

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino†

El aporte de la toxicología experimental a la evaluación de riesgo tóxico y el desarrollo de tratamientos para las intoxicaciones

► Gerardo Daniel Castro^{1ab*}

¹ Doctor en Ciencias Químicas.

^a Departamento de Investigaciones en Bioseguridad y Toxicología. Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF). Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires.

^b Escuela de Hábitat y Sostenibilidad. Universidad Nacional de San Martín. San Martín, Provincia de Buenos Aires. Argentina.

* Autor para correspondencia.

Resumen

Las intoxicaciones, cualquiera sea su origen, suponen la alteración de la fisiología celular, lo que a su vez dará comienzo a procesos que afectan la función de órganos o sistemas, comprometiendo la vida en alguna medida. La definición moderna de la toxicología es clara y esencialmente abarca lo anterior más el concepto de riesgo tóxico (probabilidad). En este laboratorio se han estudiado varias sustancias tóxicas actuando sobre distintos sitios blancos del organismo. Han sido moléculas con distintas características físico-químicas, usos y vías de exposición variadas y consecuencias deletéreas sobre órganos y funciones vitales diferentes. Esto permitió encarar con éxito el estudio de cada caso; fue la aplicación de esas “reglas básicas” de los mecanismos del daño celular aprendidas desde los sistemas modelo, que se tradujeron en algunas ocasiones en aportes de utilidad hacia la prevención o los tratamientos. En esta revisión se analizan en particular dos casos que ilustran muy bien la necesidad de comprender en profundidad el mecanismo de la acción tóxica: el desarrollo de tratamientos para el síndrome agudo por radiación y la toxicidad reproductiva del alcohol. El conocimiento generado también brindó la posibilidad de formar recursos humanos y de contribuir a la resolución de problemas concretos cuando el país lo necesitó. Esto responde a una consideración conceptual que trasciende a la toxicología, por supuesto: en la medida en que se comprenda lo fundamental, tanto más llano será el camino hacia lo particular.

Palabras clave: Mecanismos de toxicidad; Evaluación de riesgo; Estrés oxidativo

The contribution of experimental toxicology to toxic risk assessment and the development of poisoning treatment

Abstract

Poisoning, whatever its origin, involves the alteration of cellular physiology, which in turn will start processes that affect the function of organs or systems, compromising life to some extent. The modern definition of toxicology is clear and essentially encompasses the above plus the concept of toxic

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

risk (probability). In our laboratory, several toxic substances acting on different target sites of the organism have been studied. These have been molecules with different physical-chemical characteristics, varied uses and routes of exposure, and deleterious consequences on different vital organs and functions. What made it possible to successfully face the study of each case was the application of these “basic rules” of the mechanisms of cell damage learned from model systems, sometimes translating into useful contributions towards prevention or treatment. In this review, two cases are analysed in particular, which illustrate very well the need to understand in depth the mechanism of toxic action: the development of treatments for acute radiation syndrome and reproductive toxicity of alcohol. The knowledge generated also provided the possibility of training human resources and contributing to the resolution of specific problems when the country needed it. This responds to a conceptual consideration that transcends toxicology, indeed: the more the fundamental is understood, the smoother the path to the particular will be.

Keywords: *Mechanisms of toxicity; Risk assessment; Oxidative stress*

A contribuição da toxicologia experimental para a avaliação do risco tóxico e o desenvolvimento de tratamentos para intoxicações

Resumo

A intoxicação, seja qual for sua origem, envolve a alteração da fisiologia celular, que por sua vez iniciará processos que afetam a função de órgãos ou sistemas, comprometendo até certo ponto a vida. A definição moderna de toxicologia é clara e engloba essencialmente o que precede mais o conceito de risco (probabilidade) tóxico. Em nosso laboratório, várias substâncias tóxicas que atuam em diferentes sítios-alvo do organismo têm sido estudadas. Têm sido moléculas com características físico-químicas diferentes, usos e vias de exposição variados e consequências deletérias em diferentes órgãos e funções vitais. O que nos permitiu enfrentar com sucesso o estudo de cada caso foi a aplicação dessas “regras básicas” dos mecanismos de dano celular aprendidos com os sistemas modelo, traduzindo-se por vezes em contribuições úteis para a prevenção ou tratamento. Nesta revisão, são analisados dois casos em particular que ilustram muito bem a necessidade de compreender em profundidade o mecanismo de ação tóxica: o desenvolvimento de tratamentos para a síndrome aguda por radiação e a toxicidade reprodutiva do álcool. O conhecimento gerado também proporcionou a possibilidade de formar recursos humanos e contribuir para a resolução de problemas específicos quando o país o precisou. Isso responde a uma consideração conceitual que transcende a toxicologia, é claro: na medida em que o fundamental for compreendido, mais suave será o caminho para o particular.

Palavras-chave: *Mecanismos de toxicidade; Avaliação de risco; Estresse oxidativo*

Introducción

Haciendo foco en la comprensión de las “interacciones nocivas entre las sustancias químicas y los seres vivos”, se podrá dar cuenta de que la Toxicología como ciencia fue evolucionando desde lo meramente descriptivo en síntomas y dosis hacia la profundización del conocimiento sobre qué es lo que sucede cuando una sustancia extraña se introduce en un organismo (un “xenobiótico”) y de todos los caminos que van llevando al efecto tóxico. Esto, en pocas palabras, es lo que constituye el mecanismo de su acción tóxica.

En la actualidad, mucho es el conocimiento acumulado sobre las interacciones entre los tóxicos y los sitios blancos que son críticos para la función y viabilidad celular y, en última instancia, críticos para el organismo entero. Aún así, también es mucho lo que no se sabe: sustancias nuevas, exposiciones nuevas, el problema de

las mezclas de sustancias, los condicionamientos que impone el entorno biológico y, lo más importante, la interacción de todos estos factores modulando el efecto tóxico que revela la patología en cuestión.

Las implicancias prácticas de este conocimiento (o de la necesidad de obtenerlo) son enormes y alcanzan a muchos campos de la vida humana: alimentación, salud, trabajo, ambiente humano. La toxicología regulatoria (aquella que en cada ámbito fija los límites de una exposición segura mediante normas) se nutre de la información generada desde la investigación experimental y desde la epidemiología. Estas dos a su vez requieren de la comprensión, lo más certera posible, de qué es lo que el tóxico hace y cómo eso puede variar en función de otras variables.

La relevancia de este conocimiento sobre una sustancia potencialmente tóxica puede visualizarse en ámbitos tan diversos como el folleto que acompaña a un

medicamento, en las regulaciones sobre el uso de aditivos alimentarios, en las tolerancias para contaminantes en atmósferas laborales o en los límites permitidos para residuos de plaguicidas en distintas matrices o de contaminantes naturales en aguas y suelos.

La variedad de tóxicos y de situaciones de exposición reales muestran claramente por qué es necesario entender en profundidad el mecanismo de la acción tóxica: metales pesados, plaguicidas, fármacos o sustancias naturales, todos son más o menos tóxicos sobre algún sitio blanco del organismo en determinada circunstancia, y la relación no es casual sino causal.

Hay razones por las cuales el daño sucede de algún modo determinado y en algún sitio y no en otro. La ecuación riesgo-beneficio para la exposición humana a una sustancia química no es estática, sino que variará en la medida en que mayor sea la comprensión del caso.

En este laboratorio se han estudiado varias sustancias tóxicas que actúan sobre distintos sitios blancos del organismo. Han sido moléculas muy diferentes, con distintas características fisicoquímicas, usos y vías de exposición variados y consecuencias deletéreas sobre órganos y funciones vitales diferentes (1) (2) (3) (4) (5) (6). Lo que permitió encarar con éxito el estudio de cada caso fue la aplicación de esas "reglas básicas" de los mecanismos del daño celular aprendidas desde los sistemas modelo, que se tradujo en algunas ocasiones en aportes de utilidad hacia la prevención o los tratamientos. El conocimiento generado también posibilitó la formación de recursos humanos y contribuir a la resolución de problemas concretos cuando el país lo necesitó (7) (8) (9).

El estudio de los mecanismos de la acción tóxica de las sustancias constituye un campo apasionante para la investigación mal llamada "básica" y es lo que se pretende ilustrar en este trabajo, con dos ejemplos que se desarrollan a continuación.

