

# TOXICOLOGÍA

## TEMA 1: PANORAMA ACTUAL DE LA TOXICOLOGÍA

1. Conceptos y objetivos
2. Perspectiva histórica y situación actual
3. Algunas ramas aplicadas

## TEMA 2: ASPECTOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS DE LA TOXICOLOGÍA

1. Tóxico e intoxicaciones
2. Cuantificación de la toxicidad
  - 2.1. Estrategia para evaluar la toxicidad general
  - 2.2. Clasificación y etiquetado de productos químicos:
  - 2.3. Índices de toxicidad crónica
3. Selectividad y sensibilidad
4. Índice terapéutico y margen de seguridad

## TEMA 3: FASES DEL FENÓMENO TÓXICO

1. Exposición
2. Vías de penetración y procesos de tránsito
3. Absorción dérmica
4. Absorción inhalatoria
5. Absorción oral
6. Distribución
7. Fijación
8. Excreción

## TEMA 4: BIOTRANSFORMACIÓN

1. Introducción a la biotransformación
2. Tipos de reacciones y localización
3. Reacciones de oxidación
  - 3.1. Reacciones de oxidación catalizadas por el CYP450
  - 3.2. Reacciones de oxidación catalizadas por otros enzimas
4. Reacciones de reducción
5. Reacciones de hidrólisis
6. Reacciones de fase II

## TEMA 5: FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DISPONIBILIDAD BIOLÓGICA

1. Factores químicos y biológicos
2. Diferencias interespecíficas
3. Diferencias interindividuales

## TEMA 6: MECANISMOS DE TOXICIDAD

1. Factores toxicocinéticos

[2. Toxicidad por compuestos electrofílicos](#)

[3. Toxicidad por radicales libres](#)

[4. Otros casos de toxicidad](#)

#### [TEMA 7: PREVENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD](#)

[1. Principios generales](#)

[2. Ensayos toxicológicos](#)

[3. Ensayos de toxicidad general](#)

[4. Reglamentaciones](#)

#### [TEMA 8: MÉTODOS ALTERNATIVOS EN TOXICOLOGÍA](#)

[1. Estrategia de las 3 Rs](#)

[2. Concepto de métodos alternativos](#)

[3. Validación de los métodos alternativos](#)

[4. Aplicación de los métodos alternativos en I+D de medicamentos](#)

[5. Conclusiones](#)

#### [TEMA 9: EL PACIENTE INTOXICADO](#)

#### [TEMA 10: INTOXICACIÓN POR DROGAS](#)

#### [TEMA 11: CARCINOGENÉISIS](#)

[1. Cáncer y mutación: perspectiva histórica](#)

[2. Definición de carcinógeno: tipos de evidencias](#)

[3. Fases del proceso canceroso](#)

[4. Tipos de carcinógenos](#)

[5. Carcinógenos genotóxicos](#)

[6. Carcinógenos no genotóxicos](#)

[7. Evaluación de la carcinogenicidad](#)

#### [TEMA 12: MUTAGÉNESIS](#)

[1. Nacimiento y desarrollo de la toxicología genética](#)

[3. Mecanismos moleculares](#)

[4. Métodos de evaluación de la mutagenicidad](#)

[5. Clasificación de compuestos mutagénicos](#)

#### [TEMA 13: TOXICIDAD DE LA REPRODUCCIÓN](#)

[1. Introducción](#)

[2. Períodos críticos de susceptibilidad](#)

[3. Diferencias interespecíficas](#)

[4. Manifestaciones de las alteraciones en el desarrollo](#)

[5. Modos de evaluación](#)

[6. Compuestos teratógenos](#)

#### [TEMA 14: EVALUACIÓN DEL RIESGO](#)

[1. Riesgo y percepción de riesgo](#)

[2. Proceso completo de evaluación del riesgo](#)

[3. Estrategias de evaluación del riesgo](#)

[4. Fases de la evaluación del riesgo](#)

**TEMA 15: TOXICIDAD DE MEDICAMENTOS**

[1. Toxicidad y reacciones adversas](#)

[2. Métodos y sistemas de detección](#)

[3. Clasificación de las RAM](#)

[4. Mecanismos de producción](#)

**TEMA 16: TOXICIDAD DE ALGUNOS MEDICAMENTOS**

[1. Antiinflamatorios no esteroideos](#)

[2. Medicamentos cardiovasculares](#)

[2.1. Nitratos](#)

[3. Medicamentos del SNC](#)

[3.1. Antipsicóticos](#)

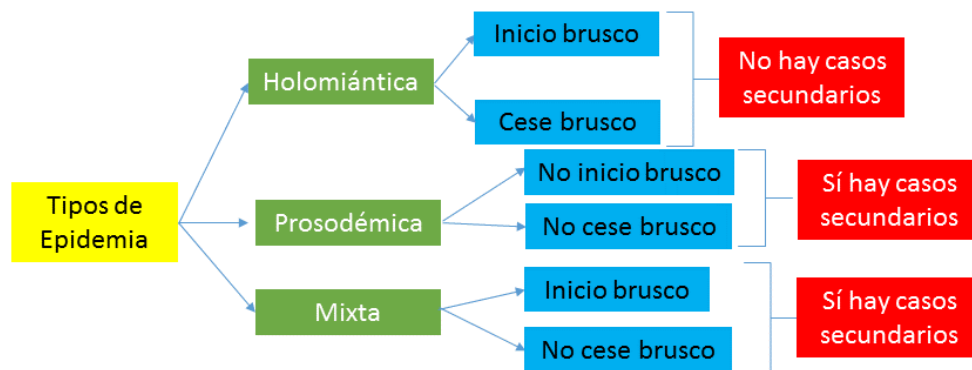
[3.2. Sedantes](#)

[3.3. Antidepresivos](#)

*Para entender la leyenda de colores:*

*(es una forma de ir haciéndose un esquema, mentalmente)*

Nivel 1 → nivel 2 → nivel 3 → nivel 4 → nivel 5



← esto indica que se ha preguntado en clase

2.9.2014

## TEMA 1: PANORAMA ACTUAL DE LA TOXICOLOGÍA

Xeno es un prefijo que hace alusión a algo ajeno. Un producto químico, que puede ser un contaminante, un principio activo, etc, es un **xenobiótico** para el ser humano.

Dicho producto químico tiene la capacidad de producir un determinado **efecto adverso**. Nos interesa estudiar ese efecto, que se produce solamente en determinadas **condiciones**. No existen productos que sean o no tóxicos, sino que un producto produce un efecto adverso en determinadas condiciones.

Por tanto, la toxicología es la ciencia que estudia los efectos nocivos de los compuestos químicos.

En el laboratorio tenemos unas condiciones de uso para los productos químicos (por ejemplo, el uso de guantes). También necesita una autorización de su comercialización, en el que se evalúa la toxicidad y se establecen los niveles seguros de exposición: muchas cosas tienen productos tóxicos (aire, comida) pero tienen que estar por debajo de un nivel determinado. Es necesario reducir la presencia de productos tóxicos en el medio ambiente o en los alimentos.

Los medicamentos son los productos donde más se estudia la toxicidad. En el medicamento se estudia una **toxicidad preclínica** (en la que se encarga la toxicología) y los efectos adversos **post-comercialización** (de los que se encarga la farmacología y farmacovigilancia). En un cosmético es importante estudiar la permeabilidad del mismo ya que si atraviesa la piel puede acceder a nivel sistémico. Si no es permeable entonces interesará estudiar si produce alergia o si es irritante.

3.9.2014

### 1. Conceptos y objetivos

La **toxicología** es la ciencia que estudia los efectos nocivos de los compuestos químicos.

Los **efectos adversos**, además de afectar al hombre, afectan a otros seres vivos.

- En toxicología se impone un sistema de **detección** de agentes tóxicos (detección, identificación y cuantificación).
- También hay sistemas para **evaluar la toxicidad**: ¿por qué mecanismo se produce?.
- Se estudian los medios para **contrarrestar los efectos** adversos.

- Se intenta **prevenir** la toxicidad.

Un xenobiótico puede ser **sintético o natural**. Hay que tener en cuenta que los compuestos naturales no siempre son los más seguros (ni tienen porqué ser seguros, véase los venenos de araña, etc).

El objetivo general de la toxicología es conseguir un **nivel razonable de seguridad** mediante un sistema de quimicovigilancia (es un sistema que no se termina nunca porque siempre aparecen nuevos conocimientos y datos).

Más en concreto, tiene 3 **OBJETIVOS**, los cuales son:

- **Conocer las propiedades tóxicas** de las sustancias químicas:
  - Nuevas sustancias con distintos usos: **medicamentos**, **cosméticos**, **aditivos alimentarios**, **plaguicidas** y **biocidas**, **productos químicos** de uso industrial).
  - Contaminantes (metales, PCBs, dioxinas. Se usan mucho en la industria y no tienen ningún tipo de regulación porque surgen de un proceso industrial).
  - Agentes adictivos (alcohol, tabaco, drogas).
  - El conocimiento de todas las sustancias anteriormente comentadas se realiza a un nivel de profundización variable en función de: requerimientos según su uso, las alertas de toxicidad, influencias sociales, interés científico, etc.
- **Evaluar el riesgo** de efectos adversos en una determinada población teniendo en cuenta tanto las condiciones de exposición como la toxicidad.
- **Aconsejar a la sociedad** sobre las medidas que debe tomar para controlar y prevenir los efectos perniciosos de las sustancias químicas (tabaco). De esta parte se encarga la salud pública.

Áreas de actividad profesional o **niveles de actuación** en Toxicología (a 3 niveles):

- **Descriptivo**: realización de ensayos de toxicidad para estimar las dosis tóxicas y los umbrales de toxicidad, así como para definir los tipos de toxicidad (irritante, genotóxico -producen daño a nivel de ADN-, cancerígeno). Se puede hacer in-house (dentro de la empresa) o externamente.
- **Mecanístico**: profundización en el estudio de los mecanismos de toxicidad y de los medios para contrarrestarla.
- **Regulatorio**: revisión de los datos de toxicidad para autorizar la comercialización de un producto para un determinado uso. Incluye la regulación de una evaluación de riesgo (contaminante) así como el establecimiento de niveles máximos permisibles.

## 2. Perspectiva histórica y situación actual

Los padres de la toxicología fueron Orfila y **Paracelso** (1493-1541). Paracelso dijo que el efecto tóxico depende de la dosis ("*dosis sola facit venenum*"). Un mismo brebaje, según la dosis, podía tener efecto perjudicial o no.

Mateo José Buenaventura **Orfila** (1787-1853) escribió el primer tratado sobre la toxicología. Es el creador de la toxicología experimental y organiza el estudio de tóxicos en: acción de los tóxicos, investigación en medicina legal, y los antídotos (los desarrolla).

En el siglo **XIX** hay una serie de avances que permiten el desarrollo de la toxicología:

- Técnicas de análisis químico que aplicadas a los tóxicos suponen el nacimiento de la toxicología forense.
- Técnicas de experimentación fisiológica aplicadas a los tóxicos (desarrolladas por Claude Bernard). Bernard estudió los efectos del curare, monóxido de carbono, opio, estricnina y diversos anestésicos.

En el siglo **XX** hay una gran expansión en la industria química y agroquímica, y un desarrollo de la industria farmacéutica y alimentaria.

### Agencias reguladoras

Las agencias reguladoras y comités expertos se encargan de regular la comercialización de productos químicos. En función del campo y país, se encuentran diferentes agencias. En el campo:

- De **TOXICOLOGÍA** (sociedades científicas): en España está la **AETOX** o Asociación Española de Toxicología. En Europa la **EUROTOX** o European Toxicologists & European Societies of Toxicology. En U.S. está la **SOT** o Society of Toxicology.
- De **MEDICAMENTOS**: en España está la **AEMPS**: agencia española de medicamentos y productos sanitarios. A nivel europeo (Londres) se llama **EMA**: European Medicines Agency. En U.S. se denomina **FDA**, que significa food and drug administration.
- De **ALIMENTOS**: en España está la **AESAN** o Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. En Europa (Parma, Italia) está la **EFSA**: European Food Safety Authority. Y en U.S. está la **JECFA**: Joint Expert Committee and Food Additives.
- De **PRODUCTOS QUÍMICOS**: En España tenemos el **MSPS**: ministerio de sanidad. En Europa (Finlandia) está la **ECHA**: European Chemicals Agency. Y

en U.S está la **EPA**: Environmental Protection Agency.

### 3. Algunas ramas aplicadas

1. **Toxicología forense**: Está vinculada a la **medicina legal y forense**. Proporciona **información toxicológica como apoyo** a las actividades judiciales: asesinatos y homicidios, pruebas de paternidad, alcoholemias, estupefacientes, delito ecológico.
2. **Toxicología clínica**: Está vinculada a la **medicina intensiva y de urgencias**. Se ocupa del **diagnóstico y tratamiento** de la **intoxicación**, desarrollo y aplicación de métodos de **detección** y desarrollo y aplicación de terapias antitóxicas
3. **Toxicología ocupacional o laboral**: Está vinculada con la **medicina preventiva y a la seguridad en el trabajo**. Comprende aspectos médicos y legales. Su objetivo es salvaguardar la salud y poner en evidencia las alteraciones funcionales que se producen en el organismo antes de que lleguen a ser profundas e irreversibles. Pauta los valores de concentración máxima admisible e intenta buscar indicadores biológicos de exposición o de efecto (el indicador nos sirve para medir los niveles tóxicos de una muestra)
4. **Toxicología alimentaria**: Se ocupa de los **aspectos químicos-toxicológicos** de la seguridad alimentaria.
5. **Toxicología ambiental (ecotoxicología)**: Se ocupa de los **efectos tóxicos** de los productos químicos sobre los seres vivos y ecosistemas.

## TEMA 2: ASPECTOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS DE LA TOXICOLOGÍA

### 1. Tóxico e intoxicaciones

#### Definiciones:

- **Tóxico** es toda sustancia química que, incorporada al organismo vivo a una determinada concentración, produce en virtud de su estructura química y a través de mecanismos físicoquímicos y bioquímicos, alteraciones moleculares y celulares -transitorias o permanentes-, que alteran el estado de salud.
- El **xenobiótico** es el término genérico y el más utilizado.
- El **veneno** se reserva cuando hay una intencionalidad de producir daño.
- El término **toxina** se utiliza cuando el origen es biológico (toxinas animales, vegetales, microbianas).

Un xenobiótico, en función de:

- Su **estructura química**, pueden ser: aminas aromáticas, dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), metales, etc.
- Su **mecanismo de acción** tenemos los inhibidores de acetilcolinesterasa (organofosforados) y los productores de metahemoglobina.
- El **órgano afectado**: hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, inmunotóxicos, mutágeno, cancerígeno y teratógeno (a estos 3 últimos se les llama en conjunto CMR)

La **intoxicación** es la alteración del equilibrio fisiológico o de salud causada por un xenobiótico. La intoxicación puede ser diferente en función del:

- **Grado de afectación** puede ser leve, moderada o grave.
- **Número de exposiciones** que son requeridas: aguda (una única exposición), crónica (varias exposiciones), recidivante (cuando se ha producido una intoxicación aguda, que luego se repite en el tiempo).
- **Tiempo** que transcurre entre la exposición y la aparición de los primeros efectos tóxicos (periodo de latencia): inmediata (al poco tiempo de haberse producido la exposición) y retardada (cuando aparece al cabo de un tiempo).
- Según se **restablezca el estado** de salud puede ser reversible o irreversible.
- Según el **daño**: local (cuando el daño se produce en el mismo lugar de contacto con el organismo) o sistémica (cuando necesita ser absorbido por el organismo).
- Según su **etiología** pueden ser voluntarias (homicidios, suicidios, drogodependencias y dopaje) y accidentales (ambientales, profesionales,

medicamentosas, alimentarias, domésticas).

Hay dos **DESASTRES** que hay que conocer: el desastre de **Bhopal** y el de **Seveso**. Intoxicación profesional conocida: intoxicación por amianto. Intoxicación alimentaria conocida: desastre de **Minamata**.

El desastre de **Bhopal** (India) se produjo en 1984 al producirse una fuga de **isocianato de metilo** en una fábrica de pesticidas. Se cree que el accidente se produjo al no tomarse las debidas precauciones durante las tareas de limpieza y mantenimiento de la planta, lo que hizo que diversas impurezas que se arrastraban, entraran en contacto con el gas almacenado, iniciando una reacción exotérmica que provocó la apertura por sobrepresión de las válvulas de seguridad de los tanques, liberando gas tóxico a la atmósfera. Este gas se descompuso en ácido cianhídrico generando una nube letal produciendo entre 6.000 y 8.000 muertes (total afectados: 600.000). La intoxicación es ambiental y de carácter agudo (grave, con desenlace fatal).

El desastre de **Seveso** (Lombardía, Italia) fue un accidente industrial que ocurrió en 1976. El accidente produjo la liberación al medio ambiente de cantidades de la **dioxina TCDD** produciendo gran pánico en la población, sin embargo, no murió nadie ni se encontraron malformaciones en niños asociadas al accidente. La intoxicación fue aguda y no letal. Hubo mucha investigación de los efectos crónicos de las dioxinas.

El desastre de **Minamata** (costa occidental de Kyushu, Japón) ocurrió en 1930 y fue un accidente industrial con cerca de 900 muertos y más de 2000 afectados. Lo que ocurrió fue que la fábrica comenzó a utilizar mercurio (se transformó en **metilmercurio**, que produce efectos a nivel del SNC) en los procesos industriales y los residuos se descargaban en la costa (más tarde en la Bahía de Minamata) y en ésta zona la gente se alimentaba básicamente de pescado. Rápidamente empezaron a aparecer efectos secundarios y más tarde se descubrió que había 81 toneladas de mercurio en el fondo de la bahía. El caso de minamata es un claro ejemplo de cómo los contaminantes, en este caso un metal pesado, abocados al agua, pueden llegar a afectar a los seres humanos. Es una intoxicación crónica.

## 2. Cuantificación de la toxicidad

La **toxicidad** es la **actividad biológica**, **vinculada a la estructura química** de un xenobiótico, que se produce generalmente por su **interacción** con moléculas endógenas y que **da lugar a un efecto tóxico**.

La cuantificación es la relación entre los niveles del tóxico en el organismo y los efectos nocivos que provoca en el mismo.

La **toxicidad** es, por tanto, un **concepto relativo de difícil medida** que **depende** de: la **estructura** y forma química del compuesto, las **condiciones** de la exposición (dosis interna) y las **características individuales**.

## 2.1. Estrategia para evaluar la toxicidad general

Para ver si un compuesto nuevo es tóxico o no, lo ponemos en contacto con un ser vivo (**experimentación in vivo**). Se prueban **exposiciones cortas a altas dosis y exposiciones largas a bajas dosis**.

