

Ciencia e Investigación

Primera revista argentina de información científica / Fundada en enero de 1945



EL CADMIO COMO CITOTÓXICO Y METALOHORMONA. EFECTOS SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO

■ Beatriz H. Duvilanski y Jimena P. Cabilla

EL MERCURIO COMO AGENTE INDUCTOR DE DAÑO RENAL

■ Adriana Mónica Torres

DIETA Y SALUD

■ Marcela M. López Nigro, Natalia A. Casanova y Marta A. Carballo

EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS EN LA VIDA INTRAUTERINA

■ Gladis Magnarelli, Natalia Guiñazú y María Gabriela Rovedatti

LA HERENCIA Y LA TOXICIDAD INTERACCIONAN EN LAS PORFIRIAS

■ María Florencia D'Andrea y Marta Blanca Mazzetti

EFECTOS TÓXICOS DE LOS FÁRMACOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

■ José A. Castro

COMPROMISO

con el bienestar de todos

HACEMOS
ENERGÍA
NUCLEAR



NUCLEOELÉCTRICA ARGENTINA S.A.

ATUCHA I / ATUCHA II / EMBALSE

Despejá tus dudas sobre la energía nuclear en: www.na-sa.com.ar



Ministerio de
Planificación Federal,
Inversión Pública y Servicios
Presidencia de la Nación

EDITOR RESPONSABLE

Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC)

COMITÉ EDITORIAL

Editora

Dra. Nidia Basso

Editores asociados

Dr. Gerardo Castro

Dra. Lidia Herrera

Dr. Roberto Mercader

Dra. Alicia Sarce

Dr. Juan R. de Xammar Oro

Dr. Norberto Zwirner

CIENCIA E

INVESTIGACIÓN

Primera Revista Argentina de información científica.

Fundada en Enero de 1945.

Es el órgano oficial de difusión de La Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias.

A partir de 2012 se publica en dos series, Ciencia e Investigación y Ciencia e Investigación Reseñas.

Av. Alvear 1711, 4° piso,
(C1014AAE) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Teléfono: (+54) (11) 4811-2998
Registro Nacional de la Propiedad Intelectual
N° 82.657. ISSN-0009-6733.

Lo expresado por los autores o anunciantes, en los artículos o en los avisos publicados es de exclusiva responsabilidad de los mismos.

Ciencia e Investigación se edita on line en la página web de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC)
www.aargentinapciencias.org

El alquimista (Mattheus von Helmont: Antwerp 1623 - Bruselas posterior a 1679. Óleo sobre tela, 57.2 x 41.9 cm). Chemical Heritage Foundation, Filadelfia, EE.UU. Ese curioso primordial, precursor del científico actual, se interesó por los secretos de las sustancias, su naturaleza y sus efectos.



SUMARIO

EDITORIAL

Los mecanismos de la acción tóxica: Base racional para la evaluación del riesgo por exposición a las sustancias químicas

Gerardo D. Castro 3

ARTÍCULOS

El cadmio como citotóxico y metalohormona. Efectos sobre el eje hipotálamo-hipofisario

Beatriz H. Duvilanski y Jimena P. Cabilla..... 5

Exposición ambiental a plaguicidas en la vida intrauterina: Mecanismos toxicológicos involucrados en los efectos a corto y largo plazo

Gladis Magnarelli, Natalia Guiñazú y María Gabriela Rovedatti 23

La herencia y la toxicidad interaccionan en las porfirias

María Florencia D'Andrea y Marta Blanca Mazzetti 39

El mercurio como agente inductor de daño renal

Adriana Mónica Torres..... 58

Dieta y salud

Marcela M. López Nigro, Natalia A. Casanova, Marta A. Carballo. 69

Efectos tóxicos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Un problema frecuente en la quimioterapia de las enfermedades tropicales

José A. Castro 78

INSTRUCCIONES PARA AUTORES 93

... La revista aspira a ser un vínculo de unión entre los trabajadores científicos que cultivan disciplinas diversas y órgano de expresión de todos aquellos que sientan la inquietud del progreso científico y de su aplicación para el bien.

