y necrosis. Sin embargo, los tóxicos tienden a inducir apoptosis a niveles de exposición bajos o a niveles altos de xenobióticos pero a cortos tiempos de exposición, mientras que causan necrosis más tardíos a niveles de exposición altos. Esto indica que la gravedad de la agresión determina el modo de muerte celular. Con base en la evidencia experimental, parece que los daños tóxicos más grandes causan la muerte celular necrótica en lugar de la apoptosis porque incapacita a la célula para sufrir apoptosis. Esta incapacidad puede ser el resultado de tres eventos celulares relacionados causativamente, es decir, un número creciente de mitocondrias sometidas a TPM, agotamiento de ATP y activación fallida o inactivación de caspasas. Se propuso un modelo en el que el número de mitocondrias sometidas a TPM (que probablemente depende del grado de exposición química) determina el destino de la célula. Según este modelo, cuando solo unas pocas mitocondrias desarrollan TPM, se eliminan mediante autofagia lisosómica y la célula sobrevive. Cuando más mitocondrias sufren TPM, el mecanismo autofágico se abruma, y los factores proapoptóticos liberados (por ejemplo, cyt c, Smac, AIF) inician la activación de la caspasa y apoptosis (Fig. 5). Cuando TPM involucra prácticamente a todos mitocondrias, ocurre necrosis.

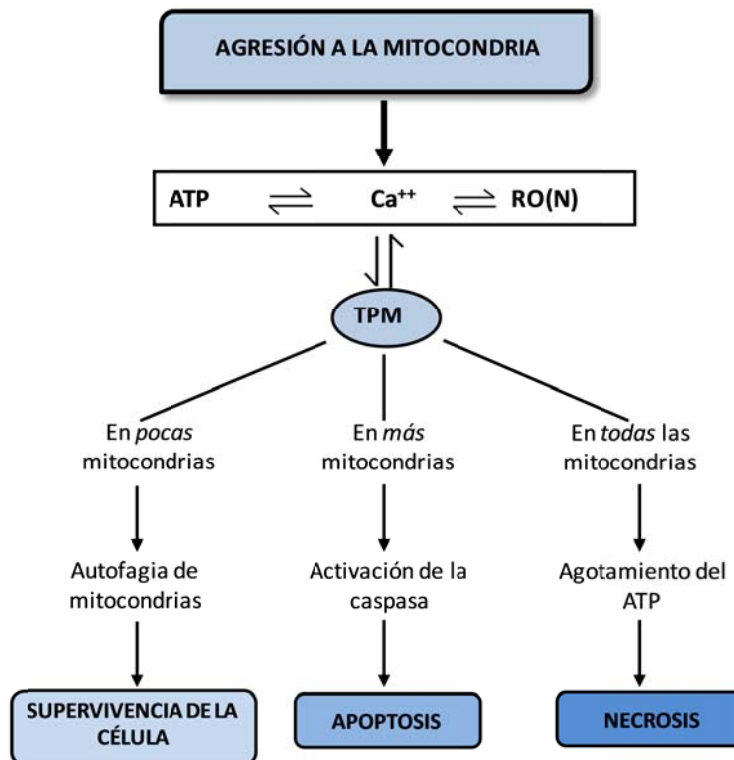


Figura 5: Árbol de decisiones sobre el destino de la célula lesionada. TPM transición de permeabilidad mitocondrial

## Cuarto paso, reparación o reparación anómala

El cuarto paso en el desarrollo de la toxicidad es una reparación inadecuada. Los xenobióticos al alterar una macromolécula pueden no ser reparadas y producir daños en el organismo que influye en la progresión de la toxicidad.

### Reparación molecular

La molécula dañada puede ser reparada por diferentes vías. La reparación como la oxidación de grupos tioles de las proteínas o de los metilos del DNA puede revertir el daño original. En el caso de DNA alterado químicamente o los lípidos peroxidados es posible eliminar las unidades dañadas de las moléculas mediante una hidrólisis y se introducen unidades neosintetizadas. En esas situaciones se procede a la degradación completa de la molécula alterada que se sintetiza de nuevo.

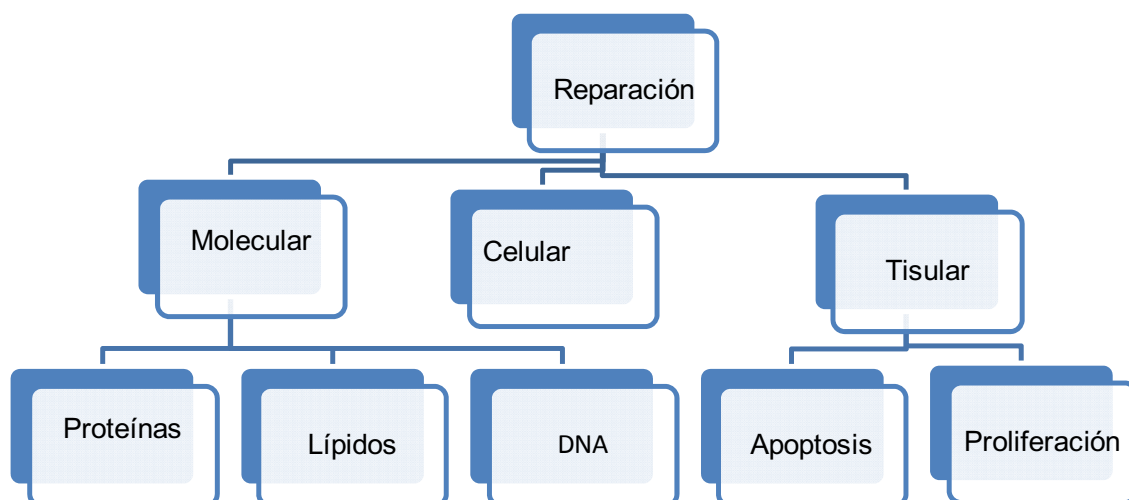


Figura 6: Mecanismo de reparación

### Reparación de proteínas

Los grupos tioles son esenciales para las proteínas. La oxidación de estos grupos se revierte mediante una reducción enzimática catalizada por la tioredoxina. Una vez oxidados los grupos catalíticos de las tior proteínas se reciclan nuevamente empleando NADPH.