Síndrome agudo por radiación: una patología toxicológica con múltiples blancos

El síndrome agudo por radiación (SAR), también conocido como toxicidad por radiación o enfermedad por radiación, es un nombre que se usa para describir una enfermedad aguda causada por la irradiación de todo el cuerpo (o de una porción significativa del cuerpo) por una dosis alta de radiación penetrante administrada a una tasa de dosis alta (generalmente en unos minutos). La causa principal de este síndrome es el agotamiento de las células madre parenquimatosas inmaduras en tejidos específicos. El SAR puede subdividirse en tres subsíndromes: el síndrome hematopoyético, el gastrointestinal y el neurovascular, pero muchos otros tejidos pueden dañarse también. Tanto en seres humanos como en modelos animales experimentales, el curso temporal y la gravedad de los signos y síntomas

clínicos son una función del volumen corporal total irradiado, la falta de homogeneidad de la exposición a la dosis, el tipo de partícula, la dosis absorbida y la tasa de dosis (6).

El síndrome hematopoyético es causado por la destrucción de la médula ósea, lo que resulta en un agotamiento severo de los leucocitos, infección y hemorragia. Esta es la primera expresión de la toxicidad de la radiación ionizante porque las células de la médula ósea son extremadamente sensibles a este tipo de daño oxidativo.

El síndrome gastrointestinal ocurre a dosis de entre 6 y 15 Gy. Los signos y síntomas clínicos se deben a la falta de reemplazo de células en la superficie de las vellosidades porque las células madre y proliferantes ubicadas en las criptas son dañadas por la radiación y mueren en la mitosis. La destrucción de la mucosa intestinal produce diarrea acuosa, deshidratación y pérdida de electrolitos, sangrado gastrointestinal y perforación. La descomposición de la barrera mucosa facilita la entrada de bacterias en el torrente sanguíneo. La inmunodepresión severa asociada con el síndrome hematopoyético favorece las infecciones oportunistas y la trombocitopenia favorece la hemorragia. La muerte por el síndrome gastrointestinal se debe a sepsis, sangrado, deshidratación e insuficiencia orgánica multisistémica (6).

A dosis más altas, el daño también puede expresarse a nivel cardiovascular y en el sistema nervioso central. Sin embargo, es importante tener en cuenta que cualquiera de estos subsíndromes puede ser la causa de la mortalidad, aunque la probabilidad de un tratamiento efectivo es mayor cuanto menor es la dosis y, por lo tanto, los blancos involucrados.

Independientemente de la fuente, la exposición a la radiación ionizante (rayos X o rayos gamma) tendrá consecuencias graves y generalmente irreversibles. Estas se originan en la transferencia de la energía radiante a las moléculas celulares, lo que provoca su ionización. El agua corporal, debido a su abundancia, es el blanco principal de la radiación, pero el ADN, el ARN, las proteínas y los lípidos celulares también son muy susceptibles. En la fracción de milisegundos, todas las reacciones de los radicales libres generados por el agua ya están completadas. A partir de ese momento y en diferentes tiempos, se habrán completado todos los procesos bioquímicos que conducen al daño celular. Durante estos procesos se generan especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y también nitrogenadas (posinducción de la enzima óxido nítrico sintetasa) (10). Estas moléculas reactivas atacan componentes celulares críticos como el ADN, proteínas, lípidos, etc. En el curso de estas interacciones también se producen radicales libres en las macromoléculas, lo que conduce a su degradación. Un claro ejemplo es la formación de 4-hidroxinonenal a partir de los lípidos. Este compuesto se considera el responsable principal de

los daños causados por la peroxidación lipídica mediada por ROS (10) (11). La acción combinada de todos estos productos derivados de la acción de la radiación conduce a la muerte celular en diferentes tejidos. Si el daño no es lo suficientemente intenso, en cualquier caso muchas de estas alteraciones moleculares pueden conducir, en tiempos más largos, a otras patologías (por ejemplo, mutaciones en el ADN y el cáncer).

Terapéutica radioprotectora: efectividad *versus* toxicidad

Desde hace décadas se han sintetizado compuestos con capacidad radioprotectora o mitigante de los efectos de la radiación ionizante. Desde el fin de la segunda guerra mundial, en los Estados Unidos se desarrolló un programa de síntesis de sustancias y prueba de su eficacia radioprotectora. Se llevó a cabo una gran cantidad de estudios preclínicos e incluso clínicos, incluyendo el uso de algunos de estos compuestos en radioterapia contra el cáncer, intoxicaciones, emergencias militares y exposiciones durante vuelos espaciales (12). De esos estudios, la amifostina (WR-2721) surgió como un radioprotector de eficacia aceptable. Este compuesto también encontró aplicaciones radioterapéuticas en la clínica del cáncer, por tener selectividad en su efecto con respecto al tejido tumoral (13) (14) (15) (16).

A pesar de estas cualidades interesantes, está lejos de ser un radioprotector ideal debido a su toxicidad (17). Esto llevó a la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) a aprobar su uso limitado en pacientes expuestos a radioterapia en dosis altas después de la cirugía para los cánceres de cabeza y cuello y para prevenir la xerostomía (18) (19). La amifostina solo está aprobada para su administración intravenosa, aunque algunos la han usado por vía subcutánea (20). Este medicamento tiene una liposolubilidad muy baja y en el pH del estómago su carga iónica positiva hace que sea muy difícil de absorber por vía oral (21) (22). Por otro lado, un radioprotector ideal debería mantener su efecto durante un tiempo razonablemente largo y esto implica que su toxicidad debería ser baja. El uso de WR-2721 en humanos tiene algunos efectos adversos importantes. Dado que la dosis efectiva de amifostina difiere poco de su dosis tóxica, los pacientes con frecuencia presentan efectos adversos que incluyen hipocalcemia, diarrea, náuseas y vómitos. Algunos de esos síntomas también son típicos de la exposición a la radiación ionizante. Además, otros síntomas son la emesis, hipotensión y alergias (22). La existencia de estos efectos adversos impide su administración repetida para lograr un efecto protector sostenido. Lo deseable en un radioprotector es que proteja la mayoría de los órganos expuestos. La amifostina protege una amplia variedad de sitios en el organismo afectado si se la administra poco tiempo antes de la exposición a la radiación, pero

mucho menos o nada cuando se administra después de la exposición (23). Solo cuando este medicamento está presente en el momento de la irradiación es capaz de reducir la mortalidad de una manera muy significativa. Incluso fue capaz de proteger las células normales y no las cancerosas después de la radioterapia. Esta virtud le ha dado aplicaciones extendidas y útiles en la clínica de oncología (20).

El mecanismo de la acción radioprotectora de la amifostina está relacionado básicamente con su capacidad para atrapar radicales libres, para destruir algunos productos muy reactivos que se forman a partir de moléculas biológicas alteradas, como lípidos y proteínas, a través de la donación de hidrógeno, o al reaccionar con ellos, como es el caso con el 4-hidroxinonenal (11). Esta capacidad depende de su conversión previa por desfosforilación enzimática a su metabolito activo, el WR-1065. Este proceso está mediado por una fosfatasa alcalina presente en las células de distintos órganos y en el suero de diferentes especies y el ser humano (20) (24). Este proceso de activación es muy rápido, pero aún así debe ocurrir antes de la irradiación, para tener el metabolito sulfhidrílico en concentración suficiente cuando se generan los radicales libres de una vida tan corta.

La amifostina también tiene algún efecto protector cuando se administra después de la exposición a la radiación ionizante. Este aspecto fue menos estudiado y su relevancia no ha sido establecida (23). El hecho de que la acción protectora de la amifostina requiera la activación previa de su metabolito sulfhidrílico mediado por la enzima, es crítico y se supone que está relacionado con su utilidad en oncología clínica. Se ha demostrado que la amifostina protege el tejido normal que rodea al canceroso porque este último tiene un pH más ácido (efecto Warburg).

En consecuencia, se vuelve muy importante el desarrollo de nuevos radioprotectores o fórmulas de ellos que actúen previniendo o mitigando los efectos nocivos de una exposición. Esto incluye todos los ensayos necesarios para la aprobación de su uso en humanos. Este problema y el ensayo de una terapia coadyuvante con otros compuestos no tóxicos se informaron ampliamente en la literatura científica (25). La estrategia de algunos estudios fue aprovechar la capacidad radioprotectora de la amifostina administrada en una sola dosis baja antes de la radiación y continuar con otras sustancias de baja toxicidad que reforzarían el efecto protector inicial. Parece claro que apenas una sola sustancia pueda bloquear o mitigar los efectos nocivos agudos de la radiación ionizante y que es más factible utilizar formulaciones donde cada componente aporte propiedades que son cooperativas o complementarias. Esto implica ensayos para los nuevos componentes con características muy diferentes en su potencial terapéutico y que, si son efectivos, deberían estudiarse debido a su compatibilidad con los existentes.