Bernardo A. Houssay

Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias

COLEGIADO DIRECTIVO

Presidente
Dr. Miguel Ángel Blesa

Vicepresidente
Dr. Eduardo H. Charreau

Secretaria
Dra. Alicia Sarce

Tesorero
Dr. Marcelo Vernengo

Protesorero
Dra. Lidia Herrera

Presidente Anterior
Dra. Nidia Basso

Presidente Honorario
Dr. Horacio H. Camacho

Miembros Titulares
Ing. Juan Carlos Almagro
Dr. Alberto Baldi
Dr. Máximo Barón
Dr. Gerardo D. Castro
Dra. Alicia Fernández Cirelli
Ing. Arturo J. Martínez
Dr. Alberto Pochettino
Dr. Carlos Alberto Rinaldi
Dr. Alberto C. Taquini (h)
Dr. Juan R. de Xammar Oro

Miembros Institucionales
Sociedad Argentina de Cardiología
Sociedad Argentina de Farmacología Experimental
Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial
Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica
Sociedad Argentina de Investigación Clínica
Unión Matemática Argentina

Miembros Fundadores
Dr. Bernardo A. Houssay – Dr. Juan Bacigalupo – Ing. Enrique Butty
Dr. Horacio Damianovich – Dr. Venancio Deulofeu – Dr. Pedro I. Elizalde
Ing. Lorenzo Parodi – Sr. Carlos A. Silva – Dr. Alfredo Sordelli – Dr. Juan C. Vignaux – Dr.
Adolfo T. Williams – Dr. Enrique V. Zappi

AAPC
Avenida Alvear 1711 – 4º Piso
(C1014AAE) Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina
www.aargentinapciencias.org

LOS MECANISMOS DE LA ACCIÓN TÓXICA: BASE RACIONAL PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO POR EXPOSICIÓN A LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS

■ Gerardo D. Castro^{1,2}

1. Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX-UNIDEF). CITEDEF. Juan B. de La Salle 4397, Villa Martelli. E-mail: gcastro@citedef.gob.ar

2. Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de General San Martín. Av. 25 de Mayo y Francia, San Martín. E-mail: gcastro@unsam.edu.ar

Quizás pueda situarse en la alquimia el comienzo (documentable) de la necesidad de entender la naturaleza y la acción de las sustancias químicas. Los alquimistas no sólo intentaban encontrar la piedra filosofal, también querían comprender como se componían los elementos y sustancias que observaban en todas las formas y seres de su entorno. Esto puede considerarse como un estado primordial de la ciencia, del deseo de entender como funcionan las cosas en la Naturaleza.

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

Mucha agua ha corrido bajo el puente de la investigación en Toxicología y es bastante también el conocimiento acumulado sobre las interacciones entre los tóxicos y los blancos celulares que son críticos para su función y su viabilidad y, en última instancia, críticos para el organismo entero. Aún así, también es mucho lo que no se sabe: sustancias nuevas, exposiciones nuevas, el problema de las mezclas de sustancias, los condicionamientos que impone el entorno biológico y, lo más importante, la interacción de todos estos factores modulando el efecto tóxico.

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

La relevancia de este conocimiento sobre una sustancia potencialmente tóxica puede visualizarse en ámbitos tan diversos como el folleto que acompaña a un medicamento, en las regulaciones sobre el uso de aditivos alimentarios, en las tolerancias para contaminantes en atmósferas laborales, en los límites permitidos para residuos de plaguicidas en distintas matrices o de contaminantes naturales en aguas, suelos...

En los artículos que componen este número de Ciencia e Investigación hemos incluido el "análisis de caso" de una variedad de tóxicos y de situaciones de exposición que muestran claramente porqué es necesario saber antes de opinar en Toxicología: metales pesados, plaguicidas, fármacos o sustancias naturales, todos son más o menos tóxicos sobre algún "blanco" del organismo en alguna circunstancia, y la relación no es casual, es causal. Hay razones por las cuales el daño sucede de algún modo determinado y en algún sitio y no en otro.

La ecuación riesgo-beneficio para la exposición humana a un tóxico no es estática, si no que variará en la medida en que mayor sea la comprensión del caso. El estudio de los mecanismos de la acción tóxica de las sustancias constituye un campo apasionante para la investigación mal llamada "básica" y es lo que hemos querido transmitir aquí, con estos ejemplos.

EL CADMIO COMO CITOTÓXICO Y METALOHORMONA. EFECTOS SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO

Palabras clave: cadmio, estrés oxidativo, proliferación celular.
Key words: cadmium, oxidative stress, cell proliferation.