1. En estudios de **toxicidad aguda o dosis única**, el índice de toxicidad utilizado es el **DL50** (dosis letal 50). Esta DL50 se define como aquella cantidad de sustancia que en determinadas condiciones experimentales, produce la **muerte del 50%** de la especie animal dada. La **CL50**, o concentración letal media o concentración letal 50, es lo mismo que la DL50 pero por la **vía inhalatoria o in vitro**. **IC50** o concentración inhibitoria media o concentración inhibitoria 50 es igual que la CL50 pero supone la **inhibición del crecimiento** celular y no la muerte celular.

2. En estudios de **toxicidad crónica o dosis repetida**, el índice de toxicidad utilizado es el **NOAEL** o **LOAEL** (ver 2.3.)

## 2.2. Clasificación y etiquetado de productos químicos

La **clasificación** y etiquetado de productos químicos está definida por el real decreto 1272/2008 y clasifica a los productos en 3 categorías diferentes:

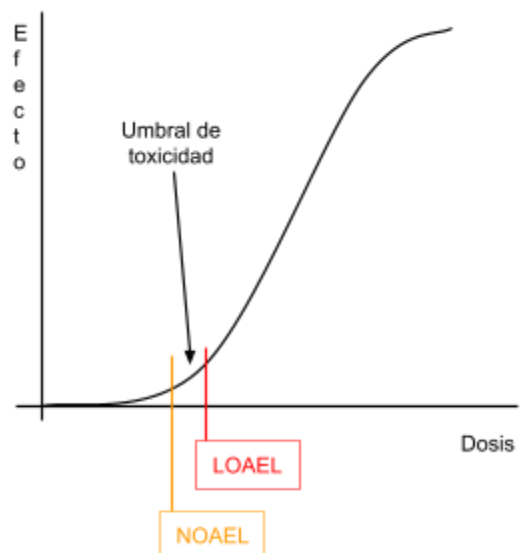
- **Muy tóxico**: **<25 mg/Kg p.c.** (cuanto más baja es la DL50, más tóxico es el compuesto).
- **Tóxico**: **25-200 mg/kg p.c** (p.c = peso corporal)
- **Nocivo**: **200-2000 mg/kg p.c.**

## 2.3. Índices de toxicidad crónica

**NOAEL** (No Observed Adverse Effect Level): es la **dosis sin efecto adverso** observable. Es la mayor dosis de una sustancia, determinada por experimentación, que no produce efectos adversos observables bajo unas determinadas condiciones de exposición. (NOael, NO efecto adverso)

**LOAEL** (Lowest Observed Adverse Effect Level): **dosis más baja capaz de producir efectos adversos**.

Es la menor dosis de sustancia, determinada por experimentación, que produce efectos adversos observables bajo unas determinadas condiciones de



exposición.

Por tanto la NOAEL va antes que la LOAEL y ambos definen el **umbral de toxicidad**. Aquí habría que pedalea un poco porque si lo que define el NOAEL y LOAEL es si hay o no efectos adversos, ¿cómo es posible que exista un rango de dosis entre las dosis que no producen efectos adversos y las que sí (este rango es el umbral de toxicidad)? Esto es porque el estudio está hecho para unas dosis concretas y no se sabe que pasa entre una dosis y otra, por ejemplo, se estudian 100, 200 y 300 mg; y en 100 nos sale que no es tóxico y en 200 sí; pero como no sabemos qué pasa en medio (150mg por ejemplo) porque no hemos estudiado a esas dosis intermedias, a ese “medio” lo llamamos umbral de toxicidad, en el que puede que haya efectos adversos o no, pero no lo podemos saber sin estudiar esas dosis de forma empírica.

Ambas deben ser dosis experimentalmente ensayadas. No se pueden calcular por extrapolación y no siempre es posible calcularlas.

9.9.2014

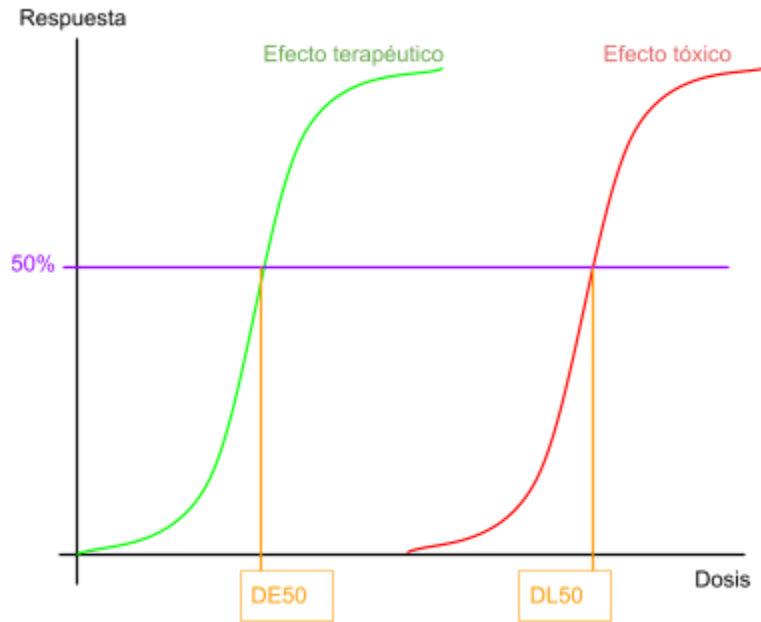
### 3. Selectividad y sensibilidad

La **selectividad** tiene que ver con la forma con que las distintas especies pueden responder ante la agresión a un mismo xenobiótico, lo que da lugar a diferencias interespecíficas. Los distintos órganos responden de forma diferente frente a la agresión de un tóxico (existe la toxicidad órgano-específica).

Por otro lado, la **sensibilidad** es la manera en la que los distintos individuos de una misma especie responden de manera distinta a los efectos tóxicos, lo que da lugar a diferencias interindividuales: personas normales, hipersensibles (a misma dosis, el efecto es exagerado) e hiposensible (a misma dosis, el efecto es menor).

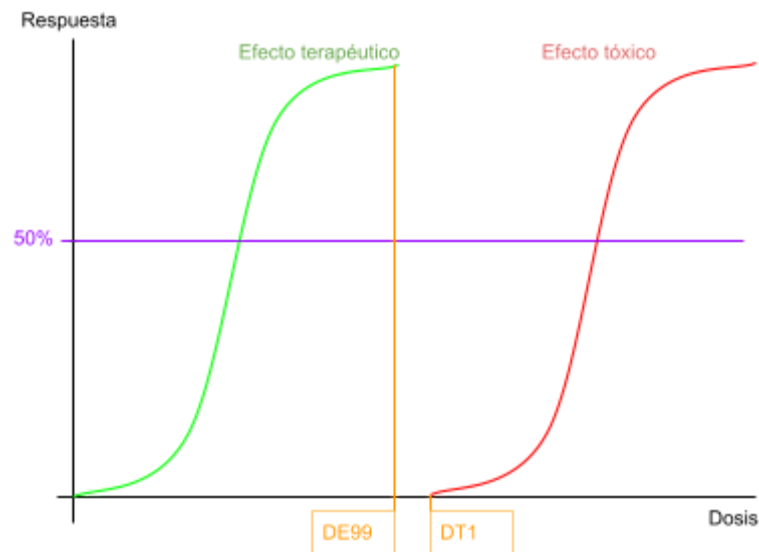
### 4. Índice terapéutico y margen de seguridad

Cuando uno busca un medicamento, busca que sea eficaz y seguro. En la empresa farmacéutica se maneja mucho el concepto de **ventana terapéutica** (o índice terapéutico), que da una idea de la separación que existe entre la dosis tóxica (irreversible o reversible) y la dosis inefectiva.



$$IT = DL50 / DE50$$

El **margen de seguridad** compara el límite inferior de toxicidad (dosis tóxica mínima) y el margen superior de eficacia, es decir, busca la dosis eficaz para el 100% de la población y que no sea tóxica para el 100% de la población. Se busca que tanto la ventana terapéutica como el margen de seguridad sean lo más amplio posible.



$$MS = DT1 / DE99$$

## TEMA 3: FASES DEL FENÓMENO TÓXICO

### 1. Exposición

La **exposición** es el conjunto de factores que permiten la penetración de un xenobiótico hasta el interior del organismo vivo y su absorción. Si no hay exposición no hay riesgo de toxicidad. Es uno de los dos elementos de la evaluación del riesgo (el otro es la toxicidad). Cuando la exposición es no intencionada, resulta muy difícil cuantificarla. Para disminuir el riesgo se toman medidas de reducción de la exposición.

En los **contaminantes ambientales** hay una fase de **producción** que puede ser: emisión cuando el gas va a la atmósfera; descarga cuando va a un medio acuático. El contaminante tiene una determinada cinética, llamada **cinética ambiental**, que puede experimentar fenómenos de transporte (se aleja de la zona de producción), fenómenos de transformación (se puede degradar, convertirse en otro compuesto más tóxico) o puede quedar depositado (en materia inerte o viva). Todo esto determina que pueda haber **exposición** o no.

En los **contaminantes alimentarios**, la mecánica es diferente. Pueden ser metales, COPs y residuos. Son compuestos muy resistentes, desde el punto de vista químico, que permanecen en el medio ambiente y pasan a los animales, y de éstos a la especie humana. Existen estudios que han observado la presencia de medicamentos en agua potable, incluso después de haber pasado los procesos de depuración.

Existen dos **formas de exposición**: la intencionada (usada en experimentos y en clínica) y la no intencionada (en el ambiente, alimentos y mundo laboral → generalmente más difícil de cuantificar).

La **disponibilidad física** determina la cantidad de tóxico en forma activa disponible para la penetración. Mientras que la **disponibilidad biológica** es, una vez que se ha producido la exposición y en función de todos los procesos cinéticos, la cantidad de tóxico en forma activa disponible para la acción.

### 2. Vías de penetración y procesos de tránsito

Las **vías naturales** de penetración son la oral, inhalatoria y la dérmica. Cuando se clasifican los productos químicos en función de su toxicidad, se estudian estas vías (no se estudia la intravenosa por ejemplo). Las **vías experimentales** son la intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa.

La absorción supone el paso del xenobiótico a la sangre.

Lo ideal de un aditivo alimentario es que no se absorba (así no habrá que estudiar su toxicidad). Si se absorbe, puede ser que se almacene en la bilis, en el hígado, sangre, riñón, en diversos tejidos reservorios como la grasa, huesos y tejidos blandos. Puede eliminarse por la orina y pulmones.

La **toxicocinética** / farmacocinética estudia el compuesto una vez que se ha absorbido. Es el conjunto de procesos que tienen lugar dentro del organismo y que determinan la cantidad de xenobiótico que será capaz de reaccionar con la molécula endógena. La toxicocinética estudia, o bien dosis altas de medicamentos en las que puede cambiar el comportamiento cinético, o bien la cinética de xenobióticos que son tóxicos.

Los procesos que tienen lugar son: absorción, distribución, biotransformación, fijación (puede quedar retenido en el tejido → es un factor a tener en cuenta porque puede ser la causa de la alta toxicidad) y eliminación.

Si un xenobiótico es muy tóxico pero no hay exposición, no nos afecta. Si no se absorbe no pasa nada. Si se absorbe y se elimina nos importará en función de cuanto se elimine/absorba. Si se absorbe y queda retenido en el tejido es lo más grave.

Un xenobiótico, en el proceso de tránsito, está continuamente atravesando membranas. Los compuestos que más se absorben son los lipófilos, como el metilmercurio, por eso es muy tóxico.

### Sistemas de transporte

- **Difusión simple o pasiva**. Es lo más habitual para los xenobióticos. Lo característico de este sistema de transporte es que va a favor de gradiente y no requiere energía. La velocidad de paso es proporcional al gradiente de concentración y también influye la liposolubilidad del xenobiótico, el grado de ionización.
- Los xenobióticos pueden utilizar sistemas de transporte proteicos, aunque tienen que tener similitud estructural con el receptor. Es el caso de la **difusión facilitada** (a favor de gradiente y mediante proteína transportadora) y el **transporte activo** (en contra de gradiente, mediante proteína transportadora, necesita energía). No es lo habitual en xenobióticos.
- También pueden presentar fenómenos de **fagocitosis y pinocitosis**, en la que hay una incorporación de partículas sólidas o líquidas en las células. Tiene mucha importancia en el pulmón aunque este tipo de transporte no es muy habitual.

Ahora vamos a ver las absorciones a través de las tres vías naturales: dérmica,

inhalatoria y oral.

### 3. Absorción dérmica

La **piel** es una **barrera** muy importante que impide el paso de sustancias extrañas. De cara a la absorción por esta vía, **influye el pH, la temperatura** y el uso de **disolventes** (DMSO facilita absorción de muchos xenobióticos a través de la piel). Hay muchas diferencias interespecíficas.

¿Qué xenobióticos atraviesan la barrera? Los tóxicos de **pequeño tamaño** y muy **liposolubles**, como el **tetracloruro de carbono** (usado como disolvente, aunque ahora no se utiliza por su toxicidad), el **gas sarín** (produjo intoxicación en el metro de Tokio), **paraquat** (es un insecticida), **paratión** (insecticida organofosforado), **anilinas y aminas orgánicas** (utilizadas en síntesis orgánica y que se absorben totalmente a través de la piel). También la atraviesan los tóxicos **hidrosolubles muy pequeños** como la **hidrazina**.

Las vías de riesgo son las industrias químicas y las labores agrícolas.

### 4. Absorción inhalatoria

El **pulmón** es la vía de **penetración de gases** (CO, NO<sub>2</sub>, NO, SO<sub>2</sub>), **vapores líquidos volátiles** (como el **benceno**, el **tetracloruro de carbono**), **aerosoles** y partículas en suspensión.

La **velocidad de difusión es mayor para gases y vapores** ya que son muy solubles. Sin embargo, las **partículas y aerosoles penetran más lentamente** y pueden ser absorbidas por **pinocitosis**. Muchas veces son retenidas en las partes superiores del pulmón.

10.9.2014

### 5. Absorción oral

Los xenobióticos se pueden absorber a lo largo del tracto gastrointestinal (medio externo) pero fundamentalmente en el **intestino**, que muestra una **mayor superficie de absorción**. La superficie de absorción relativa de los distintos tejidos es: esófago 0.02, estómago 0.1, intestino delgado 100, intestino grueso 1, recto 0.05.

En la absorción, **influye el pH** del xenobiótico, de modo que los xenobióticos con características de **ácido débil** se absorben preferentemente en el **estómago**, mientras que las **bases débiles** se absorberán preferentemente en el **intestino**. El pH ácido favorece que los ácidos débiles se encuentren en su forma no ionizada.

Para saber en qué proporción está la forma no ionizada:  $pK_a - pH = \log(\text{no ion})/(\text{ion})$ . El ácido benzoico tiene un  $pK_a$  de 4, por tanto:  $4 - 2$  (estómago) =  $\log(\text{no ion})/(\text{ion}) = 100$ . Tenemos 100 veces más la forma no ionizada que la forma ionizada. En el caso de la anilina que tiene un  $pK_a$  de 5, nos sale que la forma ionizada tiene una proporción 1000 veces superior a la no ionizada (porque es básica y hay que darle la vuelta a la fórmula).

Las **enzimas** presentes en el tubo digestivo pueden neutralizar algunos xenobióticos, como el veneno de serpiente, y dar lugar a **nuevos compuestos**, como la conversión de nitratos en nitritos por las nitratorreductasa bacterianas. Los nitritos se utilizan como conservantes. Estos nitritos tienen una posible reacción con aminas endógenas dando lugar a **nitrosaminas**. Todo esto ocurre en el intestino. Las nitrosaminas son compuestos cancerígenos.

La presencia de **alimentos** puede afectar a la absorción de xenobióticos favoreciéndola o disminuyéndola.

## 6. Distribución

La distribución es el proceso de **tránsito** del xenobiótico en el organismo hasta alcanzar un equilibrio de concentración en los distintos compartimentos celulares.

Se realiza a través de la sangre. La **cantidad** de xenobiótico que llega a un órgano depende de: la **concentración plasmática** del xenobiótico, **flujo sanguíneo** en el órgano, facilidad de xenobiótico para atravesar los capilares (liposolubilidad), que depende de sus propiedades fisicoquímicas y de la estructura de los capilares (capilares más permeables están en el hígado), **afinidad** del xenobiótico por componentes celulares.

Algunos originan el daño una vez llegan a la sangre, por ejemplo, el CO.

Muchos xenobióticos se transportan unidos a proteínas plasmáticas, fundamentalmente a la albúmina. La unión a proteínas disminuye su distribución a tejidos y retrasa su eliminación del organismo. Esto se traduce en una elevada semivida plasmática.

La unión a proteínas es una unión reversible mediante enlaces no covalentes y se puede verse afectada por la presencia de otros xenobióticos con mayor afinidad (desplazamiento del xenobiótico, dando lugar a fenómenos de desplazamiento que, en ocasiones, pueden ser causa de toxicidad, por aumento brusco de la concentración plasmática.

La **barrera hematoencefálica** constituye un obstáculo para la llegada de xenobióticos

al SNC. Es un sistema de protección para los agentes tóxicos y supone un problema para el acceso de determinados fármacos. Las causas anatómicas que hacen que esta barrera tenga estas características en concreto son: las células endoteliales están muy juntas (a diferencia de los capilares del hígado, que son muy permeables), rodeadas de célula de glia, con bajo contenido proteico en el espacio intercelular. La barrera no está del todo desarrollada en el recién nacido.

La **barrera placentaria** es un órgano feto-materno cuya función es: el intercambio de productos metabólicos y gaseosos entre la circulación materna y la fetal, la producción de hormonas y la función de barrera. El desastre de minamata produjo intoxicación fetal grave por metilmercurio. La barrera placentaria es una barrera menos selectiva (que la del SNC), muchos xenobióticos pueden atravesar por difusión simple, otros por difusión facilitada o por sistemas especializados de transporte.

## 7. Fijación

La fijación es un proceso por el que algunos tóxicos quedan **retenidos** en ciertos tejidos. Las principales causas de fijación son el **transporte activo** (el paraquat produce una toxicidad sistémica y se almacena en el pulmón, produciendo fibrosis pulmonar), **afinidad por una estructura o proteína** (se quedan retenidos en un tejido. El cadmio produce toxicidad renal porque se acumula en el riñón, al haber una proteína llamada metaloproteína que lo almacena) y **solubilidad** en una fase (esto ocurre con compuestos muy liposolubles como dioxinas, difenilos policlorados, etc, que se almacenan en el tejido adiposo produciendo toxicidad).

Algunos xenobióticos se acumulan en el **órgano/tejido diana** (aquel en el que el tóxico ejerce preferentemente su acción). Ej: el paraquat en los pulmones; flúor y estroncio en los huesos; cadmio en el riñón. Otros xenobióticos se acumulan en un tejido distinto, como el plomo, que pasa del hígado al hueso, donde no es tóxico. Los PCBs y las dioxinas se acumulan en la grasa.