Aportes de nuestras investigaciones al desarrollo de radioprotectores

La toxicología puede aportar mucho para la terapéutica del síndrome y también para el biomonitoreo de la exposición a las radiaciones y de los efectos tempranos que se desencadenan. Esto se debe a que el problema en cuestión es esencialmente una intoxicación, aunque también es cierto, con características que la hacen muy difícil de diagnosticar y tratar. En este laboratorio se han ensayado diferentes sustancias con el propósito de diseñar fórmulas en combinación con la amifostina, que preserven la eficacia radioprotectora, pero sin aumentar la toxicidad. Para lograr este objetivo, se seleccionaron compuestos naturales o sus derivados que podrían administrarse conjuntamente con amifostina o luego de la exposición. Este último es un aspecto de particular relevancia, ya que cualquier terapia que pueda mitigar algunos de los efectos nocivos causados por la radiación ionizante contribuirá a mejorar la supervivencia y porque la amifostina ya no es útil para este propósito.

El objetivo de un tratamiento radioprotector ideal está aún lejos de alcanzarse. Se pueden identificar varias causas para explicar la dificultad para lograrlo. En primer lugar, la naturaleza del proceso tóxico del síndrome, muy intenso y con varios órganos críticos afectados, dificulta la elección de sustancias radioprotectoras que puedan alcanzar concentraciones efectivas en tiempos cortos. Por ejemplo, muchos compuestos conocidos por su capacidad antioxidante y su eficacia para reaccionar con los radicales libres no fueron efectivos cuando se ensayaron *in vivo* (25) (26) (27) (28) (29). Detrás de esto pueden encontrarse razones tales como una pobre biodisponibilidad, una vía de administración inadecuada (pero condicionada por la droga), inestabilidad en los medios biológicos y, por supuesto, la propia toxicidad. En segundo lugar, que el efecto radioprotector ideal debe mantenerse durante un tiempo después de la exposición. Esto a su vez está vinculado con dos aspectos: la contención de los procesos de daño celular que siguen a la acción de los radicales libres y la reparación de las estructuras y funciones celulares afectadas. Esta etapa, que en la terapéutica de protección radiológica se denomina mitigación del daño, tampoco es fácil porque existen varios procesos nocivos críticos en curso que condicionan la supervivencia.

En este laboratorio se ensayaron distintas sustancias y productos naturales para determinar su potencial radioprotector, por separado o constituyendo mezclas con amifostina. Varios de esos ensayos fallaron, ilustrando lo que se mencionó anteriormente. Las sustancias que son atraparoras eficientes de radicales libres *in vitro* no pudieron mejorar la supervivencia, aún administradas antes de la irradiación (26) (27) (28) (29) (30). Otras, con capacidad mitigante conocida contra los efectos nocivos que muchas sustancias tóxicas comparten con

la radiación ionizante, revelaron toxicidad *per se*, algo que es indeseable particularmente en aquellos órganos más afectados por la radiación (por ejemplo, agentes quelantes de calcio y el daño sobre el epitelio intestinal) (31). Dos de los tratamientos probados fueron exitosos y prometedores, y comparten características que son obviamente críticas para la eficacia terapéutica, esto es, una toxicidad muy baja, una buena biodisponibilidad y la capacidad para mitigar el síndrome gastrointestinal debido a sus propiedades antibióticas. Éste parece ser un paso crítico en el desarrollo del SAR, al dar tiempo para la recuperación de la capacidad inmunogénica de la médula ósea. Fue así que, tanto el piruvato de etilo como el butirato de sodio, pudieron cooperar con la acción radioprotectora de una dosis baja de amifostina para mejorar significativamente la supervivencia frente a dosis importantes de radiación.

En estos estudios experimentales pudo verificarse que la administración de amifostina en dosis bajas y junto con el piruvato de etilo disminuyó la toxicidad manteniendo su eficacia (32). El piruvato de etilo es un compuesto con muy baja toxicidad, que mostró capacidad para impedir de modo significativo el daño sobre el ADN que evidencia el ensayo Cometa, así como el daño por estrés oxidativo (32). Este tratamiento resultó en una protección de los eritrocitos en ambos sexos. El daño genético disminuyó significativamente por el tratamiento con piruvato de etilo solo o combinado con amifostina, y en las ratas hembras se observó una mayor supervivencia solo con el tratamiento combinado. En resumen, el piruvato de etilo mostró una acción radioprotectora significativa, que podría mejorarse aumentando la dosis o el tiempo de tratamiento, ya que tiene muy baja toxicidad. El piruvato de etilo también es un atrapador de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que tiene algunas propiedades que pueden compensar problemas y limitaciones del uso de la amifostina como radioprotector. Es una sustancia que puede administrarse por distintas vías, tiene muy baja toxicidad, lo que permite su administración repetida durante períodos de tiempo más largos en relación con la supervivencia que se busca determinar luego de una exposición a dosis importantes de radiación ionizante. Por otra parte, el piruvato de etilo mostró ser un protector eficaz para una variedad amplia de patologías y particularmente beneficioso en el manejo de los modelos animales de sepsis y procesos inflamatorios. Justamente, los procesos inflamatorios severos y los daños en las células de las criptas intestinales que se observan posteriormente a la exposición a las radiaciones ionizantes son muy relevantes en sus efectos letales. Debido a su solubilidad en medios hidro y lipofílicos y rápida absorción, el piruvato de etilo puede llegar a todos los tejidos fácilmente y así ejercer su acción protectora, incluso al sistema nervioso central (32). No obstante, se concluyó que no era posible prevenir todos los efectos tóxi-

cos de las radiaciones con la combinación de estos dos compuestos, lo cual se hizo evidente con los estudios de supervivencia en los animales expuestos y tratados. Esto sugería claramente que es conveniente desarrollar *cocktails* integrados por sustancias compatibles entre sí y que aporten propiedades protectoras atendiendo a los distintos aspectos del proceso que conduce al daño.

En el colon, los ácidos grasos de cadena corta son productos de la degradación bacteriana del almidón no absorbido y del polisacárido (fibra) que no contiene almidón. Son moléculas importantes en la luz colónica, que afectan tanto a la morfología como a la función de los colonocitos. Los estudios experimentales en animales han demostrado que promueven respuestas adaptativas a la resección del intestino delgado y a la anastomosis colónica. En particular, se ha demostrado que el butirato es el sustrato de energía preferido para el colonocito y que es un agente de diferenciación potente en el cultivo celular. El anión butirato también puede tener un papel en la prevención de ciertos tipos de colitis (33). El síndrome agudo por radiación involucre, entre otros blancos, la médula ósea y los epitelios gastrointestinales. La combinación de una falla en el sistema inmune con una alteración de la absorción de nutrientes y la permeabilidad a las bacterias lleva a un cuadro agudo que es causa de una mortalidad elevada. En tal sentido, se consideró que el anión butirato podría constituir un agente mitigante efectivo para reducir el impacto tóxico.

El tratamiento con amifostina combinada con butirato de sodio resultó efectivo para la recuperación del número de eritrocitos, con valores comparables a los de los controles a partir del mes en las hembras y más adelante en el caso de los machos (33). El tratamiento, sin embargo, no fue capaz de impedir la disminución violenta que las radiaciones produjeron sobre el número total de leucocitos en los primeros días. A pesar de esto, permitió la supervivencia y la lenta recuperación de los niveles leucocitarios hasta alcanzar los valores del control a los 21 días en machos y 28 días en hembras. Respecto a la fórmula leucocitaria relativa, en ambos sexos pudo observarse una recuperación completa en los sobrevivientes al día sesenta (33). El tratamiento combinado también logró mejorar significativamente la supervivencia en ambos sexos. También se consideró importante estudiar el comportamiento del tratamiento sobre la variación de peso de los animales de ambos sexos por posibles interacciones adversas o favorables, teniendo en cuenta que las mismas radiaciones ionizantes afectan severamente el peso corporal. En las hembras, el tratamiento con amifostina y butirato de sodio logró compensar la pérdida de peso a partir de los 20 días posteriores a la irradiación mientras que los machos pudieron recuperarse antes (a partir del día 9). Es probable que estas variaciones en el peso se deban a varios factores: la malabsorción provocada por el daño

en el epitelio intestinal, el decaimiento general de la salud de los animales, la pérdida de fluidos por diarrea y el efecto protector del tratamiento. En particular, fue notoria la ausencia de diarrea en los animales tratados, lo que puede relacionarse con el efecto protector del butirato, sumado al hecho que esta sustancia aporta calorías útiles en una forma rápidamente absorbible. Los resultados muestran que el tratamiento combinado de amifostina con butirato de sodio logró recuperar el número de criptas de modo significativo en ambos sexos, aunque sin alcanzar los valores del control. Por otra parte, las alteraciones histológicas observadas y descritas también por otros autores (como la menor altura de las vellosidades, el edema o el daño vascular) también fueron reducidas por el tratamiento, como pudo observarse en los especímenes tomados de los animales sobrevivientes a sesenta días (33).