La reparación de la hemoglobina oxidada (metahemoglobina) se logra mediante una transferencia de electrones desde el citocromo b5 el cual se regenera a continuación a través de citocromo b5 reductasa dependiente de NADH.

Las chaperonas moleculares como las proteínas de choque térmico pueden rescatar proteínas desnaturalizadas por desagregación y replegamiento dependiente de ATP, o mediante la participación de la ubiquitina ligasa dependiente de chaperonas que ayudan en su degradación por los proteasomas. Los proteasomas son grandes complejos de proteasa que consumen ATP en el citosol que no solo controla el nivel de proteínas reguladoras (por ejemplo, p53, IκB, Nrf2,

ciclinas), sino también tienen un papel predominante eliminando proteínas intracelulares oxidadas y mal plegada o dañadas de otro modo.

### **Reparación de lípidos**

Los lípidos peroxidados se reparan mediante un complejo proceso que opera en conjunto con una serie de reductores, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Los fosfolípidos que contienen hidroperóxidos de ácidos grasos se hidrolizan preferencialmente por fosfolipasa A2, y son reemplazados por ácidos grasos normales. Nuevamente, NADPH es necesario para "reparar" los reductores que se oxidan en el proceso.

### **Reparación de ADN**

A pesar de su alta reactividad con electrófilos y radicales libres, el ADN nuclear es notablemente estable, en parte porque está empaquetado en cromatina y debido a varios mecanismos de reparación disponibles para corregir alteraciones. El ADN mitocondrial, sin embargo, carece de histonas y mecanismos de reparación eficientes y por lo tanto es más propenso al daño. Se corrigen diferentes tipos de daños por mecanismos especializados, cada uno empleando un conjunto diferente de proteínas de reparación.

### **Reparación directa**

Ciertas modificaciones de ADN covalente son directamente revertidas por enzimas como la ADN fotoliasa, que escinde pirimidinas adyacentes dimerizadas por luz UV. Esta enzima está equipada con cromóforos y funciona solamente en las células expuestas a la luz. Los aductos menores, como grupos metilo, unidos a bases de ADN por agentes alquilantes (por ejemplo, sulfonato de metilmetano) pueden eliminarse por enzimas especiales. Tales grupos unido a la posición O6 de la guanina son eliminados por O6-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT). Mientras repara el ADN, esta alquiltransferasa se sacrifica a sí misma, transfiriendo el aducto en uno de sus residuos de cisteína. Esto resulta en su inactivación, ubiquitinación y degradación proteosomal. Por lo tanto, como el glutatión, que se agota durante la desintoxicación de electrófilos, MGMT se consume durante la reparación del ADN. Los grupos de metilo adjuntos a N1 de adenina y guanina, y N3 de timina y citosina se eliminan por desmetilación oxidativa catalizada por ADN dioxigenasas (ABH2 y ABH3).

### **Escisión de reparación de escisión de base y escisión de nucleótidos**

Son dos mecanismos para eliminar las bases dañadas del ADN. Lesiones que no causan una gran distorsión de la hélice se eliminan mediante escisión de base, en la cual la base alterada es reconocida por una DNA-glicosilasa relativamente específica de sustrato que hidroliza el enlace N-glicosídico, liberando la base modificada y la creación de un sitio apurínico o apirimidínico (AP) en el ADN. El sitio AP es reconocido por la AP endonucleasa, que hidroliza el enlace fosfodiéster adyacente al sitio abásico. Después de su eliminación, el azúcar abásico es reemplazado con el nucleótido correcto por una ADN polimerasa y está sellado en lugar por

una ligasa de ADN. Curiosamente, AP endonucleasa es una proteína bifuncional y también se llama factor-1 redox. Lesiones más importantes como los aductos producidos por aflatoxinas o

los derivados de aminofluoreno y los dímeros causados por la radiación UV son eliminados por reparación de escisión de nucleótidos, que emplea aproximadamente 30 proteínas. Involucra proteínas que reconocen la doble hélice distorsionada en la lesión, desenrollan el ADN, extirpan una cantidad de nucleótidos intactos en ambos lados de la lesión junto con el que contiene el aducto. La sección extirpada de la cadena se restaura mediante la inserción de nucleótidos en la cadena de la ADN polimerasa y la ligasa, usando la cadena complementaria como modelo.

La poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) parece ser importante en la reparación de la reparación por escisión.

Cuando se produce una alteración de una base o una rotura monocatenaria la PARP se une al ADN lesionado y se activa. El PARP activo escinde  $\text{NAD}^+$  y utiliza el fragmento ADP-ribosa de este cofactor para insertar cadenas largas de ADP-ribosa polimérica a las proteínas nucleares, tales como histonas. Una unidad ADP-ribosa contiene dos cargas negativas, las proteínas poli (ADPribosil) acumulan negatividad y la fuerza electro repulsiva resultante entre las proteínas cargadas negativamente y el ADN provocan la descondensación de la estructura de la cromatina. Se ha presentado la hipótesis que la fluidez de la cromatina terciada por PARP permite el acceso de las enzimas reparadoras del DNA.