En dichos tejidos no ejercen un efecto tóxico pero se produce un fenómeno de bioacumulación y de biomagnificación, y además existe el riesgo de biodistribución del tóxico en el organismo como consecuencia de cambios fisiológicos.

La **bioacumulación** es el aumento progresivo de la concentración de xenobiótico en el tejido de un determinado organismo; se aplica en particular a los compuestos muy liposolubles en el tejido graso.

La **biomagnificación** es lo mismo pero cuando aumenta la concentración de dicho xenobiótico a medida que se asciende en la escala filogenética, es decir, los animales

mayores van acumulando más xenobiótico ya que éste nunca se degrada. Supone un peligro para la propia especie animal y una fuente de transmisión al ser humano a través de la alimentación.

## 8. Excreción

La excreción es el conjunto de procesos que conducen a la **eliminación** de la estructura primaria del xenobiótico y de sus metabolitos del organismo.

Las vías de excreción son: la urinaria, biliar, pulmonar y las glándulas (mamarias, sudoríparas, salivales, lacrimales).

La **excreción RENAL** tiene 3 pasos:

- **Filtración glomerular**: los xenobióticos unidos a albúmina no pueden ser filtrados. El factor limitante es el tamaño.
- **Difusión pasiva tubular**: se dan fenómenos de reabsorción tanto en el túbulo proximal como distal que pueden ser modulados variando el pH. En ocasiones se dan fenómenos de obstrucción tubular por precipitación.
- **Transporte activo**: algunos xenobióticos utilizan sistemas de transporte de cationes o aniones no muy específicos. Pueden ser sistemas de secreción y también de reabsorción, en cuyo caso pueden ser causa de retención en el riñón.

La determinación de metabolitos en orina es una forma relativamente sencilla para demostrar la exposición a un xenobiótico; es lo que llamamos: “**biomarcador de exposición**”.

En la **excreción BILIAR**, la bilis cumple un papel importante. El xenobiótico pasa a través del conducto biliar para llegar al intestino. Esta excreción está reservada para conjugados con el ácido glucurónico y el glutatión. Estos conjugados son reconocidos por sistemas especializados de transporte. Es susceptible a los fenómenos de saturación y de inhibición competitiva puesto que operan sistemas especializados de transporte. No está completamente desarrollado en el feto.

Muchos xenobióticos pueden excretarse a través de la leche (**excreción vía glándulas mamarias**) lo que supone un riesgo para el recién nacido (el niño está expuesto a los xenobióticos que la madre toma por la dieta, por ejemplo).

Los conjugados se hidrolizan por las bacterias intestinales dando lugar al compuesto libre, el cual podrá reabsorberse de nuevo, completándose el **ciclo enterohepático**.

11.9.2014

## Ejercicios de clase

Para que una DL50 esté bien definida hay que dar: **unidades** (mg/kg), la **especie** y la **vía de administración**.

**Problema 1.** La comparación de la dosis letal de un compuesto según las distintas vías de penetración, informa sobre la absorción del mismo.

	Pentobarbital	Isoniazida	Procaína	DFP
Vía administración	DL50	DL50	DL50	DL50
oral	280	142	500	4
subcutánea	130	160	800	1
intramuscular	124	140	630	0.85
intraperitoneal	130	132	230	1
intravenosa	80	153	45	0.34

- El compuesto más tóxico por vía intravenosa es el DFP porque es el que menor DL50 tiene. El menos tóxico es la isoniazida.
- El más tóxico por vía oral es el DFP y el menos tóxico es la procaína.
- ¿Por qué vía resulta menos tóxico cada uno de ellos? pentobarbital-oral, isoniazida-subcutánea, procaína-subcutánea, DFP-oral.
- ¿Qué concluiría sobre la absorción de cada uno de estos compuestos por las distintas vías? En la isoniazida hay valores muy parecidos de DL50, podríamos asumir que no hay mucha diferencia entre las distintas vías. La procaína sin embargo, presenta diferentes absorciones ya que los valores de la DL50 en las diferentes vías de administración es muy diferente.

La DL50 que sacamos de un estudio de toxicidad aguda no tiene que ser un dato muy exacto, es un dato aproximado y orientativo.

**Problema 2.** Calcule la concentración que tiene que preparar para administrar una dosis de 1 mg/kg a ratas de aproximadamente 250 g de peso si el volumen de administración es de 10 mL/Kg. Obtenga una fórmula general y sencilla para hacer ese cálculo. ¿Qué volumen mínimo prepararía si va a administrar esa dosis a 10 animales?

- $1 \text{ mg/kg} \cdot 1\text{kg}/1000\text{g} \cdot 250 = 0.25 \text{ mg}$

- $10 \text{ ml/kg} \cdot 1 \text{ kg/1000g} \cdot 250 = 2.5 \text{ mL}$
- $0.25 \text{ mg}/2.5 \text{ mL} = \mathbf{0.1 \text{ mg/mL}}$
- El volumen para los 10 animales sería:  $2.5 \text{ mL} \cdot 10 \text{ mL} = \mathbf{25 \text{ mL}}$

**Problema 3.** Imagine que tiene que ensayar la toxicidad in vitro de un compuesto y que va a probar las siguientes concentraciones finales en medio de cultivo: 2; 1; 0,5; 0.25; 0.1 mg/mL.

Suponga que el ensayo lo realiza en placas de 96 pocillos y que esa concentración final se alcanza añadiendo 50 microlitros a 200 microlitros de medio de cultivo. De cada concentración va a hacer 4 réplicas (4 pocillos).

a) Diga qué concentración necesitará preparara para conseguir los 2 mg/mL de concentración final y qué volumen mínimo necesitará preparar de esa concentración

b) haga los cálculos para preparar las diluciones seriadas más bajas a partir de esta concentración.

a)  $2 \text{ mg/mL} \cdot 1 \text{ microlitro} / 1000 \text{ mL} \cdot 250 \text{ microlitros} = 0.5 \text{ mg}$

$0.5 \text{ mg} / 50 \text{ mL} = \mathbf{10 \text{ mg/mL}}$

## TEMA 4: BIOTRANSFORMACIÓN

### 1. Introducción a la biotransformación

La **biotransformación** es el **conjunto de cambios químicos** que se producen en la estructura del xenobiótico y que tienen lugar en el organismo para hacerlo más soluble y de este modo poder eliminarlo del organismo. Dicho de otro modo: es un conjunto de reacciones **enzimáticas** que introducen cambios en las estructuras químicas de los xenobióticos con objeto de favorecer su eliminación.

Participan una gran diversidad de enzimas y las reacciones son también muy variadas, de tal manera que un mismo xenobiótico puede dar lugar a **distintos metabolitos**.

El tipo de reacciones que experimenta un xenobiótico viene determinado por su estructura química y, si bien se puede predecir, es necesario **estudiar el metabolismo caso por caso**.

El metabolismo es un aspecto clave tanto en el efecto terapéutico de los fármacos como en el efecto tóxico de xenobióticos en general.

En general el metabolismo facilita la eliminación del xenobiótico del organismo, por lo que sería un proceso detoxificador, pero en ocasiones da lugar a metabolitos tóxicos, en cuyo caso se habla de **bioactivación**.

### 2. Tipos de reacciones y localización

A medida que un compuesto se **metaboliza**, se vuelve más hidrosoluble.

El xenobiótico sufre una **reacción de FASE I** para dar lugar al metabolito 1, en el que pierde los grupos: **OH, SH, NH<sub>2</sub>, COOH**, mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis.

En la **reacción de FASE II**, el metabolito 1 pasa a ser metabolito 2 dando lugar a un conjugado que es mucho más hidrosoluble y fácil de eliminar. El metabolito se conjuga con: **glucurónico, glutatión, sulfato, aminoácidos, grupos acetilo y metilo**.

Una molécula que no haya pasado la reacción de Fase I puede experimentar una reacción de Fase II (aunque al revés es más raro).

Estas reacciones de biotransformación **ocurren en** muchos **ÓRGANOS**, pero el principal es el **hígado**. Otros órganos son: el **pulmón, intestino, riñón, piel, músculo**.

gónadas y bacterias intestinales.

**Dentro de cada CÉLULA**, la biotransformación tiene lugar en unos lugares concretos: retículo endoplasmático liso, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, citosol.

Si queremos hacer un estudio con enzimas humanas pero no las tenemos, podemos hacer lo siguiente: extraer y homogeneizar una parte del hígado de un ratón y centrifugarlo a 9000g para que se depositen en el fondo los órganos enteros. Recogemos el sobrenadante y tenemos la **fracción S9**, que son todo enzimas solubles. Si esta fracción la centrifugamos a 100.000 (nos hemos pasado con los ceros?) obtenemos la fracción citosólica y microsomal, que son mucho más puras.

Tanto las fracciones S9 como fracciones más purificadas se utilizan en **sistemas experimentales invitro carentes de enzimas humanas**.

### 3. Reacciones de oxidación

#### 3.1. Reacciones de oxidación catalizadas por el CYP450

El 90% de los xenobióticos sufren reacciones de **OXIDACIÓN**. Las reacciones de oxidación son catalizadas por el **CYP450**, enzimas dependientes de **FAD** o flavín monooxigenasa, **amino oxidasa, alcohol y aldehído deshidrogenasas, ciclooxigenasas**.

El CYP450 se encuentra unido a otras enzimas como la reductasa y otras enzimas detoxificadoras. Todo forma el complejo del citocromo P450.

El **CYP450** lo que hace es añadir un único átomo de oxígeno. La enzima es una monooxigenasa mixta, porque añade un único átomo de oxígeno y porque es muy poco específica. Se utiliza una molécula de oxígeno y al final de la reacción se libera una molécula de agua.



El sistema citocromo P450 juega un papel fundamental en: la duración e intensidad del efecto de medicamentos; bioactivación y **detoxificación** de xenobióticos (en general); **biosíntesis** y **catabolismo** de hormonas esteroideas, ácidos grasos, ácidos biliares y vitaminas liposolubles.

El CYP450 es una hemoproteína. Tiene un átomo de hierro, que cuando está en estado  $\text{Fe}_3^+$  es capaz de incorporar el sustrato formándose el complejo enzima sustrato  $\text{P450-Fe}_3^+$ . El siguiente paso es la pérdida de un electrón, quedando  $\text{P450-Fe}_2^+$  (se reduce). El siguiente paso de la reacción consiste en la incorporación de una molécula

de oxígeno al complejo enzima-sustrato. En el siguiente paso se incorpora otro electrón (las enzimas sólo pueden ceder electrones de uno en uno). Luego se libera una molécula de agua y por último el SOH se incorpora al xenobiótico y la hemoproteína queda como al principio (es un ciclo).

La **HIDROXILACIÓN** es la reacción más frecuente catalizada por el citocromo P450. La reacción de hidroxilación se da en: **átomos de carbono** (generalmente en hidrocarburos aromáticos: benceno → fenol), en **funciones aminas** (anilina → fenilhidroxilamina. Aunque la fenilhidroxilamina es más tóxica que la anilina).

La hidroxilación transcurre a través de la **formación de epóxidos**, compuestos muy reactivos con macromoléculas endógenas. El cloruro de vinilo da lugar a un intermediario epóxido y éste se convierte en cloracetato (muy tóxico). El naftaleno da lugar a un intermediario epóxido y el organismo tiene una enzima específica (epóxido hidrolasa) que permite la detoxificación del intermediario y de otros epóxidos.

### Nomenclatura CYP450

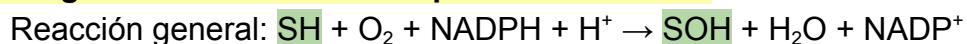
El citocromo P450 es una familia muy numerosa que cataliza una gran cantidad de compuestos endógenos y exógenos (medicamentos y otros xenobióticos). Se conoce bien la secuencia de aminoácidos. En función de esta secuencia de aminoácidos se agrupan en familias, subfamilias e isoenzimas. Para denominar correctamente a un citocromo, la nomenclatura es CYP, espacio, número, letra, número. El número nos determina la familia (de 1 a 4. Da una identidad superior al 40%). La letra identifica la subfamilia (de A a E. Da un 55% de identidad, es decir, se parecen más entre sí los de la misma familia que los de la misma subfamilia). Ej: CYP 2B1, CYP 2B2, CYP 2B3.

En el ser humano se han descrito más de 18 familias y 43 subfamilias. Los CYP1, 2, y 3 son responsables de la oxidación de aproximadamente el 90% de los fármacos y también de algunas reacciones raras de reducción. Los CYP4, 11, 17, 19 y 21 se encargan del metabolismo de compuestos endógenos.

Se han descrito más de 57 genes CYP humanos activos, 58 pseudogenes y 450 alelos CYP. Algunos son muy polimórficos, como los de la clase 1: CYP 2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 y CYP2C19; mientras que los de la clase 2 son poco variables: CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4.

## 3.2. Reacciones de oxidación catalizadas por otras enzimas

### Las monooxigenasas microsomales que contienen FAD

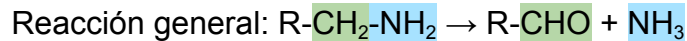


Así como en el CYP450 las reacciones eran de hidroxilación, aquí se producen reacciones de oxidación de nitrógeno, azufre y fósforo. Se han escrito varias isoformas

(FMO1-6). La deficiencia en la isoforma FMO3 da lugar al síndrome del olor a pescado (metaboliza la metilamina).

### Las monoaminoxidasas (MAO) y diaminoxidasas (DAO)

Las MAO son enzimas mitocondriales presentes en el sistema cardiovascular. Metabolizan aminas endógenas y exógenas. Las DAO son enzimas citosólicas.



### La aldehído deshidrogenasa (AIDH) y la alcohol deshidrogenasa (ADH)

Es responsable del metabolismo del 95% del alcohol etílico. La capacidad detoxificante para eliminar el alcohol etílico depende de esta enzima.



El siguiente paso es convertir el aldehído en grupo carboxílico:  $\text{R-CHO} \rightarrow \text{R-COOH}$

### La oxidación acoplada a la síntesis de prostaglandinas (COX)

La síntesis de prostaglandinas es a partir del ácido araquidónico a través de las ciclooxigenasas. Hay dos isoformas, la COX1 (constitutiva) y la COX2 (que es inducible). En el primer paso se pierde un átomo de oxígeno, que puede incorporarse al xenobiótico.

17.9.2014

## 4. Reacciones de reducción

Los principales **agentes reductores** son el **FAD, FMN, NAD, NADP** y el **glutatión reducido** (GSH). Las moléculas que pueden experimentar reducción son los **aldehídos, cetonas, sulfóxidos, N-óxidos, -N=N-, NO<sub>2</sub>**.

En condiciones de baja concentración de oxígeno, un compuesto puede volverse más tóxico de lo que ya era.

Los **enzimas** que participan en las reducciones son: el **CYP450, carbonil reductasa, alcohol deshidrogenasa, NADPH cit. P450 reductasa, enzimas bacterianas, DT-diaforasa**.

## 5. Reacciones de hidrólisis

Se produce una rotura del xenobiótico con una molécula de agua dando lugar a un producto con un grupo carboxilo, que es susceptible de sufrir reacciones de fase 2. Estas reacciones suelen ser de **detoxificación**. Ej:

- $R - COOR' + H_2O \rightarrow R - COOH + R'OH$ . La enzima es la **esterasa** (colinesterasas del plasma o acetilcolinesterasas de eritrocitos).
- $R - CO-NR'R'' + H_2O \rightarrow R - COOH + HN-R'R''$ . Mediante una **amidasa**
- $R - CO-S-R' + H_2O \rightarrow R - COOH + HS-R'$ . **Tioesterasa**

El paratión, por una desulfuración oxidativa, da lugar al paraoxón, que es un compuesto más activo (reacción de bioactivación).

## 6. Reacciones de fase II

Existen varias posibles conjugaciones. De más a menos frecuente (ver imágenes en diapos → lo importante son las enzimas):

**Conjugación con el ácido glucurónico mediante la UDP-glucuronosiltransferasa:** afecta a todos los xenobióticos que en su estructura tengan un grupo **R-OH, R-COOH, R-NH<sub>2</sub>, R-SH**. El ácido glucurónico se sintetiza a partir de la glucosa 1-P, que mediante UTP se forma la UDP-α-D glucosa, que reacciona con agua y 2NAD para dar lugar al ácido-UDP-α-D glucurónico, el cual se une al metabolito dando lugar al conjugado. El conjugado tiene un grupo carboxílico que lo hace más liposoluble y hace que el transportador de aniones del hígado y riñón puedan identificarlo.

**Conjugación con el glutatión (GSH) mediante la glutatión transferasa:** afecta a todos los xenobióticos que en su estructura tengan **epóxidos y compuestos halogenados**. El glutatión es un tripéptido constituido por el ácido glutámico, cisteína y glicina.

Luego puede ocurrir una reacción de fase II en la que el xenobiótico queda unido a la cisteína (primero se pierde el ácido glutámico). El grupo amino sufre una acetilación dando lugar a un conjugado mercaptúrico (con N-acetilcisteína).

**Conjugación con sulfato mediante la sulfatotransferasa:** afecta a todos los xenobióticos que en su estructura tengan **R-OH y R-NH<sub>2</sub>**. La cisteína mediante 2 ATP da lugar a la sulfurilasa, liberándose una molécula de ADP, y dando lugar a la 3' fosfoadenosin 5' fosfosulfato. La reacción de conjugación consiste en la conversión de  $CH_3-CH_2-OH$  en  $CH_3-CH_2-O-SO_3H$  mediante PAPS-sulfotransferasa.

**Conjugación con aminoácidos mediante la aciltransferasa:** afecta a todos los xenobióticos que en su estructura tengan **R-COOH**. Una vez que tenemos el xenobiótico activado, se produce la acilación (glicina proporciona el grupo acetato) y mediante la aciltransferasa se convierte en benzoilglicina (ácido hipúrico).

**Metilación:** afecta a todos los xenobióticos que en su estructura tengan **R-OH, R-NH<sub>2</sub>**,

R-SH.

**Acetilación:** afecta a todos los xenobióticos que en su estructura tengan R-NH<sub>2</sub>, R-NHNH<sub>2</sub>, R-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. El donador de los grupos acetilos es el acetilCoA.

Preguntas: ¿Qué es el glutatión; qué es el CYP450 y qué reacciones cataliza?.

Sustrato	Conjugado con	Enzima
OH, COOH, NH <sub>2</sub> , SH	Ác. glucurónico	UDP-glucuronosiltransferasa
Epóxidos y halógenos	Glutatión	Glutatión transferasa
OH, NH <sub>2</sub>	Sulfato	Sulfatotransferasa
COOH	Aminoácidos	Aciltransferasa
OH, NH <sub>2</sub> , SH	Metilo	Metiltransferasa
NH, NHNH <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Acetilo	N-acetiltransferasa

## TEMA 5: FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DISPONIBILIDAD BIOLÓGICA

El efecto de un xenobiótico depende de su estructura.