Más allá de la efectividad de cada uno de estos compuestos para prevenir o mitigar los efectos nocivos agudos de la radiación ionizante, parece claro que apenas una sola sustancia pueda lograrlo y que entonces sea más conveniente el uso de fórmulas cuyos componentes provean propiedades cooperativas o complementarias (25) (34) (35). Esto no solamente permite abordar el problema desde diferentes aspectos de la patología, sino que en la práctica puede significar una disminución en la dosis de cada uno, si es que tienen alguna toxicidad. Nuestros estudios de protección radiológica han buscado desarrollar tratamientos que reducen o previenen los daños observados, a pesar de que en la experiencia humana para dosis entre 1 y 6 Gy el pronóstico de recuperación es razonablemente bueno (36).

Todo el personal involucrado en la contención de un incidente radiológico debe tener una alternativa terapéutica temprana para la exposición eventual a dosis relevantes de radiación ionizante. En este sentido, es obvio que la baja toxicidad del tratamiento es crucial para no causar un problema adicional al que se pretende resolver (25).

En la hipótesis de este trabajo se consideró relevante desarrollar y profundizar estudios relacionados con el uso conjunto de amifostina con adyuvantes frente a situaciones de exposición aguda a la radiación ionizante. El objetivo fue identificar y caracterizar moléculas naturales (o sus derivados) con muy baja toxicidad, lo que permite reducir sustancialmente la dosis de amifostina como radioprotector (o eventualmente reemplazarla por completo) y continuar con una terapia de mitigación. Estos tratamientos tienen un alto potencial de transferencia a la clínica debido a su baja toxicidad, lo que facilitará la aprobación para su uso en seres humanos (6).

Es mucho lo que queda por hacer en el campo de la radioprotección para el síndrome agudo por radiación. El gran desafío será encontrar una o varias sustancias con baja toxicidad que puedan resultar eficaces durante

una brevísima ventana de tiempo que sigue al comienzo de la irradiación, ya que ni la amifostina resulta útil en tal situación. La terapia mitigante ofrece, en cambio, más posibilidades de éxito, como bien lo demuestran los resultados de este laboratorio.

El hábito de beber y el alcohol como un tóxico reproductivo

Las consecuencias para la salud derivadas del consumo de alcohol son un problema de relevancia creciente a nivel mundial (37) (38). El alcohol (etanol) es una sustancia compleja cuando se la analiza como tóxico. No es solamente su acción *per se* lo que debe considerarse sino también las interacciones con otras sustancias y factores en dos aspectos principales: su capacidad como inductor del metabolismo de otros tóxicos y como una fuente de calorías, con las modificaciones metabólicas que esto implica.

La toxicidad del etanol se debe fundamentalmente a sus productos de biotransformación, el acetaldehído y distintos tipos de radicales libres, que provocan estrés oxidativo (39) (40). Dado que el acetaldehído y los radicales libres son especies altamente reactivas, es importante considerar que, si se generan en un tejido determinado, pueden causar toxicidad *in situ*. Es probable que la oxidación del etanol a acetaldehído (y a radicales libres) proceda a través de una variedad de vías enzimáticas y se demostró que esto ocurre en diferentes tejidos, incluidos los del sistema reproductivo de ambos sexos. En este caso, las vías metabólicas involucradas no incluyen necesariamente las mismas enzimas que oxidan el etanol en el hígado (39) (41). Pudo demostrarse la existencia de varias vías capaces de generar tanto acetaldehído como radicales libres en esos tejidos (3) (4). La relación entre la capacidad de generar metabolitos tóxicos y la de destruirlos es muy importante pero muy variable y dependiente del sitio del cuerpo. En todos los tejidos estudiados, la exposición al alcohol provocó un proceso de estrés oxidativo, vinculado con la generación de especies prooxidantes. Estos tejidos no cuentan con mecanismos eficientes para la desintoxicación del acetaldehído generado *in situ* o que llega a ellos a través de la sangre. Esto puede conducir a una acumulación duradera de este metabolito que, al disminuir el contenido de glutatión, reduciría la capacidad del tejido para desintoxicar tanto el acetaldehído como las especies reactivas del oxígeno (4).

El etanol es un producto químico con la capacidad de modificar el metabolismo de otros xenobióticos y el contenido de sustancias endógenas como las hormonas (42) (43). Los órganos como los que constituyen el sistema reproductivo en ambos sexos pueden entonces afectarse por la exposición al alcohol de una manera indirecta, cuando existe la exposición a otras sustancias tóxicas en el ambiente, y cuando los niveles de hormo-

nas críticos para el desarrollo y la función de estos órganos pueden cambiar (43) (44).

Por ejemplo, muchos carcinógenos que generan la forma final mutagénica por bioactivación verán incrementada su eficiencia en una situación de coexposición con el etanol (45). El hábito de fumar provee muchos carcinógenos que se activan por metabolismos inducibles por el alcohol. Sin embargo, el cigarrillo y el riesgo de cáncer de endometrio han mostrado una asociación inversa, particularmente entre las mujeres posmenopáusicas, lo cual indicaría que las interacciones no pueden explicarse solamente en términos de interferencias mutuas en los metabolismos. Si a esto se suma el hecho que se están estudiando tejidos regulados principalmente a través de un mecanismo hormonal, el análisis del riesgo puede tornarse muy complejo (46) (47) (48).

En resumen, la toxicidad del alcohol en los sistemas reproductivos de ambos sexos depende de mecanismos multifactoriales que incluyen factores genéticos, hormonales, la dieta y los contaminantes ambientales. El metabolismo del etanol *in situ*, sin embargo, debe considerarse como un factor contribuyente importante a causa de un principio de similitud, es decir, los mismos metabolitos tóxicos pueden iniciar los primeros pasos de alteraciones celulares en cualquier tejido, no importa dónde y cómo se generan. Sobre esta hipótesis, en este laboratorio se han estudiado los efectos nocivos de la oxidación del etanol a acetaldehído y a radicales libres en varios tejidos del aparato reproductivo de ambos sexos en un modelo experimental con roedores. Los trastornos reproductivos causados por beber, sin duda deben implicar alteraciones en los factores hormonales críticos que controlan las funciones reproductivas, pero también están relacionados con la acción tóxica directa del etanol y sus metabolitos en los órganos que constituyen los sistemas reproductores.

Las sustancias tóxicas pueden afectar la salud reproductiva de la mujer en uno o en varios sitios, que incluyen los ovarios, el útero, la mama y el sistema neuroendocrino. Paralelamente, los tóxicos pueden afectar la salud reproductiva masculina produciendo alteraciones en los testículos, las glándulas sexuales accesorias y el sistema nervioso central, incluyendo el sistema neuroendocrino. No hay disponible un marcador único de la capacidad reproductiva ni existe un consenso acerca de cómo constituir una batería adecuada de variables validadas e interpretables para su uso en investigación y en la clínica. La toxicología experimental se vuelve entonces una de las áreas ineludibles de interés. Determinar que una sustancia es tóxica para el sistema reproductivo es sólo el primer paso y lo que sigue es examinar los mecanismos por los cuales se desarrolla esa toxicidad. El modelo experimental con roedores es utilizado comúnmente para el estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo, como un primer paso para extrapolar los resultados obtenidos a la evaluación de riesgo (37) (49).

Principales contribuciones a la comprensión del problema desde la investigación experimental

Sobre la base de numerosos estudios, se ha establecido que los efectos nocivos del alcohol están relacionados fundamentalmente con su conversión metabólica en acetaldehído, y con la promoción de la formación de radicales libres, con su posterior interacción con los componentes críticos de las células, iniciando así las manifestaciones tóxicas (39). Se han descrito varias enzimas implicadas en la activación del etanol a esos metabolitos tóxicos en diferentes tejidos, tanto en seres humanos como en roedores. Estas enzimas actúan en una amplia variedad de tejidos, entre los que se pueden mencionar los tractos aerodigestivo superior y digestivo, el páncreas, el cerebro, testículos, próstata, placenta y mama (3) (41) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57). Si se considera el hecho de que el acetaldehído es un carcinógeno y un producto químico fuertemente mutagénico, y capaz de reaccionar con muchos componentes celulares como el ADN, las proteínas, los lípidos, el glutatión y otros, la acumulación de dicho tóxico es relevante como un factor de riesgo (39) (58). Queda en este punto una pregunta interesante a considerar, y es si el hecho que las intoxicaciones repetidas pero espaciadas con dosis altas de alcohol, en un perfil de consumo característico del denominado “*binge drinking*”, podría llevar a la acumulación de alteraciones y lesiones en estos tejidos con un perjuicio de su función, si es que no se reparan a tiempo.