### **Reparación celular**

Una estrategia de reparación de células dañadas es ampliamente utilizada en las neuronas periféricas para superar las lesiones celulares. En la mayoría de los tejidos, las células lesionadas mueren y los sobrevivientes se dividen para reemplazar las células perdidas. Una excepción notable es el tejido nervioso, porque las neuronas maduras han perdido su capacidad de multiplicarse. En las neuronas periféricas con daño axonal, la reparación se produce y requiere macrófagos y células de Schwann. Los macrófagos eliminan los desechos por fagocitosis y producen citocinas y factores de crecimiento, que activan las células de Schwann para que proliferen y se diferencien del modo de operación de mielinización en un modo de crecimiento-soporte. Las células de Schwann juegan un papel indispensable en la promoción de regeneración axonal al aumentar la síntesis de moléculas de adhesión celular, elaborando proteínas de matriz extracelular para la construcción de la membrana, y mediante la producción de una matriz (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de la línea de células gliales).

En el sistema nervioso central de los mamíferos, la regeneración axonal es prevenida por glucoproteínas inhibitoras del crecimiento y proteoglicanos sulfato de condroitina producidos por los oligodendrocitos y por la cicatriz producida por los astrocitos. Por lo tanto, el daño a las neuronas centrales es irreversible, pero se compensa en parte por el gran número de células nerviosas de reserva que pueden asumir las funciones de neuronas perdidas. Por ejemplo, en

la enfermedad de Parkinson, los síntomas no se observan hasta que haya al menos una pérdida del 80% de las neuronas de la zona nigroestriatal.

### **Reparación de tejidos**

En los tejidos cuyas células son capaces de multiplicarse, el daño se invierte mediante la eliminación de las células lesionadas y la regeneración del tejido por proliferación. Las celdas dañadas son eliminadas por apoptosis o necrosis.

Apoptosis: una eliminación activa de células dañadas iniciada por la apoptosis por lesión celular se puede considerar como reparación de tejido por dos razones, el primero de ellos es que puede interceptar el proceso que conduce a la necrosis.

La necrosis es más dañina que la apoptosis para el tejido en el que reside la célula lesionada.

Con la apoptosis, se eliminan las células muertas sin inflamación. En segundo lugar, la apoptosis puede interceptar el proceso que conduce a la neoplasia mediante la eliminación de las células con potencial mutagénico con daño en el ADN.

Debe enfatizarse, sin embargo, que la apoptosis de daño las células tienen un valor total como proceso de reparación de tejidos solo para los tejidos que se componen de células que se renuevan constantemente (por ejemplo, la médula ósea, el epitelio respiratorio y gastrointestinal, y la epidermis de la piel), o de células que se dividen de manera condicional (por ejemplo, hepática y renal células parenquimatosas), porque en estos tejidos las células apoptóticas son reemplazados fácilmente. El valor de la apoptosis como estrategia de reparación tisular disminuye notablemente en órganos que contienen células no reemplazables, como las neuronas, las células del músculo cardíaco y células germinales femeninas, porque la eliminación de tales células, si es extensa, puede causar un déficit en la función del órgano.

La proliferación es la regeneración de los tejidos que se compone de varias células y la matriz extracelular. La reparación de los tejidos lesionados abarca tanto la regeneración de las células perdidas y de la matriz extracelular como la reintegración de los elementos recién formados en los tejidos y órganos.

### **Cuando la reparación y la adaptación fallan**

Cuando la reparación falla aunque los mecanismos de reparación operan a nivel molecular, niveles celular, y de tejido, por varias razones a menudo fallan para proporcionar protección contra las lesiones. Primero, la fidelidad de los mecanismos de reparación no son absolutos, lo cual hace posible que algunas lesiones sean pasadas por alto. Sin embargo, la reparación falla generalmente cuando el daño supera los mecanismos de reparación. En otros casos, la capacidad de reparación puede agotarse cuando las enzimas necesarias o cofactores son consumidos. Por ejemplo, la alquilación de ADN puede conducir al consumo de O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferasa, y la peroxidación lipídica puede agotar alfa-tocoferol. A veces la lesión inducida por el tóxico afecta adversamente el proceso de reparación.

Por ejemplo, el etanol genera ROS vía CYP2E1 que deteriora la eliminación proteosomal de proteínas dañadas. Después de la exposición a sustancias químicas necrogénicas, la mitosis

de las células supervivientes puede bloquearse y resulta imposible la restauración del tejido. Finalmente, algunos tipos de lesiones tóxicas no se pueden reparar de manera efectiva. Esto ocurre cuando los xenobióticos se unen covalentemente a las proteínas. Por lo tanto, la toxicidad se manifiesta cuando falla la reparación de la lesión inicial porque los mecanismos de reparación se ven abrumados, agotados o deteriorados o son genuinamente ineficientes.

También es posible que la reparación contribuya a la toxicidad. Esto puede ocurrir de manera pasiva, por ejemplo, si cantidades excesivas de  $\text{NAD}^+$  son generados por PARP durante la participación de esta enzima en la reparación de las cadenas de ADN dañados, o cuando se consume demasiado NAD(P)H en la reparación de proteínas oxidadas y reductoras endógenas. Cualquiera de estas dos situaciones puede comprometer la fosforilación oxidativa, que también es dependiente en el suministro de cofactores reducidos, por lo tanto causar o agravar la depleción de ATP que contribuye a la lesión celular.

Además, la reparación puede participar de manera activa en la toxicidad. Esto sucede después de un daño tisular crónico cuando el proceso de reparación se desvía y desencadena una proliferación incontrolada en lugar de la remodelación del tejido. La consecuencia de dicha proliferación celular puede ser la neoplasia, mientras que la sobreproducción de matriz celular da origen a la fibrosis. Estos cambios celulares se verán detalladamente en la fibrosis respiratoria y hepática en el capítulo 5.