### 1. Factores químicos y biológicos

Los **químicos** son: lipofilia, pKa, ionización, tamaño, estructura, quiralidad (puede ser que un estereoisómero tenga más afinidad por una proteína que otro).

Los **biológicos** son: la especie (hay diferencias interespecíficas en los distintos procesos: absorción, distribución, excreción y biotransformación). Hay otras que dan lugar a diferencias interindividuales, como los factores genéticos, edad, sexo, estado.

Los animales en general tienen una mayor absorción que los humanos.

### 2. Diferencias interespecíficas

En cuanto a las diferencias interespecíficas en la **distribución**, hay variaciones en los tipos y concentración de proteínas plasmáticas, distribución y proporción de la grasa corporal, sistemas especializados de transporte, velocidad de metabolización y excreción. El mono y el hombre se parecen mucho en cuanto a la distribución.

En cuanto a la **excreción urinaria**: el volumen urinario cambia mucho (está regido por el peso)

En cuanto a la **excreción biliar**: compuestos con un peso molecular alto (superior a 300) tienden más a excretarse por esta vía. A mayor peso molecular, mayor excreción vía bilis.

En cuanto a la **biotransformación**: es la mayor fuente de diferencias tanto interindividual como interespecífica. Pueden ser **cualitativas** (perros no acetilan las aminas aromáticas, gatos son deficientes en UDP-glucuroniltransferasas, los cerdos no forman conjugados con el sulfato, las cobayas no forman conjugados con el ácido mercaptúrico, la conjugación con aminoácidos está determinada filogenéticamente) o **cuantitativas** (son más frecuentes. Las anfetaminas se metabolizan de forma diferente en el conejo -da lugar al derivado acetilado- que en el perro -da lugar al derivado hidroxilado-)

Las diferencias interespecíficas en la biotransformación suponen un inconveniente a la

hora de extrapolar los resultados. Hoy en día se pueden estudiar porque disponemos de sistemas invitro de metabolismo humano y otras especies.

### 3. Diferencias interindividuales

#### Variaciones genéticas

**Definiciones:** **salvaje/agreste** (versión más común de un gen), **variante** (versión poco común de un gen) y **polimorfismo** (si está presente en **menos del 1%** de la población, es una **mutación rara**; si está presente en **más del 1%** de la población, es un **polimorfismo genético**).

Posibles **variaciones:** **SNPs o single nucleotide polymorphisms** (variaciones en **un único par de base**), **CNV o copy number variation** (son variaciones en el **número de copias de un gen**), **deleciones o inserciones** de un único o **unos pocos pares de base**, **cambios citogenéticos** (translocaciones, duplicaciones, inserciones y deleciones). Las variaciones van de **menor a mayor segmento de ADN afectado**. El **haplotipo** es el conjunto de **variaciones o polimorfismos que tienden a heredarse**.

Un **alelo** es **uno o más versiones de un gen**. El ser humano es un organismo diploide y hereda un alelo de cada uno de los progenitores. Actualmente se emplea también para describir la variación entre secuencias de ADN no codificadoras. Si las copias son iguales, se habla de homocigosis y si son distintas heterocigosis.

El **genotipo** es el **conjunto de genes** de una persona. El **fenotipo** es el **conjunto de rasgos observables** de una persona. **Resulta de la expresión de los genes** pero los **factores ambientales** pueden tener también influencia.

Las **variantes genéticas** en genes de **proteínas enzimáticas** dan lugar a 4 fenotipos posibles: **metabolizadores pobres** (PM), **metabolizadores intermedios** (IM), **metabolizadores extensos** (EM), **metabolizadores ultrarrapidos** (UM)

#### Edad

Con la edad hay ciertas cosas que cambian, por ejemplo: el **pH** de los recién nacidos, la **flora microbiana intestinal** en el recién nacido, los **déficits de enzimas** en el recién nacido (**CYP450, glucuroniltransferasas**), **motilidad intestinal** y **concentración de albúmina** en ancianos.

#### Sexo

El **metabolismo** está más **acelerado en machos**: el **hexobarbital** tiene mayor efecto en **hembras** mientras que el **CCl4** es más tóxico en **machos**.

#### Estados fisiológicos

### **Ritmos circadianos**

La exposición a xenobióticos puede producir **inducción enzimática**, que puede traducirse en un aumento o disminución de la toxicidad. Hay algunos xenobióticos que son específicos para las familias de citocromos: **HAP** (CYP1A, hasta 20 veces), **fenobarbital** (CYP2B1>20), **etanol** (CYP2E1 2-5), **clorofibratos** (CYP4A>40).

## TEMA 6: MECANISMOS DE TOXICIDAD

Dentro de la disponibilidad física y biológica (ver temas anteriores), la biológica engloba la toxicodinámica que es lo que vamos a estudiar en este tema.

La fase **toxicodinámica** es la **sucesión de hechos que tienen lugar tras la interacción de la estructura activa del xenobiótico con una molécula endógena**.

Por norma general, conocer estos mecanismos es muy complicado, pero su conocimiento constituye la base para:

- Interpretar los datos de la toxicología descriptiva
- Establecer procedimientos para prevenir o contrarrestar los efectos tóxicos
- Diseñar métodos complementarios *in vitro*
- Diseñar modificaciones en las estructuras de los xenobióticos para reducir o eliminar sus efectos adversos, o bien para aumentar su toxicidad selectiva
- Hacer mejores estimaciones del riesgo.

El xenobiótico (1) **interactúa** con una molécula endógena (primera interacción): membrana, ADN, proteína, etc, y esto va a provocar una (2) **lesión celular**, afectando a la **función celular** (síntesis de ATP, etc) o a la **estructura**. Si esto ocurre en muchas células, aparecen (3) **manifestaciones clínicas**.

- Durante la **necrosis** celular, las células se **hinchán** hasta que se rompen, vertiendo el **contenido hacia el exterior**, desencadenando una **reacción inflamatoria**. Las células mueren por **necrosis** si sufren **graves daños o agresiones** repentinas; también por **isquemia**. El contenido de las células necrosadas se derrama al tejido circundante, generando una respuesta inflamatoria que puede provocar daños adicionales e incluso la muerte de las células adyacentes. La necrosis suele afectar a grupos de células, **zonas tisulares** y es **fácil de identificar**.
- La muerte celular por **apoptosis** tiene un mecanismo completamente diferente al anterior, ya que la célula se **encoge** y el ADN se agrega y se fragmenta y finalmente es **fagocitada** por las células adyacentes. Lo normal es que ocurra en **células aisladas**. **No provoca respuesta inflamatoria** y puede pasar **desapercibida** en un tejido.

El xenobiótico puede producir un efecto local (no es letal) o bien puede absorberse y producir un efecto sistémico.

La **toxicidad** puede ocurrir por la simple **presencia** del xenobiótico **en un determinado**

## lugar

En otros casos, la toxicidad puede ser **sistémica**, debida (por ejemplo) a una reacción química (paracetamol). La toxicidad sistémica puede ser **reversible** (tetradotoxina) o **irreversible** (CCl<sub>4</sub>). Si es reversible se puede reparar (aunque no durante largos tiempos de exposición: el tejido se cansa de reparar y aparece necrosis, fibrosis y tumores). Sulfonamidas → se comprobó que tenían toxicidad renal porque cristalizaban en el túbulo y lo obstruían, produciéndose una necrosis renal.

## 1. Factores toxicocinéticos

Unos **favorecen** la toxicidad, como la **absorción** del xenobiótico, la **distribución** por el organismo, la **reabsorción** en los túbulos renales o intestino y la **bioactivación**; mientras que otros **obstaculizan** la toxicidad, como la **excreción** del tóxico (presistémica: efecto de primer paso), **retención en órganos no diana**, **detoxificación**.

Pueden ocurrir tres tipos de situaciones: que se elimine, que se quede fijado o que produzca un efecto adverso.

Podemos distinguir dos grandes **grupos** de tóxicos: indirectos y directos.

Los **directos** son aquellos que **no** necesitan de un proceso de **biotransformación** para ejercer su toxicidad, estos son el CO, HCN, Pb.

Los tóxicos **indirectos** necesitan de un proceso de **biotransformación** y el responsable de la toxicidad es un **metabolito** y no el compuesto original (ej: paracetamol, CCl<sub>4</sub>, metanol). Tras la bioactivación, se forma el metabolito, que tiene: nuevas propiedades fisicoquímicas (etilenglicol), **mayor reactividad** (paratión) y **conversión de moléculas indiscriminadamente reactivas** (electrofilico tipo paracetamol o radical libre tipo CCl<sub>4</sub>).

## 2. Toxicidad por compuestos electrofílicos

Los **compuestos electrofílicos** son moléculas que contienen un **átomo deficiente en electrones**, que **reacciona con moléculas nucleofílicas** **compartiendo un par de electrones**.

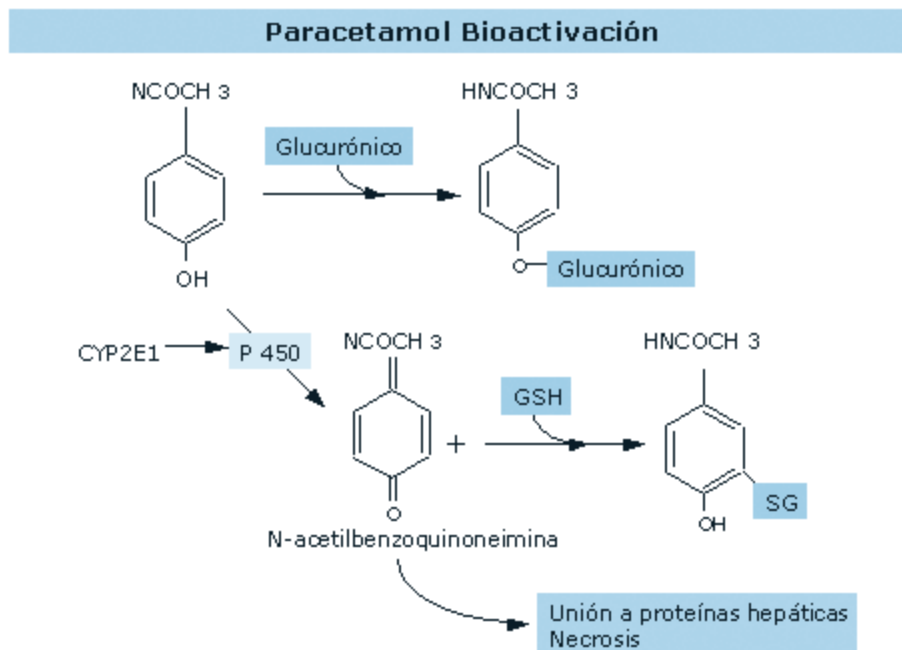
Forman enlaces covalentes con ADN y proteínas dando lugar a **aductos**. Un **aducto** es un xenobiótico o su metabolito unido covalentemente a una molécula endógena. El aducto, además, es un **indicativo de la bioexposición** (se pueden medir aductos en sangre → es una **medida directa de la toxicidad**).

Un compuesto electrofílico se forma como consecuencia de la oxidación del xenobiótico, pero también por una ruptura heterolítica de un enlace covalente (C-O,

N-O), o a partir de compuestos químicos inorgánicos.

La **gravedad del daño** producido va a **depender de las moléculas receptoras**. Algunos **efectos**: **mutagénesis, carcinogénesis, necrosis celular, sensibilización alérgica**. Lo que determina que el daño inducido persista, incluso después de que el tóxico haya sido eliminado del organismo, es la **irreversibilidad de los enlaces covalentes**. Por ello, el **factor tiempo juega un papel importante en la magnitud del efecto tóxico** (si se prolonga la exposición se alcanzará el efecto). Los efectos se pueden poner de manifiesto después de un largo tiempo de exposición a dosis muy bajas.

La **intoxicación por paracetamol es reversible** (si la coges a tiempo, si no es irreversible. No confundir con los enlaces covalentes forma con las proteínas, que son irreversibles) El paracetamol, en orina, se encuentra **conjugado con sulfato** ( $\text{OH} \rightarrow \text{OSO}_3\text{H}$ ), aunque también lo podemos encontrar conjugado con el **glucurónico** ( $\text{OH} \rightarrow \text{OC}_6\text{H}_9\text{O}_6$ ). Hay otro compuesto minoritario que es el paracetamol conjugado con **mercaptúrico**. En una intoxicación por paracetamol, a medida que pasa el tiempo, la excreción del paracetamol va disminuyendo y su semivida aumenta (se acumula en el organismo). Un % determinado del metabolito del paracetamol pasa por el CYP2E1, formando un metabolito tóxico que secuestra el glutatión. En la intoxicación, la depleción de glutatión hace que el metabolito forme aductos con proteínas hepáticas, produciendo la muerte del hepatocito. El antídoto es n-acetilcisteína, que ya tiene grupos cisteína como el glutatión, y compite con éste. De esta forma se secuestra menos glutatión.



En un estudio se compara el paracetamol con otros antídotos del paracetamol (ej: n-acetilcisteína → realmente es el antídoto del metabolito del paracetamol: el napqi) y

con el fenobarbital, pero se observa que la necrosis hepática no disminuye aunque se administre el antídoto; con esto podemos deducir que el paracetamol no es el culpable del deterioro hepático sino que el culpable es un metabolito del paracetamol. Conforme aumenta la dosis de paracetamol, se produce una disminución del glutatión en el hígado y aumenta la unión a proteínas hepáticas del hígado.

### 3. Toxicidad por radicales libres

Un **radical libre** es una molécula o fragmento molecular, que contiene un **electrón desemparejado** en sus orbitales externos y tiende a reaccionar con otras moléculas captando esos electrones que le faltan. Reaccionan con el **ADN** produciendo daño oxidativo, con los **lípidos** destruyendo las membranas, con el **oxígeno** produciendo especies radicales de oxígeno.

Los radicales libres se pueden **formar** por ganancia de un electrón, por pérdida de un electrón o por una ruptura homolítica de un enlace covalente.

- Por **ganancia** de electrones: **paraquat, doxorubicina, nitrofurantoína**.
- Por **pérdida** de electrones: **fenoles, hidroquinonas, aminas, fenotiazinas, tioles**.
- Por **fisión homolítica** del enlace covalente: la reductiva es cuando se capta un electrón, quedando un radical libre + 1 anión (es típica del CCl<sub>4</sub>). La **reacción de fenton** es una fisión homolítica reductiva del **peróxido de hidrógeno**, produciendo un radical hidroxilo y un anión hidroxilo.

Los radicales libres producen una peroxidación de lípidos que termina en destrucción de las membranas lipídicas. En las reacciones radicalarias encontramos 3 fases: fase de iniciación, propagación y terminación.

Los **radicales libres** los podemos **detoxificar** con: **moléculas endógenas** (**vitamina C, E y glutatión** → las dos primeras ceden grupo OH y la última cede grupo SO) y **enzimas** (**superóxido dismutasa, catalasas, glutatión peroxidadas**).

### 4. Otros casos de toxicidad

#### Metanol

**Efectos adversos**: puede producir **ceguera** (sólo se necesitan 10 mL) y **muerte** (30 mL). Al principio aparece una **ligera embriaguez** con **somnolencia**. Pasadas las 12-24h aparecen **trastornos GI** náuseas, vómitos, dolor abdominal), **alteraciones visuales** (visión borrosa, restricción campo), **acidosis metabólica**.

La **mortalidad** se relaciona con los niveles de **ácido fórmico**, que se producen como consecuencia de la **ADH** (que da lugar a la forma aldehído) y la **AIDH** (que da lugar a la

forma ácida). La inhibición del citocromo oxidasa en el nervio óptico disminuye el ATP y con él el funcionamiento del nervio óptico. El fórmico produce acidosis metabólica y penetra en el SNC.

Para tratar esta intoxicación podemos inhibir las enzimas ADH y AIDH. Podemos utilizar etanol en una dosis equimolar (reduce el 90% el metabolismo del metanol, pero la semivida se alarga a 46h). También se puede usar 4-metilpirazol (inhibidor de la ADH) y bicarbonato sódico IV (para tratamiento de acidosis).

### **Etilenglicol**

Se necesitan 100 mL para que el etilenglicol sea letal. Produce nefrotoxicidad. Al principio produce embriaguez, náuseas, vómitos, convulsiones y coma. A las 12-24h produce hiperventilación, taquicardia y acidosis metabólica. Pasadas las 24-72h aparece insuficiencia renal. Antídoto: etanol y fomepizol.

### **Metahemoglobinemia**

La metahemoglobina es una hemoglobina oxidada cuyo grupo hemo contiene el átomo de hierro en estado  $Fe_3^+$  y por lo tanto es un a hemoglobina incapaz de transportar oxígeno. La oxidación de hemoglobina a metahemoglobina ocurre de manera fisiológica y está controlada por una enzima llamada metahemoglobina reductasa, que necesita de NADPH. Esta enzima hace que el nivel de metahemoglobina no supere el 1-2%. Este nivel puede superarse en condiciones de hipoxia o por ciertos compuestos químicos, como la anilina o el nitrobenzono (in vivo) y otros como el nitrito sódico, hidroxilamina y fenilhidroxilamina pueden aumentar los niveles tanto invitro como invivo.

Para contrarrestar el aumento de metahemoglobina se puede usar el azul de metileno, que refuerza la acción fisiológica de la enzima, reduciendo la metahemoglobina. También se puede usar vitamina C, que repone la síntesis de NADPH.

### **HCN**

Unos 250-325 mg de cianuro potásico o sódico es letal. Apenas 1 microgramo/mL en sangre es letal y una concentración de 0.2 microgramos/mL es tóxico.

Los síntomas son: dolor de cabeza, vértigo, disnea, pérdida de conciencia, convulsiones, parada respiratoria (lleva a muerte).

El cianuro interfiere con la cadena transportadora de electrones.

Los tratamientos encaminados a la intoxicación van dirigidos a reducir la cantidad de cianuro. Esto se puede hacer potenciando determinadas reacciones endógenas: como la del tiosulfato sódico (tiosulfato transferasa), nitrito sódico (convierte la

metahemoglobina en CN-metahemoglobina) y la vitamina B12 (hidroxicobalamina → CN-cobalamina). Todos secuestran el CN.

### Organofosforados

Los organofosforados son los insecticidas como el paratión, malatión y diazinón; y gases nervioso como el sarín, tabún y somán.

Producen dos efectos tóxicos: inhiben las colinesterasas y produce neuropatía retardada. Se produce una contracción de las pupilas, exceso de salivación, sudoración y lagrimeo, náuseas, vómitos y diarrea. También fatiga, contracciones involuntarias, fatiga muscular. A nivel del SNC produce ansiedad, ataxia, convulsiones y coma.