La formación *in situ* de acetaldehído y de radicales libres, y la susceptibilidad aumentada al estrés oxidativo exhibidas por estos tejidos expuestos crónicamente al etanol, son razones lógicas para explicar el daño celular. No solamente porque el acetaldehído es un tóxico mutagénico y carcinogénico sino porque la condición de estrés oxidativo mantenida en el tiempo es una causa demostrada de daño para muchas patologías. Las especies reactivas del oxígeno constituyen un arma de doble filo ya que sirven como moléculas de señalización clave en muchos procesos fisiológicos, pero también tienen un papel en los procesos patológicos que afectan el tracto reproductivo femenino.

Por ejemplo, estas especies químicas reactivas afectan procesos fisiológicos de la maduración de los ovocitos para el desarrollo del embrión, la fecundación y el embarazo (40). Se ha sugerido también que modulan la disminución en la fertilidad con la edad. Desempeñan un papel durante el embarazo y el parto normal y en la iniciación de un parto prematuro. Existe una evidencia creciente sobre los efectos del estrés oxidativo en la reproducción femenina con su participación en la fisiopatología de la preeclampsia, mola hidatiforme, algunos defectos de nacimiento y abortos. Numerosos estudios han demostrado que el estrés oxidativo juega un papel en la fisiopatología de la infertilidad y el

fracaso de la reproducción asistida. La utilización de estrategias antioxidantes para el tratamiento de algunas de estas patologías muestra que el papel del estrés oxidativo es relevante y que, por lo tanto, podría pensarse que cualquier factor exógeno que lo promueva afectará de modo adverso la ocurrencia y el progreso de estas enfermedades. El hábito de beber alcohol evidentemente juega como un factor de peso.

Estudios previos de otros laboratorios habían demostrado que el consumo excesivo de alcohol disminuía la producción testicular de testosterona a través de efecto directo sobre el testículo y no como consecuencia indirecta de un efecto derivado de la cirrosis hepática que acompaña frecuentemente al alcoholismo, o de otros factores (43) (44) (59) (60). Por otra parte, en varios estudios se había encontrado que el acetaldehído era más potente que el propio alcohol en su capacidad para disminuir la producción de testosterona testicular *in vitro* (59) (60). Esto llevó a distintos autores a imaginar que el acetaldehído podía directa o indirectamente inhibir las enzimas esteroideogénicas (p.ej. al disminuir las defensas antioxidantes provistas por el glutatión y provocar así un proceso de peroxidación de lípidos y proteínas) (49) (61) (62).

Estas hipótesis, no obstante, permanecían pobremente sostenidas debido al muy limitado conocimiento disponible acerca del metabolismo del alcohol a acetaldehído en las distintas fracciones celulares del testículo y si durante esos procesos se generaban o no radicales libres que pudieran iniciar un proceso peroxidativo (63) (64). Este desconocimiento relativo dificultaba apuntar medidas preventivas potenciales o visualizar interacciones nocivas sobre la función reproductiva testicular con otros compuestos presentes fundamentalmente en alimentos o en el ambiente.

En este laboratorio se estudió en un modelo experimental animal (rata Sprague Dawley) el metabolismo del etanol en el útero y el ovario, el testículo y la próstata, comparando con lo que se conoce del metabolismo del etanol en otras localizaciones donde existe una correlación epidemiológica positiva con la ocurrencia de toxicidad (hígado, tracto aerodigestivo superior, mama). Se exploraron distintas alternativas para la bioactivación del alcohol a acetaldehído y a radicales libres potencialmente disponibles en estos órganos y cómo ellos podrían interactuar con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y provocar estrés oxidativo. Estas alteraciones podrían, a su vez, inhibir procesos de reparación del daño ocasionado. Se propone que el tejido uterino sería vulnerable al consumo de alcohol, por razones no muy diferentes a las que se postulan para efectos equivalentes en el hígado, el tracto aerodigestivo superior y otros sitios del organismo. Es decir, por la acción del acetaldehído y de los radicales libres generados en su biotransformación. La diferencia estaría determinada, sin embargo,

por la presencia de distintas enzimas que bioactivan al alcohol y por la escasa participación o ausencia de mecanismos desintoxicantes de los productos tóxicos que el alcohol genera. Los resultados podrían explicar el daño celular producido por el consumo de alcohol, complementando la acción perjudicial sobre la reproducción que provoca el desbalance hormonal también inducido por el abuso del alcohol en ambos sexos (3) (51) (56) (57) (65) (66) (67).

La presencia de vías metabólicas que generan acetaldehído en estos órganos de la rata, junto con su escasa capacidad para destruirlo a través de la ALDH, sugieren la posibilidad que el metabolito se acumule durante la exposición al etanol. Esto resultó ser el caso en los experimentos en este laboratorio, que sugirieron que cualquier acetaldehído producido *in situ* o que llegara a través de la sangre permanecería lo suficiente como para tener la oportunidad de reaccionar con las moléculas esenciales y así causar efectos perjudiciales. Por ejemplo, los niveles de acetaldehído en el tejido de cuernos de útero se mantuvieron más altos que los plasmáticos por varias horas luego de una intoxicación aguda con etanol. Por su parte, los niveles del etanol alcanzaron un máximo a las tres horas en ambos tejidos y en plasma, con concentraciones del mismo orden. El perfil de concentraciones en el cuerno de útero acompañó al plasmático a través del tiempo (66). Teniendo en cuenta que la capacidad hepática para generar acetaldehído y para destruirlo es mucho mayor que en el útero y que en cualquier otro órgano (39) se puede deducir que el aporte a través de los niveles plasmáticos medidos desde este órgano, no debe ser significativo. El acetaldehído no es un compuesto lipofílico y el paso limitante para ese flujo al plasma debe estar al nivel de la ALDH hepática.

Estudios previos realizados en este laboratorio en otras localizaciones del organismo parecen sugerir que este resultado es esperable en aquellos tejidos con una baja capacidad de oxidación para el acetaldehído (57) (68). Con este perfil de intoxicación, que puede asemejarse al de un consumo muy alto pero puntual (del tipo “*binge drinking*”), se demostró que el cuerno uterino es capaz de sostener niveles de acetaldehído superiores a los plasmáticos por un tiempo muy prolongado. Como se mencionó anteriormente, se abre así la posibilidad de que esta sustancia pueda ejercer interacciones dañinas con componentes celulares.

Por otra parte, se abre también una posibilidad interesante en cuanto al desarrollo de estrategias preventivas frente al daño oxidativo provocado por muchas exposiciones a tóxicos (entre ellos el alcohol), en cuanto se logren identificar sustancias presentes en la dieta o que puedan incorporarse en ella, con actividad antioxidante o inhibidora de procesos metabólicos indeseables. Se han ensayado una variedad muy amplia de compuestos naturales polifenólicos por su actividad inhibidora sobre el metabolismo bioactivante del eta-

nol a acetaldehído y se ha encontrado que algunos son particularmente potentes, como los ácidos elárgico o nordihidroguayarático. El hecho que estas propiedades benéficas contra la toxicidad del alcohol puedan verificarse también *in vivo* en animales o en humanos es un problema a resolver, debido a que la biodisponibilidad de estas sustancias determina las concentraciones efectivas a nivel celular. Consecuentemente, no siempre aquello observado experimentalmente *in vitro* será operativo en una situación real. Esta diferencia puede ser particularmente relevante cuando la fuente de esos compuestos polifenólicos es la dieta. Los polifenoles son abundantes en las frutas, en vegetales y en algunas bebidas derivadas de plantas, como el té y paradójicamente, el vino tinto. También se han hecho intentos de administrarlos mediante formulaciones como suplementos dietarios (69) (70).

Conclusiones y reflexiones finales

En un mundo donde la vida se ha vuelto muy dependiente de la interacción con sustancias químicas (los llamados “xenobióticos” presentes en alimentos, fármacos, indumentaria, vivienda, trabajo, etc., ya sea intencionalmente o como contaminantes), las consecuencias para la salud aparecen frecuentemente como una limitación para su uso. Por otra parte, algunos de estos efectos deletéreos no son reconocibles fácilmente en los bioensayos que se realizan durante los procesos de validación de los productos químicos.

En este sentido resulta que la comprensión de los mecanismos de la toxicidad de las sustancias químicas constituye una herramienta poderosa para reconocer una intoxicación en curso, así como también para anticipar un riesgo durante el desarrollo de un producto (fármaco, aditivo alimentario, plaguicida, etc.).