## **Metabolitos reactivos**

### **Características y producción de metabolitos reactivos**

Como hemos comentado en el Capítulo 2, una vez que un xenobiótico ingresa en el organismo sufre frecuentemente una serie de reacciones enzimáticas que hemos definido como procesos de *biotransformación* o *metabolización*. En general estas reacciones, dirigidas a aumentar la hidrofiliidad de la sustancia que ingresa al organismo para poder ser eliminada con mayor facilidad, dan como resultado metabolitos que no tienen actividad tóxica en el organismo. Sin embargo, esto no siempre es así y en muchas ocasiones se generan *metabolitos reactivos*, es decir compuestos nuevos que derivan del xenobiótico que ingresó al organismo producto de las reacciones de biotransformación y que además presentan toxicidad, en algunos casos incluso mayor que el tóxico del cual derivan. En general las vías involucradas en la activación de un tóxico (aquellas que generan metabolitos reactivos) se dan en menor proporción respecto a aquellas que conducen a metabolitos no tóxicos y fácilmente eliminables en orina (detoxificación); sin embargo existen ciertas situaciones donde las vías de activación pueden adquirir relevancia y derivar en procesos tóxicos debidos a la exposición a una sustancia en particular.

Los procesos por los cuales los metabolitos reactivos pueden generar efectos tóxicos o daño en el organismo son variados y dependen fundamentalmente de las características físico-



químicas del metabolito reactivo que indicará que procesos o estructuras afecta. Así, en algunos casos, la activación metabólica le confiere al metabolito resultante ciertas características que alteran procesos o estructuras ya que perturban el microambiente en el cual se desarrollan. Tal es el caso del etilenglicol que genera en el organismo ácido oxálico quien es el responsable de acidosis, hipocalcemia y obstrucción renal debido a la formación de cálculos de oxalato de calcio que afectan la función renal. En otras situaciones los cambios generados durante los procesos de activación generan grupos químicos que le confieren al metabolito mayor reactividad debido a que presentan una selectividad mayor por ciertas enzimas o receptores celulares. Como ejemplo de esto podemos citar el caso del paratión, un pesticida organofosforado, quien sufre una modificación metabólica del enlace P=S a P=O generando paraoxón. El paratión es un pobre inhibidor de la acetilcolinesterasa, mientras que el paraoxón inhibe esa enzima mucho más fuertemente y es el principal responsable de los efectos tóxicos vinculados a intoxicaciones con este pesticida. Una posibilidad, mucho más frecuente que las anteriores, es que los metabolitos resultantes de la activación presenten en su molécula ciertas características que los hagan particularmente reactivos, de manera que reaccionen rápidamente con macromoléculas que contengan grupos funcionales susceptibles. Dentro de esta situación encontramos sustancias electrofílicas, nucleofílicas, radicales libres o activadores de procesos redox. A continuación describiremos los mecanismos involucrados en la formación de cada uno de estos metabolitos con actividad incrementada.

#### *Metabolitos electrofílicos:*

Las sustancias electrofílicas son aquellas que presentan un átomo deficiente en electrones, por lo tanto reaccionará rápidamente con aquellas moléculas que tengan en su estructura un centro rico en electrones, es decir, un compuesto nucleofílico. Estos pueden ser no iónicos o catiónicos.

Ejemplos de este tipo de metabolitos son *aldehídos, cetonas, epóxidos, sulfóxidos, nitroso compuestos y fosfonatos* entre otros. Las características electrofílicas de estos compuestos surgen durante la formación de los mismos, donde usualmente el átomo de oxígeno insertado retira los electrones del átomo al cual se está uniendo, convirtiéndolo en un centro electrofílico. Otros compuestos de estas características son *aldehídos y cetonas  $\alpha$ - $\beta$  insaturados, quinonas y quinonimidias*. En este tipo de compuestos se forman dobles enlaces conjugados donde un oxígeno presente atrae con mayor fuerza los electrones y polariza la unión, haciendo a uno de los carbonos del doble enlace conjugado deficiente en electrones y por lo tanto electrofílico. La mayoría de estos metabolitos electrofílicos no iónicos son generados por reacciones catalizadas por citocromo P450.

Los compuestos electrofílicos catiónicos se generan por ruptura de enlaces heterolítica. Un ejemplo de este tipo de reacciones es la que sufre el carcinógeno más potente presente en el humo del tabaco, la nitrosamina cetona derivada de nicotina (NNK) quien origina el catión metil carbonio ( $^+\text{CH}_3$ ) o el catión piridiloxobutil carbonio dependiendo del sitio de C-hidroxilación donde se inicia la reacción.

### *Metabolitos radicalarios:*

Los radicales libres son moléculas que presentan un electrón desapareado. Este tipo de compuestos pueden surgir de reacciones donde el compuesto acepta un electrón, pierde un electrón o donde se producen rupturas homolíticas de un enlace.

Para que un compuesto pueda aceptar un electrón debe tener características electrofílicas. En estos procesos juegan un papel importante las reductasas, quienes transfieren un electrón a la molécula generando un radical libre. Luego ese electrón extra es transferido a una molécula de oxígeno dando el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y regenerando el compuesto xenobiótico original. Uno de los tóxicos que sufren este tipo de procesos es el paraquat.

Este conjunto de reacciones constituyen lo que se conoce como "ciclo redox" ya que a la vez que se genera un potente compuesto radicalario como el radical superóxido el tóxico está nuevamente en condiciones de aceptar un nuevo electrón y generar más especies radicalarias.