La neuropatía retardada aparece por una degeneración de los nervios periféricos en la parte distal de las extremidades inferiores, pero no ocurre con todos los organofosforados. Los síntomas tardan 10-14 días en aparecer. Ej: tri-orto-cresil-fosfato.

El tratamiento podría ser con atropina, que compite con la acetilcolina por los receptores muscarínicos; y la pralidoxima, que rompe el enlace fósforo-acetilcolinesterasa, reacciona directamente con las moléculas de OP y tiene un efecto anticolinérgico semejante a la atropina.

30.9.2014

GRUPO	DOSIS	RESULTADOS
1	100	no toxicidad
2	200	no toxicidad
3	300	no toxicidad

La NOAEL sería 300 mg/kg por peso corporal pero la LOAEL no la podemos saber (estudio mal diseñado).

GRUPO	DOSIS	RESULTADOS
1	100	no toxicidad
2	250	leve toxicidad
3	1000	toxicidad grave irreversible

El NOAEL sería 100 y el LOAEL sería 250.

# TEMA 7: PREVENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

## 1. Principios generales

Dependiendo del **uso de un producto**, requerirá de una **mayor o menor evaluación toxicológica**: medicamento de uso humano, aditivos alimentarios, plaguicidas, cosméticos, medicamentos de uso veterinario, productos de uso industrial.

En el campo del medicamento, tenemos unas agencias reguladoras (que ya hemos visto): en europa la EMA, AEMPS; en EEUU la FDA; en japon el ministerio de sanidad.

Los estudios de toxicidad son los estudios más **reglamentados** que existen. Cada una de las agencias tienen sus propias metodologías pero en la práctica se parecen bastante. Puesto que hay esta **diversidad** de agencias reguladoras, se realizan **guías de consenso**.

## 2. Ensayos toxicológicos

La evaluación toxicológica puede realizarse mediante **3 categorías de información científica**: **estudios epidemiológicos**, **estudios clínicos**, y **toxicología experimental** (que se diferencia de las dos anteriores en que no hay datos en humanos). Nos centramos en esta última.

El objetivo que persigue la **toxicología experimental** es: definir la **capacidad tóxica** del producto en cuestión (relacionar dosis con efecto); conocer el **peligro** de su exposición según sea ésta; **localizar los órganos diana y mecanismos fisiopatológicos**; y **evaluar la reversibilidad** de las alteraciones encontradas.

Una **evaluación toxicológica completa** consta de: ensayos de toxicidad general, ensayos de toxicidad específica y **ensayos de ecotoxicidad** (riesgo medioambiental → sobre todo tiene interés en plaguicidas).

Los **estudios de toxicidad general** estudian cualquier tipo de efecto sobre **aspectos funcionales o morfológicos** de los distintos **sistemas u órganos** del individuo. Dentro de este grupo se clasifican en función de la duración del efecto. Dentro de la toxicidad general, diferenciamos toxicidad a **dosis única** (o agudos) o a **dosis repetidas**.

Los **estudios de toxicidad específica** estudian un **efecto determinado**. Cada estudio tendrá un método específico de cuantificación de los parámetros motivo de estudio. Los estudios de toxicidad específica van encaminados a: la **genotoxicidad, tolerancia local,**

sensibilización, fototoxicidad, conocer los efectos sobre la reproducción, cancerogénesis, inmunotoxicidad.

### 3. Ensayos de toxicidad general

Lo primero que hay que hacer para hacer un estudio de toxicidad es **recolectar y evaluar los datos existentes**. Hay que buscar información previa: sobre la naturaleza del compuesto, su pureza y sus propiedades fisicoquímicas. Es muy importante disponer de un método analítico que permita detectar bajas concentraciones del compuesto. También hay que buscar datos de estabilidad. En cuanto a la formulación y vías de administración: hay una serie de disolventes recomendados que hay que mirar.

Como no sabemos nada del compuesto, se hace un estudio de toxicidad a **dosis única** (obtendremos DL50 y Dosis Máxima Tolerable) para tener un **conocimiento grosero del rango de dosis tóxicas**. Si queremos definir las **propiedades tóxicas** en las condiciones de uso tendremos que hacer estudios de toxicidad a **dosis repetidas** (obtendremos NOAEL y LOAEL).

¿Cuál es el experimento **ideal**? para elegir la **especie animal** tenemos que fijarnos que el animal, a nivel de metabolismo, se comporte igual o parecido al hombre (que produzca los mismos metabolitos, etc). La **vía de administración** adecuada es la **intravenosa**. Hay que estudiar la **dosis** que hay que dar, la **duración** de los ensayos y qué **parámetros** tenemos que determinar.

Las **guías OECD** (organización para la cooperación y el desarrollo económico) indican el **protocolo** a seguir en cada uno de los estudios (es el estándar de los ensayos de toxicidad). Las **guías de consenso** nos habla de **estrategias** que hay que seguir (a diferencia de los protocolos de ensayo de las guías OECD).

Los objetivos de los ensayos de **toxicidad general a dosis ÚNICA** son la indicación sobre los **efectos de una intoxicación aguda** en el ser humano, el **diseño** de estudios de toxicidad a **dosis repetidas** y la **clasificación de los compuestos** químicos en categorías.

Son necesarios estudios de dosis que definan una DMT (dosis máxima tolerable) en la especie (si es que no tenemos la información disponible). En general estos ensayos son útiles para **predecir las consecuencias en situaciones de sobredosis** humanas.

La UE dice que necesitamos dos especies de mamíferos (una de ellas no debe ser roedora), dos vías de administración (para humanos y sistémica), y para los medicamentos no es necesario establecer un DL50. Observaciones a estudiar: signos de intoxicación aguda, causa de la muerte, aproximación a la dosis letal y dosis-efecto... → hay que intentar obtener la mayor cantidad de información utilizando

la menor cantidad posible de animales.

Existen 3 métodos que permiten **estimar una dosis letal media** aproximada utilizando entre 5 y 9 animales (**TG 420** método de la dosis fija, **TG 423** método de la clase tóxica aguda, **TG 425** método up and down). En el TG 420 se administra la dosis en el día 0 y se realiza un registro ponderal, se observa la sintomatología general y se hace un estudio tanto macroscópico como microscópico. Normalmente se deja un tiempo (14 días) hasta que se sacrifica al animal para ver si la toxicidad revierte o no.

Los **estudios de toxicidad general a dosis REPETIDA** tienen como objetivo **obtener información sobre la toxicidad del compuesto tras la exposición repetida**. No hay tanta discusión sobre su necesidad. La estimación de la primera dosis en humanos es un elemento clave para la seguridad de los sujetos que participan en los primeros estudios en humanos.

La UE también da recomendaciones sobre las especies a usar (dos especies, al menos una no roedora, etc).

En este caso los **estudios** se denominan de otra forma **TG-407 repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**; **TG-408 repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents**; **TG-409 repeated dose 90-day oral toxicity study in non-rodents**. Lo que **varía** en estos estudios es el **número de animales y la frecuencia de observación**.

En estos estudios se hace una evaluación clínica y de comportamiento (se registra el consumo de comida, bebida, sintomatología, etc. El test de Irwin evalúa la toxicidad del SNC), además de tomar medidas analíticas (hematología, transaminasas, coagulación, uroanálisis). Existen diferentes parámetros bioquímicos que nos explican diferentes toxicidades: en función del peso de los órganos o en función del número de transaminasas (toxicidad hepática) u otros parámetros. También se realiza un estudio oftalmológico e histológico.

1.10.2014

## 4. Reglamentaciones

Una **directiva europea** sirve para orientar las políticas nacionales hacia un objetivo común a nivel europeo. Nunca son de obligado cumplimiento.

Las **guías de la EMA** son un marco regulatorio que proporciona una base para la armonización práctica (entre los estados miembros y la EMA) de la interpretación y aplicación de los requisitos detallados para la demostración de la calidad, seguridad y eficacia que figuran en las directivas comunitarias.

Las guías **ICH** son muy importantes. El nacimiento de la conferencia internacional sobre la armonización de requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (ICH) se llevó a cabo en 1990, en Bruselas. Estas guías se encargan de armonizar los requerimientos legales necesarios para el registro de medicamentos, así como la interpretación y aplicación de las directrices técnicas; para mejorar y acortar el proceso, así como evitar duplicación de experimentos.

Las guías **OECD**. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico es una organización intergubernamental que representa a 29 países. La OCDE da recomendaciones explicativas sobre la realización técnica de los ensayos toxicológicos. Tiene función de coordinación y armonización de políticas.

Las normas **BPLs** (buenas prácticas de laboratorio) son un sistema de calidad surgido en el ámbito de la industria farmacéutica. Son un conjunto de reglas, procedimientos operativos y prácticas establecidas y promulgadas, que se consideran de obligado cumplimiento para asegurar la calidad e integridad (es decir, que lo que decimos es veraz) de los datos obtenidos en determinados tipos de estudios de investigación y análisis.

**Principios éticos de la experimentación animal:** La directiva europea 2010/63 trata sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. En el Real Decreto 53/2013 se establecen las normas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación. Se ha creado una Comisión Ética Estatal de Bienestar Animal y, entre otras cosas, se regulan las personas que tratan con los animales: los que los cuidan, los que experimentan con ellos, etc.

# TEMA 8: MÉTODOS ALTERNATIVOS EN TOXICOLOGÍA

## 1. Estrategia de las 3 Rs

La experimentación animal hay que hacerla siguiendo unos **principios** llamados de las **3Rs: refinamiento, reducción y reemplazo**. Lo que se intenta es minimizar el sufrimiento innecesario.

El **refinamiento** es la **disminución** de la incidencia o severidad del **dolor o estrés** producido a los animales en un procedimiento experimental. Esto se consigue mediante **analgésia y sedación**. Esto no se hace por el animal en sí (que también), sino porque el estrés puede influir en el resultado.

La **reducción** consiste en la **disminución del número de animales** utilizados para obtener información con una determinada precisión. Esto se consigue mediante **estadística**, hay métodos estadísticos para estimar el tamaño muestral que debe tener nuestro experimento.

El **reemplazo** es la sustitución de animales con un nivel alto de conciencia por otros **sistemas que no utilizan animales**. Los métodos de reemplazo son varios: usar **organismos inferiores** no protegidos como **bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales invertebrados**; utilizar **modelos in vitro** como **órganos aislados, explantes, líneas celulares** (se pierden ciertas propiedades de la línea original), **cultivos primarios de células aisladas, sistemas libres de células**; y **modelos matemáticos**, que permiten predecir (**programas** para predecir genotoxicidad. Existe una relación cuantitativa entre estructura y actividad).

Todo esto tiene un doble aspecto: uno **humanitario** (hay que hacer las cosas bien) y otro **científico** (si hacemos las cosas bien tendremos datos de calidad). Todo ello constituye la ética de la experimentación animal y es una necesidad científica. También es cierto que todo esto ha tenido mucha presión por parte de movimientos sociales (protectoras de animales, etc). La protección de los animales de experimentación está regulada por el real decreto 53/2013.

## 2. Concepto de métodos alternativos

El **método alternativo** es el que **sustituye a uno tradicional utilizando la estrategia de las 3 Rs**. El método alternativo a la experimentación animal es el método in vitro.

No todos los métodos alternativos son métodos in vitro (DL50) ni todos los métodos in

vitro son alternativos (test de mutación génica en bacterias).

### 3. Validación de los métodos alternativos

La **validación** es el proceso que establece la **reproducibilidad** (se hace en distintos laboratorios y salen resultados semejantes) y **relevancia** (sirve para lo que yo quiero) de un procedimiento experimental para un fin específico.

Las **fases** del proceso son: **desarrollo del test**; **pre-evaluación**; **validación intralaboratorio**; y **validación con organismos**.

Existen varios **centros de validación**: EVCAM, ICCVAM, ZEBET.

### 4. Aplicación de los métodos alternativos en I+D de medicamentos

La industria utiliza sistemas in vitro para las fases iniciales de un estudio, pero cuando estamos en el desarrollo clínico **necesariamente** tenemos que saltar a sistemas **in vivo**. En esta fase (fase de cribado) se recogen datos de la actividad farmacológica, de la farmacocinética, citotoxicidad y el potencial mutágeno.

La toxicidad preclínica es necesaria hacerla en modelos animales.

Las **estrategias** que se emplean para **disminuir el uso de animales** de experimentación en la evaluación preclínica de toxicidad son: **recoger la máxima información**, modelos de **predicción matemática**, **mejora en el diseño experimental**, **métodos in vitro**, **toxicogenómica** (datos de expresión de genes, de proteínas, o de metabolitos → si podemos saber qué genes cambian su expresión ante una determinada toxicidad, cuando estudiemos otra toxicidad con otro compuestos podríamos saber si el tipo de toxicidad es el mismo, viendo si se activan los mismos genes o no).

### 5. Conclusiones

La ética de la experimentación animal supone que ésta debe realizarse teniendo en cuenta la **estrategia de las 3Rs**.

Siempre que sea posible deberán utilizarse **métodos in vitro u otros que no empleen animales de experimentación**. De manera genérica se suelen denominar alternativos.

Son los ensayos de toxicidad con animales de experimentación los que generan un mayor rechazo social, en especial en el campo de la cosmética, por lo que la presión para encontrar métodos alternativos validados es mayor.

Los métodos in vitro se pueden aplicar en cualquier campo de investigación biomédica. En el proceso de I+D de medicamentos se aplican fundamentalmente en las primeras fases.

Los procedimientos actuales de evaluación de la irritación dérmica y ocular utilizan los métodos in vitro y otros en una estrategia secuencial, de tal manera que los animales no se someten nunca a tratamiento con productos muy irritantes o corrosivos.

2.10.2014

## TEMA 9: EL PACIENTE INTOXICADO

(Este tema, el de intoxicación etílica -que no está en los apuntes- e intoxicación por drogas es mejor estudiarlos de las diapositivas porque están bien explicadas y se leían en clase tal cual)

Paracelso decía: todo es potencialmente tóxico, incluido el agua.

La intoxicación es un síndrome clínico secundario a la introducción brusca en el organismo de una sustancia que produce efectos nocivos, de forma intencionada o accidental.

El 2% de urgencias médicas son por intoxicaciones (6-8 pacientes al día). La mayoría son intencionadas (intoxicación etílica) pero otras son por sobredosificación. Después de las intoxicaciones, están los fármacos (psicofármacos) y luego las drogas de abuso.

La sospecha de intoxicación llega porque lo cuenta un acompañante o el propio paciente. También cuando vemos un deterioro agudo en un paciente psiquiátrico, cuando hay antecedentes de drogas, alcoholismo o deterioro cognitivo.

Cuando tenemos una sospecha de intoxicación aguda por cualquier sustancia hay que hacer una serie de cosas, común a todas las intoxicaciones:

**Estabilización inicial:** asegurarse de que respira bien, que tiene un nivel de conciencia adecuado. Cuando hay un coma se administra un “coma cóctel” de: naloxona (contra opioides), tiamina, glucosa hipertónica, flumazenilo (contra BZP).

**Exploración y diagnóstico sindrómico:** estudiar qué se le ha administrado, cuánto, cuándo, por dónde, etc. En el laboratorio podemos realizar diferentes mediciones pero todas ellas son cualitativas (dicen si hay o no hay una determinada sustancia, pero no nos dice cuánto hay de esa sustancia). también se pueden medir en sangre niveles de: paracetamol, digoxina, metanol, hierro...

La orina tiene de desventaja que es cualitativo y que en algunos compuestos tardan mucho en eliminarse en orina (el cannabis tarda 6 semanas en eliminarse).

Si hay aumento de secreciones puede haber toxicidad por insecticidas, organofosforados, fisostigmina, setas (amanita phalloides). Si tenemos lo contrario (sequedad) puede ser por atropina, neurolépticos, antiparkinsonianos, antihistamínicos, amanita muscaria. Si hay un síndrome hiperactivador y estimulador puede ser debido a cocaína, anfetaminas, MDMA, cafeína, LSD, ISRS, IMAO.

**Descontaminación y eliminación:** lo primero es prevenir que se absorba (utilizar

vaciado gástrico, carbón activado, extracción digestiva baja). Esto nos lo planteamos cuando el tóxico es muy tóxico (cianuro, digoxina, metanol, estriquina), o bien cuando el tóxico no es tan tóxico pero que a elevadas dosis pueden aparecer severas complicaciones, o cuando no sabemos qué tóxico es ni su dosis.

No usaremos estos métodos cuando se hayan ingerido ácidos o bases (tampoco se intentan neutralizar), sustancias corrosivas (para evitar más lesiones), cuando la intoxicación es leve o cuando la absorción del compuesto ya es completa.

- El **vaciado gástrico** consiste en introducir una sonda gruesa y aspirar todo el contenido del estómago, luego se introduce 2-3 litros de agua y se vuelve a aspirar, así hasta que el agua salga limpia. Es importante que el paciente esté consciente para proteger la vía aérea.
- Otra opción es inducir el **vómito** pero no se recomienda.
- El **carbón activado** es el protagonista de la prevención de la absorción. Todo paciente intoxicado por vía oral debería recibir carbón activado. El carbón activo no sirve para etanol, metanol, hierro, cáusticos, yodo (bote de betadine), hidrocarburos.

Además de expulsarlo por arriba, podemos expulsarlo por abajo (**extracción intestinal**) aunque no se usa casi nada. Una posibilidad es intentar empujar todo a base de líquido. También se pueden usar diarreicos (sulfato de magnesio).

También podemos usar una **diuresis forzada** para eliminar el tóxico vía renal, pero esto dependerá del tamaño molecular (si es grande puede empeorar los daños y esta técnica estará contraindicada). Los que se eliminan por vía biliar sí que se puede aspirar. En algunos tóxicos tiene mucho interés la eliminación extrarrenal (hemodiálisis).

## Antídotos

Esta parte ya no es común para todos los tóxicos. Para el uso clínico tenemos unos 50 antídotos.

Los antídotos específicos actúan sobre el mismo receptor que el tóxico, prevaleciendo el de mayor concentración (naloxona, atropina).

Los específicos actúan sobre otro receptor, generando una acción opuesta a la del tóxico, acelerando su metabolismo o potenciando su desintoxicación endógena (n-acetilcisteína).

Los antídotos están indicados cuando existe un antídoto específico para la intoxicación, cuando hay una gravedad real, cuando el beneficio supere el riesgo y cuando no

existan contraindicaciones. Los más usados son: paracetamol-Nacetilcisteina, BZP-flumazenilo, opiáceos-naloxona, metanol-etanol, organofosforados-atropina, anticolinérgicos-fisostigmina. sintrom-vitaminaK. Cada hospital tiene sus propios antídotos.

Teléfono atención intoxicaciones: 91-562 04 20.

## TEMA 10: INTOXICACIÓN POR DROGAS

Los opiáceos son drogas depresoras. El motivo de atención es por intoxicación o síndrome de abstinencia.