El problema, cuando se estudia el mecanismo de acción tóxica de una sustancia, es que no siempre el sitio blanco del daño es definido o único, y que, entre las alteraciones evidentes en la bioquímica celular, no todas tienen una vinculación directa con las consecuencias. Dicho de otro modo, la ocurrencia de fenómenos medibles en el entorno celular no significa necesariamente que éstos tengan la misma relevancia en relación con la injuria tóxica. Un ejemplo que ilustra bien este paradigma es el estrés oxidativo, fenómeno relativamente fácil de medir por diversos métodos y que frecuentemente se revela durante los procesos tóxicos. Involucra a especies químicas muy reactivas generadas desde el oxígeno en su mayoría y también a las distintas estrategias antioxidantes disponibles en las células, aunque esto pueda variar mucho según el tejido afectado.

La mayoría de los estudios publicados en la literatura científica han relacionado las especies reactivas del oxígeno (ROS) con enfermedades como el cán-

cer, la resistencia a la insulina, la diabetes *mellitus*, las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis y el envejecimiento, los procesos inflamatorios crónicos, solo por mencionar algunos ejemplos relevantes (71). Sin embargo, otros tantos artículos también han relacionado las ROS con varios procesos fisiológicos y mecanismos protectores esenciales que los organismos vivos utilizan para su supervivencia. Ejemplos obvios serían su papel en la defensa inmunológica, la acción antibacteriana, el tono vascular y la transducción de señales. Se ha vuelto evidente que para mantener un estado de homeostasis, los organismos vivos se esfuerzan por contener esas moléculas altamente reactivas bajo un control estricto de concentración y ubicuidad con la ayuda de un intrincado sistema de defensas antioxidantes (71).

¿Qué significa entonces todo esto para un mecanismo de toxicidad determinado, donde se haya podido verificar la ocurrencia de estrés oxidativo?

La respuesta no es simple ni única. Puesto que el estrés oxidativo supone un desbalance en el estatus redox celular a favor del exceso de especies oxidantes, las consecuencias de este fenómeno van a depender de la magnitud y naturaleza química de ese exceso. Tendrá importancia también el factor tiempo; si una situación de estrés se hace crónica, el entorno celular irá sufriendo cambios irreversibles (o no reversibles en el tiempo adecuado) que cambiarán el escenario progresivamente frente al factor estresante. Por otra parte, existe en las células la capacidad de reaccionar frente al estrés, induciéndose mecanismos compensatorios que intentarán reparar o contener el daño, como aquellos dependientes del glutathione (50) (51) (52) (57) (67) (72). Pero esto no significa que eventualmente se retorne al estatus de normalidad.

Hay tóxicos (y dosis) que provocan un estrés oxidativo de tal magnitud que no pueden quedar dudas que los daños ocasionados se deben esencialmente a su acción (2) (6). Pero hay otros, donde el mecanismo de la acción tóxica (aguda o crónica) tiene que involucrar necesariamente alguna causa adicional a la acción de las ROS que pueda medirse (1) (5).

Las implicancias prácticas de estudiar estos procesos en profundidad se hacen evidentes cuando es necesario establecer regulaciones sobre el uso de los tóxicos, más allá de lo que la evaluación toxicológica del producto haya hecho visible en el momento de su aprobación o en evaluaciones previas de su toxicidad. Muchas sustancias de amplia aplicación o persistencia ambiental reflejan este problema y aunque está fuera del alcance de este trabajo analizarlas en detalle pueden mencionarse, por ejemplo, las controversias alrededor de dos casos de alta relevancia: el glifosato como carcinógeno y la toxicidad del asbesto en sitios blancos más allá del cáncer de pulmón o el mesotelioma (73) (74) (75) (76) (77) (78).

Hasta hace no muchos años el glifosato se consideraba entre los herbicidas más seguros para su uso en el campo e incluso en fumigaciones urbanas. Este juicio se basaba en su bajísima toxicidad aguda para mamíferos y animales en general, debido a que su mecanismo de acción tóxica (herbicida) comprende la inhibición específica de una actividad enzimática propia de los vegetales. Sin embargo, en el año 2015 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, OMS) decidió clasificar a este compuesto como probablemente carcinogénico para seres humanos (Grupo 2A), basándose en evidencia epidemiológica para ciertos cánceres obtenida en poblaciones rurales (aplicadores, agricultores) más un sinnúmero de evidencia experimental en distintos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* que mostraban efectos deletéreos (entre ellos, el estrés oxidativo) (73). Los ensayos habían sido realizados con el compuesto puro y también con varias de sus formulaciones más comunes, lo cual sugería la posibilidad de efectos debidos a mezclas de sustancias (73). Los cuestionamientos a tal decisión de IARC no tardaron en llegar, argumentando esencialmente que esa evidencia experimental adolecía de defectos de diseño y concepto (por ejemplo, dosis elevadas respecto de las reales y modelos muy alejados del humano) (74). Más allá de los conflictos de intereses con la industria y de la debilidad de alguna evidencia experimental considerada, es claro hoy que este herbicida no es tan seguro como se suponía al tiempo de su lanzamiento al mercado y que la toxicología experimental ha hecho y hace un aporte sustantivo para una evaluación de riesgo más correcta (75).

La toxicidad del asbesto (en sus diferentes formas minerales) es conocida desde el comienzo de su explotación industrial (76). Su clasificación como reconocido carcinógeno humano (Grupo 1 de IARC) hizo que finalmente se prohibiese su minería y su uso en la mayoría de los países, incluso en la Argentina. Esto provocó una disminución drástica y sostenida en la incidencia de dos cánceres vinculados con la exposición ocupacional a asbesto: el de pulmón y el mesotelioma (76). A pesar de su prohibición, todavía el riesgo tóxico es importante debido a las instalaciones que quedan por todo el mundo donde los asbestos cumplen funciones vinculadas con sus propiedades físicoquímicas no fáciles de sustituir, la de excelentes aislantes térmicos y como materiales antifricción. En otras palabras, el escenario de la exposición cambió, desde la exposición a grandes cantidades de fibras en su explotación minera o en la fabricación de productos que lo contuvieran hacia la que puede ocurrir en tareas de mantenimiento o desmantelamiento de instalaciones, como también una exposición más difusa provocada por la contaminación ambiental con residuos de material con asbesto, donde en la mayor parte de los casos las dosis seguramente serán sustancialmente más

bajas. IARC ha vuelto a considerar recientemente la evaluación de la evidencia disponible y acumulada sobre la toxicidad de estos minerales justamente atendiendo a esos cambios (76). Hay hoy alguna evidencia (no concluyente para todos los cánceres) de que la exposición a asbesto podría vincularse con cánceres del tracto aerodigestivo superior y de ovario (76). En carcinogénesis química, la asociación cooperativa de sustancias o fenómenos es algo frecuente (ej., la iniciación y la promoción). El asbesto en dosis bajas podría interactuar con otros carcinógenos o factores promotores (ej., dieta). Este aspecto es de particular relevancia por las interacciones probables con otros carcinógenos comunes en la población, como el tabaco o el alcohol. Dosis altas (exposiciones importantes) pueden desdibujar las interacciones entre tóxicos, dándose el protagonismo al más tóxico. Ese escenario puede cambiar para dosis bajas (*dose-dependent mechanisms of toxicity*). El caso de la exposición a las fibras de asbesto en los escenarios actuales puede ser el ejemplo.

La característica tan particular que tienen las fibras de translocarse podría explicar la acción tóxica a distancia del asbesto dentro del organismo aunque no debe descartarse su ingreso por vía oral. En resumen, nuevamente la toxicología experimental puede ayudar a la justa valoración de las variables en juego, orientando a las regulaciones con argumentos sólidos mediante el estudio de los mecanismos de toxicidad de las fibras en estos escenarios nuevos (77) (78).

Existen diferencias significativas entre especies en las respuestas del tracto respiratorio hacia la inhalación de fibras de asbestos. Los mecanismos biológicos responsables para estas diferencias en la respuesta tóxica se desconocen en gran parte. Puede suponerse que habría diferencias en la deposición y el *clearance* de las fibras en los pulmones, en la severidad de la fibrosis, en la cinética de la translocación de las fibras a la pleura y en los niveles o tipos de mecanismos de defensa anti-oxidante. Respecto a esto último resulta interesante el estudio en ratones que sugiere el potencial teratogénico del asbesto (79).

Decir que algo es plausible significa que es coherente con el conocimiento acumulado en el dominio pertinente al fenómeno que se intenta explicar, con independencia de si existe o no evidencia directa que lo confirme. La toxicología experimental puede aportar mucho para esclarecer estas cuestiones.