La importancia del radical superóxido radica en que es el compuesto involucrado en reacciones que dan origen a otros radicales libres. Tanto el radical superóxido generado en el proceso descrito anteriormente como el proveniente de fuentes endógenas (estallido respiratorio de macrófagos y granulocitos activados, cadena respiratoria mitocondrial principalmente a nivel del complejo I y III) interviene en dos vías fundamentales. En una de ellas se genera peróxido de hidrógeno ( $HO_2H$ ) como compuesto intermediario que luego da origen al radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) mediante una reacción catalizada por metales ( $Fe(II)$ ,  $Cu(I)$ ,  $Cr(V)$ ,  $Ni(II)$ ,  $Mn(II)$ ) conocida como la reacción de Fenton. La otra vía dará peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) por reacción del superóxido con el óxido nítrico ( $NO$ ) generado por la óxido nítrico sintasa ( $NOS$ ) que se expresa constitutivamente en ciertas células (por ejemplo neuronas y endotelio) y puede inducirse en otras. Este compuesto se combina con  $CO_2$  para producir nitrosoperoxicarbonato ( $ONOOOCO_2^{\cdot-}$ ) que finalmente origina espontáneamente óxido nítrico ( $NO_2^{\cdot}$ ), un compuesto con gran capacidad oxidante y de nitración, y radical carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ ). Por lo tanto, una vez generado el radical superóxido se producen concomitantemente diversos radicales libres.

Esta no es la única vía de producción de radicales libres ante la presencia de un tóxico. Cuando la sustancia tóxica tiene características nucleofílicas es capaz de perder un electrón generando una especie radicalaria. Estas reacciones son catalizadas frecuentemente por peroxidasas o por el citocromo P450. Una de las sustancias que sufren este tipo de procesos es el benzo[a]pireno generando radicales catiónicos que podrían ser los responsables de la carcinogenicidad de este compuesto.

Una tercera vía de generación de radicales libres es por ruptura homolítica de enlaces, en la cual se transfiere un electrón a la molécula. El tóxico modelo de este tipo de reacciones es el  $CCl_4$ , quien por transferencia de un electrón mediada por el citocromo P450 genera el radical triclorometilo ( $CCl_3^{\cdot}$ ). A partir de éste, por reacción con  $O_2$ , se forma el radical triclorometilperóxido ( $Cl_3COO^{\cdot}$ ) quien es mucho más reactivo que el anterior.

### **Interacciones de los metabolitos reactivos con componentes celulares**

Los metabolitos reactivos serán los responsables de la toxicidad en última instancia debida a un determinado xenobiótico. Los efectos tóxicos serán el resultado de interacciones que ocurren entre las especies reactivas y las moléculas o estructuras blanco presentes en las células, y la intensidad de los mismos dependerá, entre otras cosas, de las características de las moléculas blanco, de las reacciones que se producen y de los efectos que generan estas interacciones sobre las moléculas o estructuras. Cuanto más importantes sean las funciones que esas moléculas blanco desempeñan en la fisiología celular y mayores sean las alteraciones generadas sobre ellas mayores serán los efectos tóxicos. Por ello las moléculas blanco más interesantes desde el punto de vista toxicológico son las macromoléculas (ADN y proteínas) y los lípidos de membrana.

Para que estas moléculas sean susceptibles de ser afectadas por los metabolitos reactivos deben tener ciertas características como presentar centros con adecuada reactividad y configuración estérica así como estar accesibles a concentraciones altas de los metabolitos reactivos.

### **Unión a macromoléculas**

Este importante mecanismo por el cual ciertos tóxicos generan sus efectos puede darse básicamente por dos tipos de unión: *no covalente* o *covalente*.

Las interacciones no covalentes se encuentran gobernadas por interacciones de tipo hidrofóbico, puentes de hidrógeno y uniones iónicas. Este tipo de uniones se dan usualmente en los casos de interacciones de tóxicos con canales celulares y receptores intracelulares o de membrana. Un ejemplo de este tipo de interacciones es la que ocurre entre saxitoxina y los canales de sodio voltaje operado o la interacción entre el ADN y el amarillo de acridina quien se intercala en la estructura de doble hélice.

Las interacciones no covalentes son comparativamente débiles, por lo cual usualmente son reversibles. Para que puedan darse es necesario que exista un arreglo estérico en la molécula del tóxico que sea complementario con algún sitio de la macromolécula, de modo que encastran como una llave en una cerradura.

Las uniones covalentes son mucho más fuertes que las no covalentes, por lo tanto en general este tipo de interacciones entre el tóxico y las macromoléculas resultan irreversibles. Este tipo de reacciones pueden darse entre metabolitos reactivos de características radicalarias o electrofílicas y centros nucleofílicos de las macromoléculas. Tal es el caso de las reacciones que se producen sobre el grupo tiol de ciertas proteínas o la oxidación de hemoglobina a metahemoglobina.

## **Toxicología del Desarrollo**

Esta rama de la toxicología se encarga del estudio de las sustancias que alteran las distintas etapas del desarrollo de un organismo vivo en crecimiento. Las alteraciones observadas

incluyen malformaciones, alteraciones en la función, crecimiento y/o muerte del organismo. Esta variante de la toxicología se encuentra precedida históricamente por la teratología, la rama de la medicina que estudia los defectos en el momento del nacimiento.

En épocas tempranas de la teratología los primeros estudios de causa y efecto, muchos de ellos llevados a cabo en embriones de aves y huevos de anfibios por su sencillez lograron establecer una relación entre la exposición a agentes físicos (como el calor) o sustancias químicas y la aparición de defectos en el desarrollo de los embriones. La conclusión más importante fue que el tiempo en que se aplicó el daño era más importante que el tipo e intensidad del mismo, sugiriéndose que la afectación de la secuencia del desarrollo era responsable de los defectos observados.