La intoxicación era muy frecuente en los años 80. Los opioides objeto de abuso son la heroína y los agonistas sintéticos como la metadona y el dextropropoxifeno. La heroína puede administrarse de forma intranasal o fumada e intravenosa.

La intoxicación aguda produce sobre todo sedación, pero también analgesia, cambios de humor, depresión respiratoria, disminución de la motilidad intestinal, náuseas y vómitos.

Hay una tríada de síntomas muy característica: miosis puntiforme (pupilas contraídas), depresión respiratoria y coma.

La intoxicación se trata con naloxona. Se debe mantener perfusión IV en intoxicaciones por opiáceos de vida media o larga.

Complicaciones: hipoxia prolongada, hipotonía muscular, hipotensión por liberación masiva de histamina, convulsiones, edema agudo de pulmón, síndrome de abstinencia por naloxona.

Al gammahidroxitirato (GHB) también se le denomina éxtasis líquido (que no es éxtasis, pero sí es líquido). Se utilizaba como anestésico pero se retiró. Es euforizante, hipnótico y afrodisíaco. Se absorbe muy rápidamente y tiene una vida media muy corta (unos 30 minutos). Induce sueño, amnesia y anestesia. Es muy fácil llegar a la dosis tóxica. Ojo: se utiliza para agresiones sexuales y por abolición de la voluntad.

Como tratamiento: verificar constantes clínicas y aportar soporte en caso necesario, colocarle al paciente en posición de seguridad por si vomita.

La ketamina es un anestésico usado tanto en humanos como en veterinaria. Induce un estado disociativo, produciendo inconsciencia con desconexión de su cuerpo del entorno o sensación de estar fuera del cuerpo. Puede inducir ataque de pánico, delirios, alucinaciones persistentes y suicidio. Tratamiento: bzp para tranquilizarle y haloperidol si hay conducta psicótica.

Las anfetaminas (y éxtasis) son estimulantes del SNC. La toxicidad produce hiperactividad, piloerección, delirium, alucinaciones, psicosis, HTA, taquicardia, arritmias, IAM, golpe de calor. No tienen antídoto, sólo podemos controlar las funciones vitales y valorar las repercusiones sobre el SNC, aparato cardiovascular, hígado, riñón,

músculo.

La cocaína es muy peligrosa. Produce una gran estimulación a nivel del SNC (midriasis, agitación, psicosis, ACV isquémico), pero también a nivel respiratorio (edema pulmonar, taquipnea, asma), corazón (taquicardia, arritmias, HTA severa, rotura aórtica, IAM), metabolismo (hipertermia, rabdomiolisis, fallo renal, hepatotoxicidad). El tratamiento es proporcionar medidas de soporte. Si hay agitación podemos dar BZP, la hipertermia (que es maligna y hay que bajarla sí o sí) se puede bajar con sedación y hielo. Mantener estrecha vigilancia de HTA.

El LSD es un alucinógeno. En general los alucinógenos tienden a tener vida media muy larga. El tratamiento es tranquilizarlo y llevarlo a un sitio silencioso. Sedar si está muy agitado. Si se toma setas alucinógenas si que podemos tratar con BZP y haloperidol.

La fenciclidina también es alucinógena y produce rabdomiolisis, rigidez muscular e hipertermia maligna.

El cannabis además de alucinógeno es depresor.

# TEMA 11: CARCINOGENESIS

## 1. Cáncer y mutación: perspectiva histórica

El cáncer y los procesos cancerosos tienen un componente en común que es la célula. Hay un crecimiento masivo celular.

Se sabe que, en cuanto a su **origen**, hay una cierta **predisposición genética**, también se sabe que las **radiaciones ionizantes** pueden producir un tumor (lesionan las células), algunos **virus** como el papiloma favorecen la aparición de cáncer de cérvix, **sustancias químicas** y potenciales agentes inductores de los procesos cancerosos como la **dieta**, **ambiente**, **hábitos** (tabaco), determinados trabajos. Nos interesan las sustancias químicas como agentes potenciales de la carcinogénesis.

Algunos **hitos históricos** de la carcinogénesis química: las primeras observaciones de sospecha de que determinados agentes químicos eran capaces de producir cáncer eran de tipo **epidemiológico** (observaciones). La primera observación proviene de 1775, en la que el médico **Pott** asoció el cáncer de escroto a los deshollinadores. El hollín contiene sustancias cancerígenas y se ha demostrado su efecto cancerígeno por contacto con el hollín. En 1895 el médico alemán **Rehn** asoció el cáncer de vejiga en industrias del tinte con la exposición a los compuestos que manejaban estos trabajadores.

Desde el punto de vista experimental, los primeros **estudios experimentales** en animales fueron en 1915 en el que se descubrió el tumor de piel. Después de la segunda guerra mundial, en 1945 y hasta 1960 destacó el estudio de los **Miller** en el que fueron capaces de diferenciar los efectos cancerígenos en dos tipos de grupos: los **iniciadores** (provocan cáncer) y los **promotores** (fomentan el cáncer, pero no necesariamente lo provocan).

El test de Ames se descubre en 1975 y consiste en un sistema experimental sencillo por el que se demuestra que un compuesto tiene capacidad de mutar. Ames descubrió que la gran mayoría de los compuestos carcinogénicos eran también mutagénicos. Demostró la correlación: carcinogénesis-mutagénesis.

Más tarde se demostró que la mutación está implicada en el proceso canceroso mediante el descubrimiento de los **oncogenes** por **Barbacid** en 1985 (esta mutación hace que la célula no funcione de manera correcta y hace que el crecimiento de la célula se descontrole). Posteriormente se descubrieron los genes supresores de tumores.

## 2. Definición de carcinógeno: tipos de evidencias

Un **carcinógeno** es un compuesto capaz de **inducir neoplasias**. Esta definición se basa en una serie de evidencias de tipo experimental.

Los **estudios** que nos dicen que un compuesto tiene la capacidad de producir neoplasias son: los ensayos de carcinogénesis (siempre en animales de experimentación), estudios epidemiológicos (en la especie humana) y ensayos de mutagénesis (varios sistemas experimentales - nos permiten predecir si un compuesto produce mutación o no). Una mutación a veces puede ser origen o a veces consecuencia.

Si el **ensayo de carcinogénesis** da positivo, quiere decir que el compuesto en animales de experimentación produce un **aumento estadísticamente significativo de la incidencia de neoplasias** de uno o más tipos histológicos.

Si el **estudio epidemiológico** da positivo podemos decir que tenemos **evidencia suficiente de su vinculación con el desarrollo de tumores** específicos en el ser humano (es un carcinógeno humano). No es fácil demostrar que hay una evidencia suficiente epidemiológicamente hablando.

Los **ensayos de mutagénesis** nos permiten etiquetar el compuesto y ver si el compuesto es carcinógeno a través de un mecanismo genotóxico, es decir, si el compuesto químico **interacciona con el ADN** dando lugar a mutaciones.

Hay unas **agencias** que se dedican a clasificar los compuestos químicos en función de su **riesgo** carcinogénico, la más importante es la **IARC** (agencia internacional de investigación contra el cáncer). En función del riesgo cancerígeno clasifica los compuestos en **5 clases** de mayor a menor riesgo: **clase 1** (**carcinógeno humano** - evidencia suficiente entre exposición al compuesto y aumento del riesgo de cáncer), **clase 2A** y (**probable carcinógeno humano**), **clase 2B** (**posible carcinógeno humano** - los matices entre una y otra son difíciles de explicar), **clase 3** (**no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad**), **clase 4** (**probable no carcinógeno humano**).

A la hora de clasificar un compuesto como carcinógeno humano, los **estudios epidemiológicos** son los que tienen **más peso**. La **evidencia** epidemiológica debe ser **suficiente**. Los tipos de evidencia en estos estudios son: suficiente (relación causal demostrada), limitada (relación causal creíble), inadecuada (escasos datos pertinentes).

## 3. Fases del proceso canceroso

El **proceso** carcinógeno se clasifica en **3 partes**: fase de iniciación (transformación neoplásica), fase de promoción (expansión clonal) y la fase de progresión (invasión y metástasis).

1. El **fenómeno de iniciación** es un fenómeno **irreversible**, poco frecuente, **rápido**, requiere de replicación celular y requiere de mutación o genotoxicidad. Lo que ocurre es que hay un cambio a nivel genético en la célula que supone un **cambio funcional**.
2. El **fenómeno de promoción**, por el contrario, es **reversible**, necesita un **tiempo largo** de exposición, se produce la estimulación del crecimiento celular, los fenómenos de genotoxicidad no son necesarios, se ve modulada por factores fisiológicos como la edad y la dieta (hipercalóricas), se requiere dosis elevadas del promotor, tiene especificidad respecto del órgano diana (el fenómeno de iniciación es más indiscriminado en cuanto a tejido). En la fase de promoción hay una **multiplicación** o expansión clonal de la célula.
3. El **fenómeno de progresión** presenta una multiplicación y expansión exacerbada, con fenómenos de mutación y selección (se favorecen los fenotipos más agresivos), es una fase de gran inestabilidad genómica (p53). En la fase de progresión la **multiplicación** es masiva y **desordenada**.

Es muy difícil detectar un cáncer en la fase de iniciación o promoción. Siempre lo detectamos en la fase de progresión. Las células que están en fase de promoción se denominan células preneoplásicas (iguales genéticamente entre sí y distintas de la célula original normal). En el proceso de división de las células preneoplásicas pueden aparecer modificaciones en el ADN y cada vez las células tienen un **fenotipo más agresivo** (mayor capacidad de división).

#### 4. Tipos de carcinógenos

En función del **mecanismo de acción**, los carcinógenos pueden ser genotóxicos y no genotóxicos.

Los que son **GENOTÓXICOS** son compuestos **mutagénicos** (dan lugar a mutaciones: cambios en el genoma transmisibles a la descendencia) y sus efectos podrían predecirse mediante ensayos de genotoxicidad (Ej: test de Ames). Se considera que **NO tienen efecto umbral respecto a la dosis** (en toxicología siempre hemos dicho que la dosis es clave: a mayor dosis, mayor toxicidad. También definimos la dosis NOAEL, sin efectos adversos, y LOAEL con efectos adversos. Y lo que hay entre una y otra está el umbral de toxicidad. Si no existe este umbral, quiere decir que no hay ninguna dosis segura de exposición y que por tanto hay que evitar la exposición, por mínima que sea, a toda costa). También se caracteriza por tener **efecto sobre varios órganos** y especies.

A partir de la **estructura** de estos compuestos (determinados grupos que van a interactuar con el ADN) podemos predecir la **actividad** tendrá.

Los que **NO** son **GENOTÓXICOS** también se denominan epigenéticos, y **no son mutagénicos**. Los mecanismos de acción de estos compuestos son bastante particulares y no se puede hacer generalizaciones. En estos compuestos si que tenemos un **efecto umbral con respecto a la dosis**. Además, el efecto que producen está **limitado a un órgano** o una especie. **No se puede relacionar la estructura con la actividad**.

En función de la **vía metabólica de biotransformación**, podemos distinguir los carcinógenos directos y los indirectos (procarcinógenos). El **carcinógeno directo** es aquel que **no necesita de un proceso de bioactivación** mientras que los **carcinógenos indirectos** **sí necesitan de un proceso de bioactivación**.

El benzoapireno sufre un proceso de bioactivación por el CYP450, formándose el 7,8-diol-9,10-epóxido, compuesto electrófilo que establece uniones covalentes con el ADN (convirtiéndose en un aducto), produciendo mutaciones y provocando una transformación maligna de las células.

## 5. Carcinógenos genotóxicos

La mayoría de los carcinógenos genotóxicos son **orgánicos**.

### **Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)**

Están constituidos por varios anillos aromáticos y es una familia muy numerosa. Su origen es la **combustión de materia orgánica**, como el humo de tabaco, humo de los coches, alquitrán de hulla y petróleo y derivados; también se generan en el proceso que supone el **tratamiento térmico de los alimentos** (cuando las temperaturas superan los 300-400°C → se encontró **benzoapireno** en aceite). Tienen **efecto local o sistémico**.

Los HAP se bioactivan por epoxidación mediante la enzima **CYP1A1** y se detoxifica por la epóxido hidrolasa y el GSH.

### **Aminas aromáticas**

Son estructuras con grupos amino, responsables de los efectos carcinógenos. Los trabajadores de la industria del tinte estaban sometidos a estos compuestos. Tienen **efectos sistémicos** aunque con diferencias interespecíficas: en roedores produce cáncer de hígado, de vejiga y mama; en la especie humana se produce el metabolito **2-naftilamina** que produce cáncer de vejiga. Los acetiladores lentos tienen mayor predisposición a este tipo de tumores.

El metabolismo de las aminas se produce por acetilación de las NATs, además de una N-oxidación por **CYP1A2**, que da lugar a una hidroxilamina (mutagénica).

### **Compuestos alquilantes**

No necesitan de activación metabólica y son carcinógenos directos. Son las **mostazas nitrogenadas, nitrosoureas y alquilsulfonatos**.

### **Nitrosaminas y compuestos N-nitroso**

Son compuestos con un potencial cancerígeno muy potente. Unas son de origen natural, otros sintéticos y algunas se producen de forma endógena. En el organismo, los nitratos se pueden convertir en nitritos, que reaccionan con aminas endógenas produciendo **N-nitrosaminas**. Necesitan de activación metabólica

### **Aflatoxina B1**

Produce tumores hepáticos y es muy potente.

Otros compuestos naturales son la cicasina, safrol y alcaloides de pirrolizidina.

## **6. Carcinógenos no genotóxicos**

Actúan a través de **distintos mecanismos**. Pueden ser compuestos con actividad hormonal, con actividad citotóxica, promotores tumorales o inmunosupresores.

Los **promotores** son sustancias que, sin ser cancerígenas por sí mismas, aumentan la incidencia de tumores, después de exposición a una sustancia carcinogénica (iniciadora). Ej: **dioxina, sacarina sódica**.

Son sustancias con un efecto tóxico conducente a muerte celular y posterior regeneración, lo que puede aumentar el potencial cancerígeno de otras sustancias. Ej:  **$\alpha$ -limoneno**. Interactúa con la  $\alpha$ 2-microglobulina, que se acumula en la nefrona produciendo una necrosis tubular (el organismo reacciona con proliferación y regeneración celular. Con esto favorecemos la fase de promoción).

## **7. Evaluación de la carcinogenicidad**

Los **ensayos de carcinogénesis** son ensayos de toxicidad de muy **larga duración** ya que transcurren prácticamente durante toda la vida del animal, el cual es expuesto al xenobiótico a diario. Para estos ensayos únicamente se utilizan **roedores** (ratas o ratones) porque tienen una duración de vida relativamente corta, tienen un **bajo coste** de mantenimiento, las **estirpes** están bien **caracterizadas**, y además se utilizan en **estudios farmacológicos y toxicológicos**.

En el diseño estándar del National Toxicology Program se emplean 3 grupos: control,

1/2 de la dosis del carcinógeno, y una dosis alta del carcinógeno. En cada grupo se emplean 50 machos y 50 hembras. Se realizan necropsias completas y estudios histológicos (35 tejidos por animal). En los ensayos siempre se utiliza la MDT o dosis máxima tolerable.

No todos los estudios de toxicidad hay que hacerlos con BPL pero sí que los estudios de **carcinogénesis** hay que **hacerlos con BPLs**: controlar la dieta de los animales y la pureza del compuesto.

Otros modelos animales: modelos animales **transgénicos** (se ha insertado un determinado gen de interés → generalmente oncogenes para que aparezca el tumor) y modelos animales **knockout** (no hay genes supresores de tumores, de forma que las probabilidades de aparición de tumor aumentan). Con estos animales se reduce el tiempo de tratamiento.

**Estudios epidemiológicos**: son estudios de la distribución de la enfermedad en las poblaciones y los factores que intervienen en la aparición de la misma. Los más empleados son los de casos y controles y estudios de cohortes. En un estudio epidemiológico se considera que hay **evidencia suficiente** cuando la **relación causal es demostrada**.

Compuestos cancerígenos: **4-aminobifenilo, aflatoxina, benceno, cloruro de vinilo, 2-naftilamina, cadmio, arsénico, berilio, cromo, níquel, gas mostaza.**

## TEMA 12: MUTAGÉNESIS

### 1. Nacimiento y desarrollo de la toxicología genética

La **toxicología genética** es la rama de toxicología que trata de: identificar aquellos compuestos cuya toxicidad se dirige hacia los **componentes hereditarios** del ser vivo, analizar su **modo de acción** y **evaluar el riesgo** derivado de la exposición del hombre a dichos compuestos.

Los compuestos que tienen la propiedad de alterar el ADN se denominan mutagénicos o genotóxicos (los dos términos se emplean de manera indistinta).

Este área surge en los años 70 con la EMS (Environmental Mutagenicity Society) y EEMS (European environmental mutagenicity society). Estas **sociedades** se crean con dos fines paralelos, por un lado **identificar** los agentes potencialmente cancerígenos y por otro **determinar el impacto** de los agentes genotóxicos en el conjunto de genes humanos.

**¿Por qué surge la preocupación por el efecto mutagénico de los productos químicos?** Por un lado debido al **desarrollo industrial**, que implica la exposición a muchos nuevos compuestos químicos. Por otro lado se empieza a **conocer el fenómeno de la mutación** y lo que implica a nivel molecular: época de oro de la biología que comienza con el descubrimiento de la estructura del ADN (1953).

Los **primeros estudios de mutación inducida**: radiación **MÜLLER** (1927 - con bacterias) y **RUSSELL** (1951 - ratón).

**¿Por qué se pensaba que estudiando los efectos mutagénicos se podría prevenir el cáncer?** porque se vieron indicios de **asociación mutación-cáncer**: **alteraciones cromosómicas en leucemias y tumores**; **síndromes de inestabilidad cromosómica (Bloom)** y de **deficiencia en la reparación del DNA** con elevado riesgo de cáncer; **alta correlación mutagenicidad y carcinogenicidad de compuestos químicos**. Más tarde se descubrieron los **oncogenes**.

**¿A qué se debió su rápido desarrollo en la década de los 70-80?** Por un lado porque disponíamos de **sistemas experimentales in vitro para detectar** este tipo de efectos (test de Ames) y además la **capacidad de reproducción del metabolismo** en mamíferos mediante la utilización de fracciones enzimáticas (muchos compuestos necesitan de metabolismo para ser carcinógeno, y con estas fracciones enzimáticas podemos activarlos sin necesidad de un organismo vivo).

## 2. Tipos de mutaciones

La **mutación** es el cambio en la secuencia normal de nucleótidos en el ADN. Puede ser espontánea, inducida (por radiaciones, productos químicos o virus). Lo normal es que la mutación se produzca a dosis subtóxicas (si se produce por productos químicos) y este efecto en los ensayos de toxicidad general pasa desapercibido. Puede haber una alteración a nivel del genotipo y además del fenotipo, que podrá ser beneficiosa, neutra o perjudicial.