Agradecimientos

El autor agradece el financiamiento otorgado por distintos organismos a lo largo de las investigaciones mencionadas en el texto (PIP (CONICET), PICT (MINCyT), PIDDEF (MINDEF)) así como a las instituciones que alojan los laboratorios donde se hicieron los trabajos.

Conflictos de intereses

El autor declara no tener conflictos de intereses vinculados con los temas tratados en el presente trabajo.

Correspondencia

Dr. GERARDO D. CASTRO
Departamento de Investigaciones en Bioseguridad y Toxicología.
Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF). Juan B. de La Salle 4397,
B1603ALO VILLA MARTELLI, provincia de Buenos Aires.
Argentina
Correo electrónico: gcastro@citedef.gob.ar

Referencias bibliográficas

1. Castro JA, Montalto de Mecca M, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human Exp Toxicol* 2006; 25 (8): 471-9.
2. Castro JA, Castro GD. Carbon tetrachloride. En: Mc Cuskey R, Earnest DL, editors. Volume 9: Hepatic and Gastrointestinal Toxicology. En: Sipes IG, Mac Queen CA, Gandolfi AJ, editors. *Comprehensive Toxicology*. New York: Elsevier Science; 1997. p. 251-71.
3. Castro JA, Castro GD. Mechanisms in prostate damage by alcohol. En: Preedy VR, Watson RR, editors. *Comprehensive handbook of alcohol related pathology*. New York: Academic Press; 2005. p. 1007-15.
4. Castro GD, Castro JA. Alcohol drinking and mammary cancer: pathogenesis and potential dietary preventive alternatives. *World J Clin Oncol* 2014; 5 (4): 713-29.
5. Castro JA, Castro GD. Acetaldehyde formation and accumulation. Toxic effects on reproductive target tissues during alcohol drinking. En: Stone M, editor. *Acetaldehyde: biochemistry, applications and safety concerns*. Hauppauge: NOVA Science Publishers; 2015. p. 79-129.
6. Costantini MH, Maciel ME, Castro GD. In the search for better radioprotective treatments: a risk-benefit equation between effectiveness and toxicity. *Current Topics Toxicol* 2019; 15: 81-93.
7. Pechen de D'Angelo A, Rubio NC, Kirs V, Castro GD, Delgado de Layño AMA, Costantini MH, *et al.* Análisis del riesgo potencial para la salud y el medio ambiente derivados de la disposición clandestina de agroquímicos en el Cuy, Provincia de Río Negro, Argentina. *Acta Toxicol Argent* 1998; 6 (1): 28-33.
8. Castro GD. Toxicología ambiental: educando científicos y tecnólogos como comunicadores primarios de conocimiento. *Acta Toxicol Argent* 2017; 25 (Supl.): 28-33.
9. Castro GD. El Centro de Investigaciones Toxicológicas. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2015; 49 (1): 7-16.
10. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Rad Biol* 1994; 65 (1): 27-33.
11. de Toranzo EGD, Castro JA. Reaction of 4-hydroxynonenal with some thiol containing radio protective agents or

- their active metabolites. *Free Rad Biol Med* 1994; 17 (6): 605-7.
12. Coleman CN, Blakely WF, Fike JR, MacVittie TJ, Metting NF, Mitchell JB, *et al.* Molecular and cellular biology of moderate-dose (1-10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001. *Rad Res* 2003; 159 (6): 812-34.
 13. Kligerman MM, Turrisi AT 3rd, Urtasun RC, Norfleet AL, Phillips TL, Barkley T, *et al.* Final report on phase I trial of WR-2721 before protracted fractionated radiation therapy. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1988; 14 (6): 1119-22.
 14. Rose PG. Amifostine cytoprotection with chemotherapy for advanced ovarian carcinoma. *Semin Oncol* 1996; 23 (4 Suppl 8): 83-9.
 15. van der Vijgh WJ, Peters GJ. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (Ethyol): preclinical aspects. *Semin Oncol* 1994; 21 (5 Suppl 11): 2-7.
 16. Winczura P, Jassem J. Combined treatment with cytoprotective agents and radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 2010; 36 (3): 268-75.
 17. Cairnie AB. Adverse effects of radioprotector WR2721. *Rad Res* 1983; 94 (1): 221-6.
 18. Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, *et al.* Salivary Gland Hypofunction/Xerostomia Section, Oral Care Study Group, Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology (ISOO). A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer* 2010; 18 (8): 1039-60.
 19. Antonadou D, Pepelassi M, Synodinou M, Puglisi M, Throuvalas N. Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52 (3): 739-47.
 20. Maier P, Wenz F, Herskind C. Radioprotection of normal tissue cells. *Strahlenther Onkol* 2014; 190 (8): 745-52.
 21. Bardet E, Martin L, Calais G, Alfonsi M, Feham NE, Tuchsais C, *et al.* Subcutaneous compared with intravenous administration of amifostine in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy: final results of the GORTEC2000-02 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2011; 29 (2): 127-33.
 22. Gu J, Zhu S, Li X, Wu H, Li Y, Hua F. Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. *PLoS One* 2014; 9 (5): e95968.
 23. Ormsby RJ, Lawrence MD, Blyth BJ, Bexis K, Bezak E, Murley JS, *et al.* Protection from radiation-induced apoptosis by the radioprotector amifostine (WR-2721) is radiation dose dependent. *Cell Biol Toxicol* 2014; 30 (1): 55-66.
 24. Valles E, de Castro CR, Castro JA. Radioprotectors as late preventive agents against carbon tetrachloride induced liver necrosis. Protection by 2-(3-amino propyl-amino) ethyl phosphorothioic acid (WR2721). *Exp Mol Pathol* 1995; 63 (2): 101-9.
 25. Weiss JF, Landauer MR. History and development of radiation-protective agents. *Int J Rad Biol* 2009; 85 (7): 539-73.
 26. Castro G, Maciel M, Díaz Gómez M, Costantini M, Formosa Lemoine F, Montalto de Mecca M, *et al.* Radioprotective effect of vegetable oils in an experimental model of acute radiation syndrome [resumen]. *Medicina* 2017; 77 (Supl. 1): 456.
 27. Castro G, Montalto de Mecca M, Maciel M, Díaz Gómez M, Costantini M, Formosa Lemoine F, *et al.* Radioprotective effect of lipoic acid in an experimental model of acute radiation syndrome [resumen]. *Medicina* 2017; 77 (Supl. 1): 296.
 28. Maciel M, Quintans L, Costantini M, Formosa Lemoine F, López G, Montalto de Mecca M, *et al.* Radioprotection studies with ethyl pyruvate and alpha phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) [resumen]. *Appl Res Toxicol* 2015; 1 (Supl): 75.
 29. Maciel M, Quintans L, Costantini M, Formosa Lemoine F, López G, Montalto de Mecca M, *et al.* Exposición a radiaciones ionizantes, biomonitoring y radioprotección. Efecto del pretratamiento con alfa-fenil-N-terbutil nitrona (PBN) [resumen]. *Bioquím Patol Clín* 2015; (Supl. agosto 2015): 114.
 30. Castro J, Castro G. Hydroxyl and 1-hydroxyethyl radical detection by spin trapping and GC-MS. En: Armstrong D, editor. *Methods in Molecular Biology Series 186, Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols*. Totowa: Humana Press Inc.; 2002. p. 89-99.
 31. Castro G, Maciel M, Díaz Gómez M, Costantini M, Montalto de Mecca M, Formosa Lemoine F, *et al.* Radioprotective effect of sodium alizarinsulfonate in an experimental model of acute radiation syndrome [resumen]. *Medicina* 2017; 77 (Supl. 1): 349.
 32. Maciel ME, Quintans LN, Díaz Gómez MI, Costantini MH, Formosa Lemoine F, Montalto de Mecca M, *et al.* Efecto radioprotector del piruvato de etilo, solo o como coadyuvante de la amifostina. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2016; 50 (4): 733-44.
 33. Costantini MH, Díaz Gómez MI, Formosa Lemoine F, Montalto de Mecca M, López GD, Castro JA, *et al.* Butirato de sodio como coadyuvante de la acción radioprotectora de la amifostina. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2019; 53 (3): 397-408.
 34. Berger ME, Christensen DM, Lowry PC, Jones OW, Wiley AL. Medical management of radiation injuries: current approaches. *Occup Med (Lond)* 2006; 56 (3): 162-72.
 35. Shadad AK, Sullivan FJ, Martin JD, Egan LJ. Gastrointestinal radiation injury: prevention and treatment. *World J Gastroenterol* 2013; 19 (2): 199-208.
 36. International Atomic Energy Agency. Effects of ionizing radiation on blood and blood components: a survey. Vienna, Austria: IAEA, IAEA-TECDOC-934; 1997. p. 7-22.
 37. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. The scope of the problem. *Alcohol Res Health* 2004-2005; 28: 111-20.