Las condiciones ambientales tales como la presencia de toxinas microbianas, cambios en la temperatura de incubación y drogas también son capaces de alterar el desarrollo de peces, reptiles, anfibios y aves. Debido a que estos géneros animales presentaban embriones dentro de huevos muy expuestos al ambiente, se creyó que los mamíferos con su reproducción interna eran resistentes a la inducción de malformaciones. Entre las influencias externas halladas figuran las deficiencias nutricionales e infecciones uterinas. La atención a estos problemas alcanzó a los medios de comunicación cuando se presentó evidencia concluyente entre la asociación entre la talidomida (1961) y las malformaciones en recién nacidos.

## **Alteraciones del desarrollo en humanos**

Si bien no son datos manejados por el gran público la gestación exitosa en la especie humana es un evento relativamente raro. Las estimaciones de resultados adversos en la gestación establecen un 30 % de pérdidas del embarazo post implantación, defectos mayores 2 al 3 % al nacimiento alcanzando un 6 – 7 % al llegar al año de nacimiento, defectos menores 14 %, bajo peso inicial 7 %, mortalidad antes del año 1,4 % y función neurológica anormal 16 a 17 %. Con estos guarismos en consideración aproximadamente un 50 % de las concepciones humanas resultan en el nacimiento de un niño completamente normal.

Las razones atribuibles según los diversos autores varían entre un 15 al 25% de defectos de origen genético, 4 % por condiciones maternas, 3 % por infecciones maternas, 1 – 2 % por deformaciones (amputaciones de miembros por problemas mecánicos en el cordón umbilical) y aproximadamente un 1 % por químicos e influencias ambientales y un 65 % con etiología desconocida.

## **Principios básicos de la teratología**

La susceptibilidad al desarrollo anormal depende del genotipo y de la manera en que este interactúa con el ambiente.

Se ha observado desde los primeros estudios experimentales que el *background* genético de los animales de experimentación influenciaba el grado de respuesta ante la exposición a varios agentes químicos.

No se sabe exactamente como la genética y la exposición a un agente físico o químico interactúan entre sí, pero es claro que sólo una porción de individuos animales o humanos muestran un resultado adverso en el desarrollo ante una exposición comparable.

Los agentes que causan desarrollo anormal causan diferente efecto según la etapa del desarrollo y el tiempo de exposición.

El desarrollo de un embrión implica un cambio constante en el tamaño, número y posición de células así como su grado de diferenciación. Existen eventos críticos requeridos para una maduración correcta. El balance de esta cascada de eventos que conduce al crecimiento de un organismo normal puede ser sumamente susceptible a alteraciones mediadas por agentes químicos y físicos.

Por cuestiones de facilidad en su observación directa, la mayoría de los datos experimentales proviene de las alteraciones producidas durante la etapa de la organogénesis macroscópica, por ejemplo en el caso de la rata o ratones entre los 6 y 15 días mientras que en los humanos es entre los 7 y 58 días.

En el caso de algunos sistemas que son sensibles en períodos fetales y postnatales, como el nervioso, riñón, huesos y sistema reproductivo también se ha podido obtener información. En la actualidad, se cree que el embrión en desarrollo es más sensible a la inducción de malformaciones, retardos en el crecimiento y muerte durante el período de mayor organogénesis teniendo en cuenta que requieren dosis menores para producir efecto.

La exposición de cualquiera de los padres antes de la concepción también puede ayudar a producir alteraciones. Existen varios estudios mostrando la inducción de alteraciones cuando el padre ha sido expuesto a quimioterapia o mutágenos, ya que estos producen daños en el ADN de las células germinales. Los cambios observados en el embrión abarcan muerte, malformaciones, retardo en el crecimiento, déficit funcional y cáncer en la descendencia.

En la embriogénesis temprana, antes de que se implante el embrión (cigoto a blastocisto) las células se están multiplicando rápidamente y son poco diferenciadas. En esta etapa, cuando son expuestas a agentes físicos o químicos se puede producir la muerte o bien la producción de nuevas células compensa las que mueren y el desarrollo continúa con normalidad, obteniéndose como resultado final retardo en el crecimiento o malformaciones.

La formación de órganos requiere de células y estructuras más diferenciadas, aunque debe recordarse que no todos los órganos se desarrollan al mismo tiempo. La exposición durante esta etapa produce defectos estructurales significativos, retardos en la maduración, muerte y cambios funcionales después del nacimiento.

Una vez que la estructura macroscópica de un órgano se completa, continúa a nivel histológico y bioquímico. En la mayoría de los mamíferos esto ocurre en grados diversos durante el crecimiento pre y post natal. La exposición durante este período produce alteraciones histopatológicas, retardo en el crecimiento y/o cambios funcionales. Por ejemplo, la exposición a agen-

tes quimioterápicos en etapas tardías de la gestación induce defectos morfológicos en el desarrollo del cerebro. Estos cambios se traducen en alteraciones del comportamiento bien diferenciadas según el momento de la exposición.

Un agente típico que produce alteraciones en el desarrollo son las radiaciones ionizantes. Una exposición hasta 100 rads en la rata durante la etapa de pre implantación produce efectos letales sobre el embrión, pero no otros efectos. La exposición durante la organogénesis temprana (es decir días 8 a 10 en la rata) produce letalidad, retardo en el crecimiento persistente, malformaciones groseras, cataratas, neuropatología y desórdenes en el comportamiento. Si la exposición es durante el período fetal (días 13 a 22 en la rata) se produce una menor letalidad, esterilidad, cataratas, neuropatologías y anomalías citogenéticas.

Cuando se evalúan desórdenes funcionales el momento de la evaluación resulta fundamental debido a que un desorden motor en un animal joven no será aparente hasta que este comience a moverse sólo. Los efectos cognitivos son observados más fácilmente en niños cuando alcanzan la edad escolar y pueden leer, escribir y ser capaces de razonamiento complejo.