La mutación es natural pero es algo no deseable.

En función del **TAMAÑO** distinguimos dos grandes grupos de mutaciones: las génicas o puntuales y las que son cromosómicas (aberraciones cromosómicas).

- I. En las **GÉNICAS** o puntuales sólo hay una **mutación en un único par de bases** mientras que en las cromosómicas, la afectación es a nivel de cientos o miles de nucleótidos. Este tipo de alteraciones cromosómicas se detectan mediante **técnicas habituales para estudiar el genoma humano** o con el test de Ames.
  - A. Las mutaciones génicas afectan a uno o unos pocos nucleótidos. Pueden ocurrir **sustituciones**: **transiciones** (A → G, T → G) o **transversiones** (A-T, A-C, G-C G-T). La mutación puede ser directa o reversa en función del sentido.
  - B. Los **desfases** son **inserciones** o **deleciones**, en estos casos cambia la lectura (puede aparecer una proteína nueva).
- II. Dentro de las **ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**, tenemos:
  - A. Las **estructurales**: que pueden ser **cromatídicas** o **cromosómicas** en función del momento del ciclo en el que se ha producido la mutación. Dentro de las cromosómicas, pueden ser **estables** o **inestables** -anulares, dicéntricos y acéntricos-. Y también se clasifican en: **delección**, **duplicación**, **inversión** y **translocación**.
  - B. Las **numéricas**: **aneuploidía** (algunas son compatibles con la vida, como la trisomía 21) y la **poliploidía**.

Las aberraciones cromosómicas se estudian mediante **técnicas citogenéticas**, semejantes a las utilizadas para obtener los cariotipos

En función del **TIPO CELULAR** en que tengan las mutaciones, pueden tener lugar en células **germinales** (encargadas de la transmisión del material genético a la descendencia) o en células **somáticas** (posible origen de neoplasia).

## 3. Mecanismos moleculares

- Las mutaciones por **desfase** ocurren por formación de aductos, intercalación o roturas cromosómicas.
- Las **aberraciones cromosómicas** se originan por formación de aductos, interferencia con la división celular o roturas cromosómicas.
- Las mutaciones por **sustitución** se producen por: incorporación de análogos de las bases nitrogenadas; alteración química de las bases nitrogenadas; o por formación de aductos. Cuando se incorpora un análogo de la base, la mutación se produce **una vez se ha replicado el material genético**.

→ Alteración química de las bases nitrogenadas: es el caso del ácido nitroso y la hidroxilamina.

→ Formación de aductos: son mecanismos particulares. Dentro de los **aductos**, tenemos varios tipos: los de pequeño tamaño y los de gran tamaño. Dentro de los de **pequeño tamaño**: grupos alquilo (metilo y etilo) y compuestos alquilantes (gas mostaza, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, alquilsulfonatos). Dentro de los de **gran tamaño**: hidrocarburos aromáticos policíclicos, aflatoxinas, otros muchos.

→ En la **intercalación**, los agentes intercalantes se disponen entre las bases a lo largo del ADN y **afectan a su estructura**, alterando el buen funcionamiento de las polimerasas y otras proteínas que se unen al ADN. El resultado es la **inhibición de la síntesis del ADN y de la transcripción** así como la **inducción de mutaciones**. Ej: **naranja de acridina**, **bromuro de etilo**.

28.10.2014

#### 4. Métodos de evaluación de la mutagenicidad

Hay ensayos específicos que se han diseñado para detectar específicamente este tipo de toxicidad (mutagenicidad / genotoxicidad).

Según el **modelo experimental**, se dividen en ensayos **in vitro** (bacterias, levaduras o células eucariotas en cultivo) y ensayos **in vivo** (con modelos **animales**: exclusivamente roedores → rata o ratón). Los ensayos in vitro pueden realizarse en bacterias, levaduras y células eucariotas en cultivo (células con una membrana nuclear), que pueden ser líneas celulares o cultivo primario.

Según el **tipo de efecto** que detectan (recordar que hay 3 tipos de mutaciones): tenemos los que detectan **mutaciones génicas** (que pueden ser **in vitro** o in vivo → como las mutaciones pueden revertirse, son ensayos de reversión. Fundamentalmente se utilizan in vitro), los que detectan **alteraciones cromosómicas** (alteraciones tanto estructurales como numéricas. Hay 2 tipos de ensayos: los que verdaderamente

detectan alteraciones porque se ven células en metafase; y otro ensayo llamado de **micronúcleo**, que está sustituyendo al de alteraciones cromosómicas porque desde el punto de vista técnico es más sencillo de realizar y es más fácil identificar un micronúcleo que una alteración cromosómica, además de que el ensayo es susceptible de automatización) y por último el ensayo de **interacción con el ADN** (que detecta aductos, la **síntesis no programada de ADN** y **lesiones del ADN**. Son más complicados).

Las **características** de los ensayos que están validados son: que **identifican compuestos** con afinidad específica por el ADN, que tienen una **capacidad adecuada de transformación metabólica** (el compuesto electrofílico con actividad para pegarse al ADN se suele generar como producto de una biotransformación → los sistemas invitro carecen de un sistema de transformación metabólica), son **reproducibles** y fácilmente transferibles a otros laboratorios.

En los **ensayos de genotoxicidad** se incluye siempre, además del **control negativo** (disolvente o vehículo), un **control positivo** con una sustancia que se sabe resulta **mutagénica** en el sistema experimental y que además presentará el máximo nivel de mutagenicidad. Encontramos niveles basales de mutación (la mutación es una actividad espontánea, siempre hay) y si el compuesto es mutagénico se incrementarán esos niveles.

En las guías OCDE se pueden encontrar estos ensayos.

Para evaluar la genotoxicidad de un nuevo compuesto se suele aplicar una estrategia que consiste en utilizar una **batería de ensayos** (ningún tipo de ensayo es capaz de detectar por sí solo todos los tipos de mutación que hay). Estas baterías de ensayo constan de: **una fase I** (son dos ensayos **in vitro**: **mutación génica** en bacterias y otro de **aberraciones cromosómicas o micronúcleos** -las bacterias no tienen cromosomas y no podremos detectar sus mutaciones-) y una **fase II** (ensayo **in vivo**: **test del micronúcleo** en ratón).

Para los medicamentos existe una guía ICH.

En el **test de Ames** se considera que el compuesto es mutagénico si hay un incremento significativo de cualquiera de las estirpes y en cualquier condición.

En el **ensayo de aberraciones cromosómicas** se ensayan al menos tres concentraciones del producto en presencia y en ausencia de activación metabólica. Se considera que el resultado es positivo si se produce un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células con aberraciones en las células tratadas con el

producto, respecto del control negativo.

Un **micronúcleo** es una masa de cromatina que aparece en el citoplasma de la célula interfásica y contiene fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que no se han orientado correctamente en la anafase. Se produce como consecuencia de un compuesto que produce alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales. Cuando las cromátidas se separan, un cromosoma queda suelto, y cuando se divide la célula quedará en una de las dos células generando un núcleo pequeño aislado (micronúcleo).

En el **ensayo invivo** de la fase II tenemos un vehículo, una sustancia de ensayo y un control positivo, se deja el tratamiento durante 24, 48 y 72h y se extrae médula ósea (tejido que espontáneamente se está dividiendo) a partir del fémur.

## 5. Clasificación de compuestos mutagénicos

Se distinguen compuestos: genotóxicos, mutagénicos, clastogénicos y aneugénicos.

Un compuesto **genotóxico** es aquel que produce una **respuesta positiva en cualquier ensayo** biológico que mida cualquier parámetro de genotoxicidad, bien sea reactividad para DNA, reparación del DNA, mutación génica o alteraciones cromosómicas. Es el término más amplio. Si un compuesto da positivo en un ensayo de genotoxicidad, no quiere decir que ese compuesto sea mutagénico (aunque es lo más probable). Habría que realizar un ensayo de mutagenicidad para comprobarlo.

**Mutagénico**: produce una **respuesta positiva en cualquier ensayo de mutagenicidad** (los que hemos visto; excepto los que producen un aducto).

Un compuesto es **clastogénico** cuando da lugar a **alteraciones cromosómicas estructurales**.

Un compuestos es **aneugénico** cuando da lugar a **alteraciones cromosómicas numéricas**.

Si da + en la síntesis no programada de ADN el compuesto es genotóxico pero no mutagénico. Si da + en alteraciones in vitro: mutagénico, genotóxico, clastogénico o aneugénico.

# TEMA 13: TOXICIDAD DE LA REPRODUCCIÓN

## 1. Introducción

La **toxicología del desarrollo** es una parte de la toxicología que se encarga de: la identificación de aquellos **compuestos que alteran el desarrollo normal embrionario**, estudiar su **mecanismo de acción y evaluar el riesgo** derivado de la exposición (hace referencia únicamente al desarrollo embrionario)

Dentro de este área se encuentra la **teratología** (alteraciones del feto - tera=monstruo).

La **toxicología de la reproducción** incluye también las **fases previas de la reproducción** (hay mucho debate sobre la disminución de la fertilidad).

La **teratogénesis** es el proceso fisiopatológico por el cual se produce la malformación. Se emplea el término de teratógeno para aquellos compuestos que tienen esas propiedades.

En la mayor parte de los casos no se sabe a qué se debe la **causa** (etiología desconocida), aproximadamente un 15-25% se debe a defectos genéticos, el 4% por condiciones maternas (déficit de ácido fólico), el 3% por infecciones maternas (rubeola), 1-2% por causas mecánicas durante el parto, y por productos químicos menos del 1% (es muy difícil atribuir el efecto de un compuesto químico a la malformación).

En los 60 se encontraron malformaciones en el hombre por talidomida. La clínica hamburgo encontró 0 casos en 1940 y en el año 61 había 154 casos (aunque se estima que hubo más de 6000 afectados) de amelia y focomelia (malformaciones en el tamaño).

La talidomida tiene acción sedante y la peculiaridad de aliviar los vómitos. A partir de este momento se empiezan a realizar ensayos específicos para detectar este tipo de toxicidad fetal.

## 2. Períodos críticos de susceptibilidad

La **susceptibilidad** a la teratogénesis **varía según la fase del desarrollo** del embrión en el momento de producirse la exposición a la influencia adversa. Es un proceso muy complejo que ha evolucionado mucho en los últimos años.

Los **períodos críticos** de susceptibilidad son los fenómenos de **post-implantación** y **organogénesis** (3 primeros meses).

En la fase de preimplantación encontramos el cigoto, mórula y blástula. Una vez implantado encontramos la gástrula con sus 3 partes que darán lugar a todas las estructuras. La fase de preimplantación son 4-6 días, la postimplantación 6-20 días y la organogénesis 21-56 días. A partir del día 56 comienza el periodo fetal.

En el periodo de preimplantación se pueden producir fenómenos de letalidad embrionaria (efecto no detectable - se podría traducir como un retraso en la regla). Las dos siguientes fases son las más susceptibles en las que se pueden producir **alteraciones morfológicas y de retraso en el crecimiento**.

### 3. Diferencias interespecíficas

Las **diferencias interespecíficas** es un problema a la hora de estudiar la toxicidad. Estas diferencias se traducen en cambios en los **días de gestación** (es diferente en rata, conejo, mono, etc, aunque rata y conejo se parecen bastante).

Estas diferencias interespecíficas se deben por un lado al **metabolismo** que tenga lugar en la especie (es algo común a todos los efectos tóxicos) y la **accesibilidad**, tanto la accesibilidad **al embrión** (placenta lo protege: depende del flujo sanguíneos de la placenta, el metabolismo que haya en la placenta y la edad de la madre) como del **xenobiótico** (depende de su capacidad de unión a proteínas plasmáticas y las propiedades físico químicas que tenga).

### 4. Manifestaciones de las alteraciones en el desarrollo

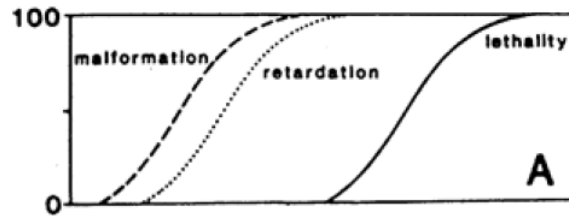
Los 4 tipos de **manifestaciones** de un desarrollo anormal son: **muerte** del embrión, **malformaciones** físicas, **retraso** en el crecimiento, **déficit funcional**.

Las manifestaciones de desarrollo anormal aumentan en frecuencia y grado conforme aumenta la **dosis**, desde no efecto hasta efecto totalmente letal. Si tiene un efecto, podrá consistir en una malformación física, en un retraso en el crecimiento o en la letalidad. El efecto máximo sería letalidad completa.

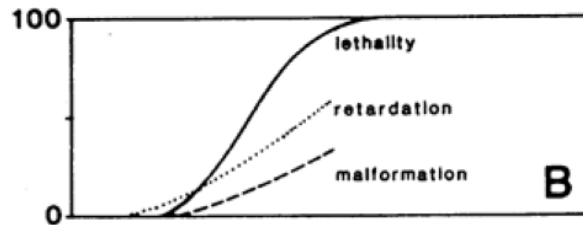
El **efecto teratogénico** es un efecto tóxico **con umbral** y de pendiente muy pronunciada (hay poca diferencia en dosis no tóxicas y tóxicas).

En los estudios con animales a dosis no tóxicas para la madre se han identificado 3 **patrones de respuesta**:

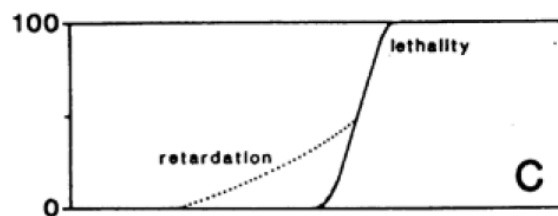
**Patrón A** (poco frecuente - es típico de compuestos con **potencial teratogénico alto**): a dosis estándar lo normal es encontrar malformaciones físicas y retardo en el crecimiento pero a dosis muy elevadas aparece letalidad.



**Patrón B** (más frecuente - típico de compuestos **citotóxicos** → metotrexato): existe una dosis en la que podemos tener fetos con retraso, malformaciones y letalidad.



**Patrón C** (típico de **compuestos que alteran los procesos celulares** fundamentales): no aparece malformaciones, sólo retraso, y a dosis altas aparece letalidad.



Muy importante: los compuestos con un potencial teratógeno alto producen su efecto a **dosis no tóxicas para la madre**.

La comparación de la dosis umbral de toxicidad (NOAEL) materna y fetal constituye una aproximación. El **cociente NOAELmadre/NOAELfeto debe ser alto si el compuesto es muy teratógeno**. Si es inferior a uno, el compuesto es poco peligroso. Si es mayor de 2-3 ya es peligroso (talidomida = 60). Si las dosis son tóxicas para la madre, lo normal es que también lo sean para el embrión, mientras que si las dosis no son tóxicas para la madre habrá un porcentaje pequeño que sí sea tóxico para el embrión.

## 5. Modos de evaluación

Los métodos de evaluación de la toxicidad de la reproducción se realizan en modelos animales de roedor o de otras especies, se debe tener en cuenta todo el ciclo sexual desde antes de la fecundación hasta la maduración sexual de la descendencia.

En la OECD hay una serie de ensayos diseñados específicamente para este tipo de estudios. También hay una guía ICH donde consultar la toxicidad de la reproducción (se hace cuando el medicamento está en fase 3 → diseño de estrategia de ensayo abierta basada en la aplicación y uso del medicamento, vía de administración prevista en humano, farmacodinamia, farmacocinética).

En los últimos años ha habido bastante proyectos europeos destinados a estos estudios y se han llegado a validar muy pocos experimentos. Hay varios modelos validados por ECVAM pero no son aceptados a nivel regulatorio.

Los estudios epidemiológicos son complicados de hacer porque se necesita un número de muestras elevado (que no hay), requiere evaluar la exposición (casi nunca se sabe cual es), evaluar las alteraciones, y porque hay un elevado porcentaje alto de abortos en preimplantación (pasan desapercibidos).

## 6. Compuestos teratógenos

Los productos químicos que son **teratógenos** son: talidomida, tetraciclina, ciclofosfamida, ácido valproico, dietilestilbestrol (cáncer de vagina en mujeres muy jóvenes), ácido cis-13-retinoico, sales de litio, metilmercurio, plomo, etanol, cocaína, humo de tabaco.

Condiciones teratógenas: radiación, infecciones (rubéola, varicela, HIV, megalovirus, virus de la encefalitis equina, toxoplasmosis, sífilis), desequilibrios metabólicos maternos (hipertermia, alcoholemia, diabetes, deficiencia de ácido fólico,

## TEMA 14: EVALUACIÓN DEL RIESGO

La **evaluación del riesgo** tiene como objetivo final **estimar la probabilidad que tiene un producto químico para producir efectos tóxicos**. La incertidumbre sobre este riesgo disminuye cuando se pasan de tener pocos datos a tener datos en animales y en humanos. Esta evaluación se puede realizar para todos aquellos compuestos que puedan representar un riesgo para la salud como los aditivos alimentarios, medicamentos, plaguicidas, contaminantes, etc.

Para hacer este tipo de evaluación necesitamos dos **tipos de datos**: datos del **producto químico** y datos de **exposición**.

En la medida que tengamos pocos datos, la incertidumbre será más alta. Cuando hacemos un experimento con animales, miramos tanto datos de exposición como de toxicidad. Cuando nos vamos a humanos, los datos están dispersos y no hay datos de exposición y enfermedad de forma simultánea.

### 1. Riesgo y percepción de riesgo

Riesgo y percepción de riesgo no es lo mismo. La **percepción de riesgo** es la **sensación o impresión que puede tener una determinada sociedad sobre lo que representa un riesgo para su salud**. Esto puede estar sobrevalorado o infravalorado. La percepción del riesgo es variable según las sociedades, países, puede variar a lo largo del tiempo...

El riesgo cero no existe. La investigación en toxicológica lo que hace es mejorar las predicciones de riesgo pero la sociedad es la que decide el nivel de riesgo dispuesta a asumir.

### 2. Proceso completo de evaluación del riesgo

La evaluación del riesgo siempre ha estado presente en los medicamentos, aditivos alimentarios (se utilizan índices como el IDA o ingesta diaria admisible, o el IDT o ingesta diaria tolerable), plaguicidas, productos químicos y contaminantes. En general, la población no está expuesta a los productos químicos (o lo está en fracciones muy bajas).

El proceso de la evaluación de riesgo consta de **3 fases**: la **evaluación del riesgo** (la que establece las condiciones de exposición seguras), la **gestión del riesgo** y la **comunicación del riesgo**.