38. World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health. Geneva: WHO Press; 2018.
39. Lieber CS. Alcohol metabolism: general aspects. En: Watson RR, Preedy V, editors. Comprehensive handbook of alcohol related pathology, Volume 1. New York: Elsevier- Academic Press; 2005. p. 15-26.
40. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 641-50.
41. Egerer G, Stickel F, Seitz HK. Alcohol and the gastrointestinal tract. En: Preedy VR, Watson RR, editors. Comprehensive handbook of alcohol related pathology, Volume 2. New York: Elsevier Academic Press; 2005. p. 557-69.
42. Díaz Gómez MI, Fanelli SL, Delgado de Layño AMA, Castro JA, Castro GD. Liver nuclear and microsomal CYP2E1-mediated metabolism of xenobiotics in rats chronically drinking an alcohol-containing liquid diet. *Toxicol Ind Health* 2006; 22: 367-74.
43. Campillo B. Hormonal responses in alcoholism. En: Preedy VR, Watson RR, editors. Comprehensive handbook of alcohol related pathology, Volume 2. New York: Elsevier-Academic Press; 2005. p. 979-90.
44. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006; 50: 291-96.
45. Díaz Gómez MI, Valles E, Fanelli SL, Delgado de Layño AMA, Castro GD, Castro JA. Alcohol induction of nuclear ethanol and N-nitrosodimethylamine metabolism to reactive metabolites. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22: 139-45.
46. Buthet LR. Estudio de la biotransformación del etanol en el útero de rata y su relación con la toxicidad reproductiva del alcohol. [Tesis doctoral. Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de San Martín]; 2013.
47. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report 2018. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Endometrial Cancer. Disponible en: <http://www.dietandcancerreport.org>. Fecha de acceso: 29 de abril de 2022.
48. Yang HP, Gierach GL, Danforth KN, Sherman ME, Park Y, Wentzensen N, *et al.* Alcohol and endometrial cancer risk in the NIH-AARP diet and health study. *Int J Cancer* 2011; 128: 2953-61.
49. Emanuele NV, Lapagli N, Steiner J, Colantoni A, Van Thiel DH, Emanuele MA. Peripubertal paternal EtOH exposure. *Endocrine* 2001; 14: 213-9.
50. Castro GD, Rodríguez de Castro C, Maciel ME, Fanelli SL, Cignoli de Ferreyra E, Díaz Gómez MI, *et al.* Ethanol-induced oxidative stress and acetaldehyde formation in rat mammary tissue: potential factors involved in alcohol drinking promotion of breast cancer. *Toxicology* 2006; 219: 208-19.
51. Díaz Gómez MI, Rodríguez de Castro C, Fanelli SL, Quintans LN, Costantini MH, Castro JA, *et al.* Biochemical and ultrastructural alterations in the rat ventral prostate due to repetitive alcohol drinking. *J Appl Toxicol* 2007; 27: 391-8.
52. Fanelli SL, Maciel ME, Díaz Gómez MI, Delgado de Layño AMA, Bietto FM, Castro JA, *et al.* Further studies on the potential contribution of acetaldehyde accumulation and oxidative stress in rat mammary tissue in the alcohol drinking promotion of breast cancer. *J Appl Toxicol* 2011; 31: 11-9.
53. Kapoor N, Pant AB, Dhawan A, Dwivedi UN, Gupta YK, Seth PK, *et al.* Differences in sensitivity of cultured rat brain neuronal and glial cytochrome P450 2E1 to ethanol. *Life Sci* 2006; 79: 1514-22.
54. Maciel ME, Castro GD, Castro JA. Inhibition of the rat breast cytosolic bioactivation of ethanol to acetaldehyde by some plant polyphenols and folic acid. *Nutr Cancer* 2004; 49: 94-9.
55. Maciel ME, Castro JA, Castro GD. Inhibition of rat mammary microsomal oxidation of ethanol to acetaldehyde by plant polyphenols. *Human Exp Toxicol* 2011; 30: 656-64.
56. Quintans LN, Castro GD, Castro JA. Oxidation of ethanol to acetaldehyde and free radicals by rat testicular microsomes. *Arch Toxicol* 2005; 79: 25-30.
57. Quintans LN, Maciel ME, Castro JA, Castro GD. Acumulación de acetaldehído y estrés oxidativo en testículo luego de la intoxicación alcohólica en ratas. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 2013; 47 (4): 709-18.
58. Pöschl G, Stickel F, Wang XD, Seitz HK. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *Proc Nutr Soc* 2004; 63: 65-71.
59. Badr FM, Bartke, A, Dalterio S, Bulger W. Suppression of testosterone production by ethyl alcohol. Possible mode of action. *Steroids* 1977; 30: 647-55.
60. Cobb CF, Ennis MF, Van Thiel DH, Gavaler JS, Lester R. Acetaldehyde and ethanol are direct testicular toxins. *Surg Forum* 1978; 29: 641-4.
61. Rosenblun E, Gavaler JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for ethanol-associated testicular injury in rats. *Endocrinology* 1985; 116: 311-8.
62. Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Ethanol induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol* 1990; 25: 231-7.
63. Chiao YB, Van Thiel DH. Characterization of rat testicular alcohol dehydrogenase. *Alcohol Alcohol* 1986; 21: 9-15.
64. Murono EP, Fisher-Simpson V. Microsomal ethanol-oxidizing system in purified rat Leydig cells. *Biochim Biophys Acta* 1987; 918: 136-40.
65. Faut M, Rodríguez de Castro C, Bietto FM, Castro JA, Castro GD. Metabolism of ethanol to acetaldehyde and increased susceptibility to oxidative stress could play a role in the ovarian tissue cell injury promoted by alcohol drinking. *Toxicol Ind Health* 2009; 25: 525-38.
66. Buthet LR, Bietto FM, Castro JA, Castro GD. Metabolism of ethanol to acetaldehyde by rat uterine horn subcellular fractions. *Human Exp Toxicol* 2011; 30: 1785-94.
67. Buthet LR, Maciel ME, Quintans LN, Rodríguez de Castro C, Costantini MH, Fanelli SL, *et al.* Acetaldehyde

- content and oxidative stress in the deleterious effects of alcohol drinking to rat uterine horn. *J Toxicol* 2013; 2013: 161496.
68. Castro GD, Delgado de Layño AMA, Fanelli SL, Maciel ME, Díaz Gómez MI, Castro JA. Acetaldehyde accumulation in rat mammary tissue after an acute treatment with alcohol. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 315-21.
 69. Castro GD, Castro JA. Metabolism of ethanol to acetaldehyde in the rat mammary tissue. Inhibitory effects of plant polyphenols and folic acid. En: Preedy VR, Watson RR, editors. *Alcohol, Nutrition and Health Consequences*. New York: Humana Press; 2013. p. 145-54.
 70. Castro GD, Quintans LN, Maciel ME, Castro JA. Preventive effects of plant polyphenols in the promotion of mammary cancer and testicular damage induced by alcohol drinking. En: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editors. *Polyphenols in Health and Disease, Volume 1: Bio-modification and mechanisms of action of polyphenols*. San Diego: Elsevier; 2013. p. 1199-208.
 71. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 936486.
 72. Oh SI, Kim CI, Chun HJ, Park SC. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* 1998 Apr; 128 (4): 758-63.
 73. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some organophosphate insecticides and herbicides. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 112). p. 321-412.
 74. Bus JS. IARC use of oxidative stress as key mode of action characteristic for facilitating cancer classification: glyphosate case example illustrating a lack of robustness in interpretative implementation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017; 86: 157-66.
 75. Wang X, Lu Q, Guo J, Ares I, Martínez M, Martínez-Larañaga MR, *et al*. Oxidative stress and metabolism: a mechanistic insight for glyphosate toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2022 Jan 6; 62: 617-39.
 76. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres and dusts. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100C.). p. 219-310.
 77. Toyokuni S. Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis. *Nagoya J Med Sci* 2009 Feb; 71 (1-2): 1-10.
 78. Liu G, Cheres P, Kamp DW. Molecular basis of asbestos-induced lung disease. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 161-87.
 79. Fujitani T, Hojo M, Inomata A, Ogata A, Hirose A, Nishimura T, *et al*. Teratogenicity of asbestos in mice. *J Toxicol Sci* 2014 Apr; 39 (2): 363-70.

Recibido: 16 de mayo de 2022

Aceptado: 21 de septiembre de 2022