Los agentes teratogénicos actúan con mecanismos específicos sobre células y tejidos en desarrollo para iniciar embriogénesis anormales.

Con el objeto de alterar el desarrollo existen dos tipos generales de mecanismos a considerar en el caso de drogas y otros agentes. Existen mecanismos bioquímicos por los cuales se altera un sitio blanco y se altera el desarrollo, así como hay mecanismos por los cuales las células, tejidos o moléculas blanco reaccionan a la interacción inicial produciendo finalmente la patogénesis.

La lista de agentes específicos en su receptor se incrementa cada día más. Por ejemplo, el caso del dietilestilbestrol (DEB) el cual actúa como un potente agonista sintético para el receptor del estrógeno. Se demostró que afecta el desarrollo del sistema reproductivo de los hijos e hijas de mujeres tratadas con DEB para evitar partos prematuros en los 1950. En algunos casos se produce una forma rara de adenocarcinoma vaginal que se observa en las hijas de mujeres tratadas con DEB en la adolescencia tardía o al comienzo de la segunda década de vida.

Las manifestaciones finales del desarrollo anormal son la muerte, malformación, retardo madurativo y los desórdenes funcionales.

Estas cuatro manifestaciones mayores son consideradas efectos adversos mayores.

El acceso de influencias ambientales nocivas a los tejidos en desarrollo depende de la naturaleza de las influencias.

La naturaleza fisicoquímica de un agente condiciona fundamentalmente el acceso a un tejido en desarrollo. Complementariamente, el organismo de la madre con sus mecanismos homeostáticos, físicos, bioquímicos y fisiológicos determina también como y cuanto del tóxico alcanza al embrión.

Los agentes físicos tales como la radiación ionizante o el stress térmico pueden alterar directamente al embrión y modificar el desarrollo. Cuando la madre es expuesta en forma externa, la cantidad que puede alcanzar el embrión o el feto depende de los tejidos de la madre sirviendo de escudo, pero el efecto dañino sobre el feto no se ve alterado, sólo su intensidad.

El metabolismo materno puede aumentar o reducir la cantidad de los agentes químicos que alcanzan al feto. Los cambios fisiológicos de la madre durante la preñez también pueden influenciar el acceso de un químico a través de la placenta. Si bien las diferentes estructuras de las placentas existentes harían suponer que juegan un rol significativo en las diferencias de toxicidad esto no se ha visto corroborado experimentalmente. Durante la evolución de la preñez la placenta cambia su flujo de sangre y su permeabilidad a muchas sustancias. El grado de ionización, solubilidad, unión a proteínas y peso molecular de una sustancia son determinantes para cruzar la placenta.

Cualquier compuesto administrado a la madre en forma externa atravesará la placenta, convirtiéndose al concepto de "barrera placentaria" en algo sin bases reales. La capacidad del feto o del embrión de metabolizar una sustancia también influye significativamente en su acumulación / excreción. Por ejemplo, si el feto es capaz de glucuronizar una sustancia está tendrá menos tendencia a cruzar la barrera placentaria hacia la circulación materna acumulándose en el compartimento fetal.

Las manifestaciones de la alteración en el desarrollo se incrementan cuando la dosis se incrementa hasta la letalidad.

Uno de los principios básicos de la toxicología es determinar si para una sustancia existe una curva dosis-respuesta. Wilson (1973) describió las relaciones dosis-respuesta entre malformaciones, muerte embrionaria y toxicidad maternal. Así, en el caso de una sustancia que causa malformaciones, cuando la dosis se incrementa se espera que la severidad de las mismas aumente hasta alcanzar la letalidad.

## **Extrapolación de hallazgos en animales a humanos**

Se ha asumido que el hallazgo de efectos adversos en animales implica un riesgo potencial inaceptable en humanos. Los autores que han realizado una revisión sobre el tema han concluido que aunque los datos son en realidad limitados, esta suposición es generalmente correcta. También resulta claro que un efecto determinado sobre un blanco específico no se observa entre diferentes especies. La conclusión es la misma aún si se observa efecto sobre una estructura anatómica que no existe en los humanos.

## **Sustancias Tipo**

### **Talidomida**

En 1960 se comenzó a registrar un aumento anormal y continuo en la aparición de malformaciones de los miembros en Alemania del Oeste. El defecto consistía en amelia (ausencia de miembros) o focomelia (alteraciones en la longitud de los miembros, especialmente los brazos). También se registraron casos de enfermedad cardíaca, intestinal y renal. En 1961, Lenz y

McBride, trabajando en forma independiente lograron identificar al sedante talidomida como sustancia responsable.

La talidomida se introdujo en 1956 como un sedante suave y un anti náuseoso durante el embarazo. Una vez establecido su rol en las malformaciones se retiró del mercado en 1961 y los casos dejaron de aparecer a fines de 1962.

La catástrofe de la talidomida provocó que las agencias regulatorias de muchos países comenzarán a desarrollar pruebas en animales como requisito previo para aprobar productos de uso humano. Las pruebas realizadas en diversos laboratorios demostraron como una sustancia puede ser totalmente inocua en algunos animales de experimentación como el hámster o la mayoría de las especies de ratones. La sensibilidad humana fue estimada en el orden de 1 mg/kg.

Los estudios establecieron que la talidomida induce malformaciones cuando la mujer ingiere la sustancia entre los 20 y 36 días después de la fertilización. Cuando se estudian los defectos según el tiempo de ingestión en ese período se observa que con la ingestión más temprana el defecto más común fue la anotia (sin oídos), seguido por la falta de pulgares, extremidades superiores, inferiores y pulgar con tres falanges (en vez de dos).