La evaluación del riesgo incluye una serie de factores económicos, factores legales,

factores políticos, sensibilidad social, coste-beneficio, posibilidades reales. Ej: se prohíbe fumar en un bar cerrado para proteger la salud de los no fumadores.

### 3. Estrategias de evaluación del riesgo

Existen dos métodos que son mutuamente excluyentes: la caracterización del riesgo y los niveles de exposición aceptables.

Para **caracterizar el riesgo** se necesitan **datos experimentales en animales** y datos en **humanos** (estudios epidemiológicos). Hay muy pocos casos en los que tenemos datos en humanos.

Hay muchos compuestos químicos de los que tenemos datos experimentales en animales y lo que se hace es establecer los niveles de exposición aceptable (mediante NOAEL). Se intenta asegurar que los niveles de exposición está muy por debajo de aquellos niveles que dan efectos adversos en animales experimentales. Estos niveles de **exposición aceptable** se estiman mediante el **NOAEL + datos en animales**.

### 4. Fases de la evaluación del riesgo

Consisten en: identificación del peligro, evaluación de la exposición, evaluación de la dosis-respuesta, caracterización del riesgo.

Hay que distinguir dos conceptos que no son iguales en toxicología: peligro (hazard) y riesgo (risk). El **peligro** es la capacidad de una sustancia química para producir efectos adversos en condiciones apropiadas. Es una expresión cualitativa (produce tumores, malformaciones). El **riesgo** es la incidencia de un efecto adverso definido bajo unos determinados niveles de exposición. Es una expresión cuantitativa.

En cuanto a la **identificación del peligro**, se establecen prioridades en función de la toxicidad del compuesto y la exposición humana. La prioridad más alta la tienen los compuestos con una exposición humana alta y que sean muy tóxicos. La identificación se realiza mediante estudios: in vitro (citotoxicidad, mutagénesis), ensayos en animales (agudos, crónicos, mutagénesis, carcinogénesis), estudios QSAR (relación estructura-actividad), clínicos, epidemiológicos...

La **evaluación de la exposición** es muy difícil de realizar y es la fase que aporta más incertidumbre. Para evaluar la exposición hay que determinar el contacto de la población con el compuesto: averiguar su origen, vía de contacto, magnitud y duración del contacto. Lo que se hace con todo este proceso es definir el escenario de exposición, en el que se concreta cuáles son las vías de exposición posibles (oral, dérmica, inhalación. Si hablamos de producto alimenticio será la oral. Si es un producto

químico será inhalatoria o dérmica, etc), el tiempo de exposición (horas, días, años) y la frecuencia (una vez al día, cada 2h). La obtención de los datos se consiguen a partir de valoraciones directas de concentraciones, cuestionarios, a partir de muestras biológicas (sangre, orina, salivación)

La **evaluación de la respuesta** se obtiene a partir de datos en humanos o en animales (que son más exactos, pero tienen varios inconvenientes: extrapolación interespecífica, extrapolación a dosis bajas -se realizan a dosis muy altas-, poblaciones sensibles -la población animal es muy homogénea y lo normal es que tengamos poblaciones heterogéneas-)

Una vez realizadas las 3 fases anteriores, se **caracteriza el riesgo**, es decir, se integran los datos de identificación del peligro, evaluación de la exposición y evaluación de la relación dosis-respuesta para **cuantificar** el riesgo. Sin embargo, sólo si tenemos datos en humanos y potentes herramientas estadísticas podremos cuantificar el riesgo y el grado de incertidumbre. Si no tenemos datos en humanos, tendremos que tomar medidas preventivas de disminución del riesgo y de la exposición.

A partir de los NOAEL se estiman los límites de exposición tolerables para humanos en cualquier medio. El NOAEL es la mayor concentración o cantidad de una sustancia, determinada experimentalmente, que no produce efectos adversos observados bajo unas condiciones de exposición definidas. De todos los NOAEL que obtenemos de un estudio, escogemos el de la especie más sensible, el de la exposición más larga y efecto más sensible.

La **IDA** (ingesta diaria admisible) se emplea en aditivos y plaguicidas (JECFA, FAO-OMS). El **IDT** (ingesta diaria tolerable) se emplea en contaminantes (UE, EFSA) y el RfD se emplea en contaminantes (EPA).

El IDA es la ingesta diaria de un compuesto químico, que durante una vida entera, no representa un riesgo apreciable para la salud humana sobre la base de los datos conocidos hasta el momento.

A partir de las IDA o equivalentes, se estiman las **concentraciones máximas permisibles** (la máxima que se permite en un medio determinado). Para calcular la CMP se multiplica el IDT por el peso y se divide entre la tasa de ingestión.

Los valores del NOAEL se pueden utilizar para otros cálculos de riesgo, como por ejemplo para el margen de exposición (**MOE**) → utiliza valores de exposición humana.

# TEMA 15: TOXICIDAD DE MEDICAMENTOS

## 1. Toxicidad y reacciones adversas

Una **reacción adversa** es toda **respuesta lesiva, y no deseada**, que se presenta en las **dosis utilizadas habitualmente** en la especie humana para el tratamiento, la profilaxis o el diagnóstico de las enfermedades.

Las RAM no se distinguen de efectos secundarios (aquel que se deriva del efecto principal) o efectos colaterales.

Caso distinto es la toxicidad que se produce por **sobredosificación** (dosis por encima de las terapéuticas). La sobredosificación puede ser **absoluta** (cuando realmente el sujeto está expuesto a una **dosis más alta** que la terapéutica, bien accidentalmente o intencionadamente) o **relativa** (sobre todo por **causas genéticas**, tenemos **alteraciones en la farmacocinética** del compuesto y en las dosis internas. Estas causas relativas son particularidades de cada sujeto).

A partir de la tragedia de la talidomida, la sociedad se concienza mucho más de este tipo de problemas: se profundizó en los estudios precomercialización y se comenzaron los sistemas de farmacovigilancia. En España comienza el programa internacional de la farmacovigilancia de la OMS en 1982.

## 2. Métodos y sistemas de detección

Para **prevenir** y poder anticiparnos a problemas de toxicidad existen varios métodos. En la **fase preclínica** tenemos los **estudios preclínicos de toxicidad**. Una vez pasamos la barrera preclínica, pasamos a los **estudios clínicos** (Fase I, Fase II, Fase III), en donde los compuestos se retiran bien por falta de eficacia o por toxicidad. Una vez se **comercializa**, la **farmacovigilancia** se encarga de los posibles problemas de toxicidad que puedan aparecer.

Los estudios de Fase I se hacen con un **número de pacientes relativamente bajo** (20-100). No es representativo de la población. Por otra parte, estos estudios de fase clínica son de **corta duración** (sólo unos meses → en la diapo pone años) además de que **se excluyen** a niños, embarazadas, ancianos y pacientes con enfermedades muy graves o con múltiples afecciones.

Existen varios métodos de farmacovigilancia: **revisión de bibliografía científica**; **registros estadísticos de morbi-mortalidad**; **estudios post-comercialización** (Fase IV → los hace la propia empresa farmacéutica); **notificación espontánea** (se informa de la sospecha

diagnóstica a través de la tarjeta amarilla. Cada comunidad autónoma tiene su propio centro de farmacovigilancia SEFV, y todos los datos se integran en la base de datos de la AEMPS); estudios epidemiológicos.

El objetivo de la notificación espontánea es identificar los riesgos, perfilar la toxicidad de los medicamentos y caracterizar los grupos de riesgo. Ventaja: es un sistema universal. Inconvenientes: hay una infracomunicación y dificultad para calcular una incidencia real.

### 3. Clasificación de las RAM

Las dos clasificaciones más importantes son las tipo A y tipo B.

- A. Las tipo A (Augmented) dependen de la dosis y son previsibles. Son frecuentes pero no graves.
- B. Las tipo B (Bizarre) son poco frecuentes pero son las más graves. Son reacciones de idiosincrasia (factores genéticos implicados) y reacciones alérgicas
- C. Las de tipo C (Chronic, crónica) aparecen como consecuencia de tratamientos prolongados
- D. Las de tipo D ocurren en tiempo después de la exposición al fármaco. Es típico en carcinógenos.

### 4. Mecanismos de producción

Las causas farmacéuticas dan lugar a las tipo A: cantidad de medicamento (definida por condiciones de registro y controlada por las normas de correcta fabricación), velocidad de liberación del medicamento (efecto local como el efecto irritante de los AINES en el tubo digestivo, o efecto sistémico como la alteración en los sistemas de liberación retardada), anomalía en la prestación farmacéutica (principio activo caducado. Ej: tetraciclinas caducadas dan lugar al síndrome fanconi).

En la reacción de tipo I, durante la primera exposición del fármaco se produce IgE, que se une a los mastocitos. En la segunda exposición, el sistema inmune ya está preparado y se une directamente a los mastocitos, liberando mediadores de la inflamación (producen reacciones cutáneas, bronquiales y anafilácticas).

En la reacción de tipo II, durante la primera exposición se produce IgG e IgM. En la segunda exposición se une a la membrana de los eritrocitos, leucocitos, plaquetas y endotelio, produciéndose una citotoxicidad mediada por las células NK o el complemento, produciéndose hemólisis, leucopenia, trombocitopenia y vasculitis (en

función de a dónde se haya unido).

En la **reacción de tipo III**, durante la **primera exposición** hay **producción de IgG e IgM**. Pero en la **segunda exposición** hay **formación de complejos Ag-Ac circulantes**, que se depositan en los tejidos

En la **reacción de tipo IV** (celular), el **fármaco sensibiliza a los linfocitos T**, que liberan **linfocinas**, que activan a los **macrófagos**, que a su vez liberan **mediadores inflamatorios**.

Las personas que tienen un **déficit en la Glucosa-6-P DH** tienden a tener anemia hemolítica. Los fármacos **primaquina, quinina, sulfamidas y nitrofuranos** son fármacos oxidantes. Los que tienen un **déficit de metahemoglobina-reductasa** tienden a tener metahemoglobinemia y cianosis.

12.11.2014

## TEMA 16: TOXICIDAD DE ALGUNOS MEDICAMENTOS

### 1. Antiinflamatorios no esteroideos

Las RAM son: intolerancia y ulceración gástrica, bloqueo de la agregación plaquetaria, inhibición de la motilidad uterina, alteraciones de la función renal, reacciones de hipersensibilización.

Los mecanismos de lesión gástrica se producen por: un efecto directo, inhibición de la síntesis de PGE2 y PGI2, y por inhibición de la agregación plaquetaria.

Síntomas de la sobredosificación: síntomas digestivos (los + frecuentes: náuseas y vómitos), neurológicos (infrecuentes, excepto en niños y ancianos, como estupor, cefalea, nistagmus, diplopia, acúfenos, discinesias, delirio, desorientación, alucinaciones y coma), renales (más biológicas que clínicas).

Para el tratamiento se recomienda siempre la descontaminación digestiva con carbón activado. En general no está recomendado forzar la diuresis. Sí que está justificado disminuir la absorción. Conviene controlar hemograma y función renal al cabo de unos días.

La semivida de eliminación de estos fármacos es, con excepción del piroxicam, corta (<12h), por lo que es de prever la desaparición de las manifestaciones en < 24h, salvo las que afectan al hígado, riñón y médula ósea.

### 2. Medicamentos cardiovasculares

Son fármacos con margen de seguridad estrecho. Podemos tener dos situaciones: intoxicación crónica y aguda.

La intoxicación crónica es la más frecuente. Suele afectar a pacientes habitualmente mayores de 60 años, cardiopatas y que llevan meses o años en tratamiento digitalico. Posibles causas: alteraciones en la posología, potenciación por otros fármacos (antiarrítmicos e hipotensores), alteraciones farmacocinéticas por otros fármacos (calcio-antagonistas), insuficiencia renal, estados de deshidratación, abuso de diuréticos, hipopotasemia, hipomagnasemia, hipercalcemia.

El síntoma principal es la bradicardia (<40), aunque también hay lipotimias, síncope. A veces anorexia, náuseas, vómitos y diarrea. Excepcionalmente trastornos en la visión.

El **tratamiento** adecuado sería **suspender el tratamiento**, **monitorizar el ECG** y **corregir los trastornos hidroeléctricos**. El **pronóstico** general de esta intoxicación crónica es **buena** y **no se es habitual usar anticuerpos antidigital**.

La **intoxicación aguda** es mucho **menos frecuente pero más grave**. Los **síntomas** que aparecen son: **trastornos digestivos** (diarrea, vómitos, náuseas). A veces **trastornos de la visión**. Los trastornos del ECG pueden provocar una parada cardíaca en menos de 6h.

El **tratamiento** indicado es la **evaluación de las alteraciones hemodinámicas y ECG** y **corrección de las mismas**, **descontaminación digestiva** y **anticuerpos antidigital** (IV).

### 2.1. Nitratos

En este caso podemos tener **varias posibilidades**: **sobredosificación por vía oral o transdérmica**, **sobredosificación por vía IV hospitalaria**, **intoxicación industrial**.

Los **síntomas** de una **intoxicación** son: **metahemoglobinemia** (porque oxidan la hemoglobina, dando lugar a fenómenos de cianosis).

**Tratamiento**: **descontaminación digestiva**; en caso de metahemoglobinemia **tratamiento con azul de metileno**; **tratamiento sintomático**.

Por vía oral **se necesitan dosis relativamente altas** (25 comprimidos) para llegar a la dosis tóxica.

## 3. Medicamentos del SNC

### 3.1. Antipsicóticos

Los antipsicóticos tienen un índice terapéutico alto.

Las **RAM** son: **distonía aguda** (espasmos músculos, lengua, cara, cuello, espalda), parkinsonismo (bradicinesia, rigidez, temblor, facies de máscara), **acatisia** (sensación subjetiva de necesitar moverse continuamente), **temblor perioral** (después de meses o años de tratamiento), **disquinesias tardías** (después de meses o años de tratamiento). En algunos casos puede aparecer **eosinofilia**

Los **síntomas** de la **intoxicación**: **disminución de conciencia**, ausencia de depresión respiratoria, conservación del tono muscular; pueden mostrarse **agresivos** si se les estimula; pueden tener **signos anticolinérgicos** (midriasis, sequedad de boca, hiperperistaltismo); sólo las grandes sobredosis o las asociaciones con otros psicofármacos producen **coma**, **hipotensión** e **hipotermia**; los **cambios electrocardiográficos** son frecuentes (la muerte se produce por fallo cardíaco¿?)

**Tratamiento:** descontaminación digestiva, tratamiento sintomático y de soporte, no hay antídoto, las manifestaciones anticolinérgicas pueden corregirse con fisostigmina.

El síndrome neuroléptico maligno es un síndrome muy grave y se da tanto en intoxicación crónica como aguda. Es más frecuente en hombres jóvenes, con mal estado general, en los que se asocia a alcoholismo o una toxicomanía. Este síndrome debe sospecharse siempre que se presenta: disminución de la conciencia, rigidez muscular, hipertermia (>40), rabdomiolisis. Es idiosincrásica y puede ser fatal.

**Tratamiento:** interrumpir cualquier administración medicamentosa, refrigeración externa e hidratación, tratamiento específico (mirar fármacos).

### 3.2. Sedantes

Las RAM típicas de las BZP son el aumento de la hostilidad e irritabilidad, estados de confusión mental en ancianos, aumento de peso y de apetito. Otros erupción cutánea, náuseas, agranulocitosis.

Los síntomas de la intoxicación son típicos de la depresión del SNC: estupor, disartria (dificultad para hablar), somnolencia, obnubilación, coma, hipotonía; el coma profundo o la depresión respiratoria son excepcionales; la asociación con alcohol etílico es muy frecuente, lo que puede potenciar manifestaciones de depresión del SNC; algunos pacientes desarrollan bradicardia, sin repercusión hemodinámica.

**Tratamiento:** descontaminación digestiva, en situación aguda tratamiento sintomático; flumazenilo es antídoto específico.

### 3.3. Antidepresivos

Podemos distinguir 4 grandes grupos de medicamentos utilizados para tratar los estados depresivos: antidepresivos cíclicos, inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la monoaminoxidasa, las sales de litio.

#### ATC

RAM los típicos son efectos antimuscarínicos (sequedad de boca, gusto metálico o amargo, distrés epigástrico, estreñimiento, discinesia, taquicardia, palpitaciones), debilidad y fatiga, hipotensión ortostática, toxicidad cardíaca, transición hacia un estado de excitación maníaca, problema de memoria y concentración, aumento del riesgo de convulsiones.

**Sobredosificación:** es la causa más común de ingresos por tóxicos en los servicios de urgencias, sólo por detrás de la combinación de alcohol y drogas.

**Síntomas de intoxicación:** breve fase de agitación e inquietud, afecciones

cardiovasculares y síndrome anticolinérgico.

**Tratamiento:** medidas para disminuir la absorción, tratamiento y soporte; en la fase inicial no suele hacer falta tratamiento, sin embargo, a partir de las 12h las manifestaciones pueden volverse más problemáticas; el antídoto es la fisostigmina

### ISRS

Son los más seguros del mercado.

**Síntomas de la intoxicación:** producen un síndrome serotoninérgico, que puede ser leve, moderado o grave. En el leve hay temblor, náuseas, vómitos, cefaleas, midriasis, confusión, sudoración. En el moderado hay inquietud, incoordinación en la marcha, taquicardia y HTa, agitación. En el grave hay trastornos electrocardiográficos, castaño de dientes y rigidez muscular.

El **tratamiento** es descontaminación digestiva, sintomático y de soporte, no existe ningún antídoto específico

### IMAO

Síntomas de **intoxicación:** lo más característico es la crisis hipertensiva,

**Tratamiento:** descontaminación digestiva, período de observación prolongado (mínimo 12h), con control de ECG y hemodinámico; no existe antídoto.

**Dosis tóxicas:** aproximadamente 100-200 mg producen intoxicaciones graves y 250-400 mg podrían resultar mortales. La coingesta de ATC o de inhibidores de la serotonina potencian la gravedad de la intoxicación.

### Sales de litio

Tienen un bajo índice terapéutico. Hay amplias diferencias interindividuales en la absorción oral, lo que obliga a la monitorización de los niveles plasmáticos.

**Dosis tóxicas:** 50 mg/kg - 100 mg/kg (9-18 pastillas de PLENUR) según si el paciente está o no tratado.

**RAM:** náuseas, vómitos

**Síntomas de la intoxicación:** dependen de si el paciente estaba en tratamiento con sales de litio o si la intoxicación es crónica. Si el paciente no estaba en tratamiento con sales de litio: debuta con náuseas, vómitos y diarrea, síntomas neurológicos característicos. Si el paciente estaba en tratamiento: debuta con náuseas, vómitos y diarreas. **Intoxicación crónica:** por aumento de dosis o por concomitancia con otros fármacos.

Tratamiento: descontaminación digestiva, no es eficaz el carbón activado, sintomático y de soporte, no hay antídoto, moderada diuresis forzada neutra de al menos de 2h.