Se dedicaron intensos esfuerzos a comprender la relación estructura – especie, y si bien se encontró que la presencia de un grupo ftalimida o ftalimidina era un requisito absoluto no se logró consensuar ningún mecanismo particular para un especie. Las hipótesis más recientes involucran a una alteración en la angiogénesis, es decir en el desarrollo de los vasos sanguíneos de la extremidad del miembro en crecimiento.

La diferencia inter especies mejor comprendida es aquella observada entre conejo (sensible) y rata (insensible). El mecanismo propuesto es que la talidomida produce generación de radicales libre en la especie sensible, como puede observarse en la disminución de glutatión en la madre y el embrión.

Se demostró que el cambio en el potencial redox reduce la unión a un factor de transcripción NF- $\kappa$ B a sus sitios de unión en el ADN. Esta unión es necesaria para activar la expresión de los genes *twist* y *FGF-10* en el mesénquima del miembro en desarrollo. La implicación del daño oxidativo al ADN se refuerza por el hecho de que la administración de PBN (alfa – fenil – N – t –butilnitrona), un conocido scavenger de radicales libres prácticamente evita la aparición de efectos tóxicos y teratogénicos.

## **Etano**

La historia del etanol en la toxicología es tan antigua como la descripción de sus efectos en las obras escritas de las antiguas civilizaciones. En lo que respecta a su influencia en el desarrollo fetal se aceptó oficialmente su importancia en 1973 cuando el Síndrome Fetal Alcohólico (S.F.A) fue reconocido como una entidad. El S.F.A produce dimorfismo craneo-facial, retardo en el crecimiento intrauterino y post natal y otras anormalidades inespecíficas. Se ha observado una notoria disminución en el C.I (alrededor de 68) sin cambios a lo largo de su vida.

Las alteraciones craneofaciales pueden ser en parte debido a interferencias con el metabolismo del retinol en el embrión temprano. La oxidación del retinol a ácido retinoico lo transforma



en una molécula señaladora el cual es esencial para el desarrollo del embrión. La estimación de la cantidad de etanol consumido por la madre para que se observen las principales características del S.F.A es de 100 a 120 cm<sup>3</sup>, siendo más significativa la cantidad de veces que la madre ingiere en una sesión de bebida que la cantidad total en sí.

### **Humo del Tabaco**

A pesar de los programas de difusión sobre los efectos de fumar durante el embarazo un número importante de mujeres persiste en el hábito. Las consecuencias están bien demostradas e incluyen muerte fetal, bajo peso al nacer, riesgo alto de muerte súbita, desórdenes de atención y comportamiento.

El hábito de fumar durante el embarazo se ha correlacionado con la aparición de labio leporino. Las madres fumadoras portadoras de los alelos N053, ICAM1 y/o NPPA pueden tener un alto riesgo de tener descendencia con gastroquisis (defecto de la pared abdominal en el cual los intestinos y otros órganos se desarrollan fuera del abdomen del feto a través de una apertura de la pared abdominal, casi siempre a la derecha del cordón umbilical).

Un componente del humo del tabaco, la nicotina, es un neuroteratógeno en animales de laboratorio y puede producir por sí misma muchos de los efectos adversos del humo del tabaco. La inhalación pasiva es equivalente en dosis a un fumador leve y la madre no fumadora debe evitarlo.

### **Uso de sistemas in vitro en Teratología**

El término "in vitro" se utiliza a cualquier sistema de estudio que no sea el animal grávido. Un ejemplo lo constituyen los embriones enteros de mamíferos o no-mamíferos en cultivo, incluyendo células, tejidos y órganos en cultivo. Estos sistemas permiten aislar al embrión de la influencia materna, seguir órganos o grupos de células específicas o bien alterarlas.

Los sistemas in vitro se han utilizado para dos grandes grupos de aplicaciones en teratología y toxicología del desarrollo: 1) el screening de compuestos tóxicos y 2) el estudio de los mecanismos de las alteraciones.

Aunque el uso de sistemas in vitro para estudios mecanísticos es ventajoso su uso en el screening de agentes teratogénicos es extremadamente limitado. Esto se debe a deficiencias en el sistema de prueba: el aislamiento del embrión sólo es viable durante algunos pocos días y aislarlo de la madre implica que los efectos protectores o de toxicidad sobre la madre no están presentes. Esto implica que deben testarse las sustancias investigadas sobre embriones en cada etapa de diferenciación. Un ensayo típico es el ensayo sobre huevos de pollo fértiles.

El ensayo del embrión de pocos días es un bioensayo de corto tiempo (menos de 5 días) utilizado para el análisis de efectos teratogénicos. El ensayo consiste en exponer los huevos al contaminante desde el inicio de la incubación, ya sea vía exposición maternal o por inyección dentro de la clara o el saco de aire.

Luego de un plazo estandarizado de incubación, los embriones son evaluados para anomalías sobre el crecimiento como anomalías groseras (falta de miembros). Los tiempos de recolección están basados en la experiencia que muestra que los efectos son más notables en el crecimiento en etapas incipientes.

Para el 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina y bifenilos policlorados los tiempos óptimos de incubación son 48, 72 y 96 hs. Al interrumpirse la incubación, el embrión es sacrificado por fijación con formalina al 10 %. El embrión es evaluado mediante el sistema de scoring de Hamburger y Hamilton y comparándolo con los controles.

## **Bibliografía**

Ballantyne B. and Marrs T. (1999). General and Applied Toxicology, 3 ed., Syversen. Groves Dictionaries INC.

Gregous, Z. and Klaasen, C. Chapter 3. (2001). Mechanisms of Toxicity en: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th edition (2001) by Curtis D. Klaassen (Editor) By McGraw-Hill Professional.

Kavlock, R. (2001). Chapter 10. Developmental Toxicology en: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th edition by Curtis D. Klaassen (Editor) By McGraw-Hill Professional.