En las últimas décadas, la contaminación ambiental ha aumentado considerablemente y junto con ella la preocupación concerniente a los efectos adversos de diferentes tóxicos ambientales. Entre ellos, el cadmio (Cd), un metal pesado ampliamente usado en la industria y presente en altas concentraciones en el humo del cigarrillo, ha sido objeto de numerosos estudios. Con una vida media muy larga dentro del organismo y una notoria capacidad de bioacumulación, el Cd es en sí una grave amenaza para la salud. Como muchos tóxicos, los efectos del Cd en el organismo dependen de la concentración del metal, del tiempo de exposición al mismo y de la susceptibilidad diferencial de los tejidos a su acción. Generalmente el Cd a concentraciones micromolares -tanto *in vivo* como *in vitro*- provoca en órganos endocrinos estrés oxidativo, muerte celular por apoptosis y desbalance hormonal. A concentraciones nanomolares, el Cd es capaz de mimetizar los efectos del estrógeno -hormona clave en la reproducción con acción en tejidos como útero y mama- con potenciales implicancias en la aparición y desarrollo de patologías neoplásicas hormona-dependientes. Este manuscrito se enfoca en los resultados de las investigaciones de nuestro laboratorio con respecto a los efectos tanto citotóxicos como proliferativos del Cd sobre el sistema hipotálamo-hipofisario y se discute sobre posibles tratamientos para revertir sus efectos deletéreos.

In the last decades, environmental pollution has considerably increased and also the concern regarding the adverse effects of many environmental toxicants. Among them, cadmium (Cd), a heavy metal widely used in industry and present in high concentrations in cigarette smoke, has been the subject of numerous studies. Once in the organism it shields a very long half-life and a remarkable ability to bioaccumulate, which makes of Cd a serious threat to health. As many toxics, Cd effects in the body depend on the metal concentration, exposure time and differential susceptibility of tissues to its action. Generally, Cd at micromolar concentrations in endocrine organs causes oxidative stress, cell death by apoptosis and hormonal imbalance both, *in vivo* and *in vitro*. At nanomolar concentrations, Cd is able to mimic the effects of estrogen -reproductive hormone with key actions in tissues such as uterus and breast- with potential implications for the onset and progression of hormone-dependent neoplastic diseases.

This manuscript focuses on the results from our laboratory regarding to both, proliferative and cytotoxic effects of Cd on the hypothalamus-pituitary system and discusses possible treatments to reverse its deleterious effects.

"Alle Dinge sind ein Gift und nichts ist ohne Gift

Allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist"

(Todas las cosas son veneno y nada es sin veneno.

Sólo la dosis hace que una cosa no sea un veneno).

Paracelso, 1493-1541

■ INTRODUCCIÓN

Los metales han sido utilizados por el hombre desde la antigüedad. El uso antropogénico de los mismos ha llevado a su dispersión global y a la contaminación del medio ambiente. Las plantas y los animales, entre ellos el hombre, están expues-

tos a una variedad de metales a través del alimento, del agua y del suelo. Ciertos metales al no ser biodegradables persisten en el medio ambiente por períodos muy largos y causando problemas ecotoxicológicos muy serios.

Muchos de los elementos metá-

■ **Beatriz H. Duvilanski*,
Jimena P. Cabilla**

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIO-MED) UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155 piso 10, C1121ABG, Buenos Aires, Argentina.

*neuroend@ffyb.uba.ar

licos, tales como el zinc, el cobre, el calcio, el cromo trivalente, el cobalto, el magnesio y el hierro, en concentraciones traza son esenciales para la vida e intervienen en diversos ciclos bioquímicos ya sea por sí mismos o como constituyentes del centro activo de numerosas enzimas. Estos elementos traza están involucrados en una variedad de funciones celulares tales como el control de la transcripción genética, la conducción del impulso nervioso, el transporte de oxígeno; de esta forma regulan eventos moleculares vitales dentro de la célula, tales como la expresión genética, el metabolismo, la proliferación y la muerte celular. Sin embargo, en el medio ambiente y debido al uso cada vez más extendido, se ha incrementado la presencia de muchos otros elementos metálicos que no son esenciales para la vida tales como mercurio (Hg), cadmio (Cd), níquel (Ni), aluminio (Al), plomo (Pb), cromo hexavalente (CrVI), arsénico (As) y otros. Estos elementos metálicos, sin efectos benéficos conocidos en humanos son, por sus características, capaces de mimetizar a los metales esenciales y de esta manera afectar, activando o desactivando, los procesos moleculares regulados por ellos (Rana, 2008). A diferencia de los metales traza esenciales que pueden ser tóxicos cuando son incorporados a la célula en concentraciones elevadas, los no esenciales son tóxicos cualquiera sea su concentración aunque sus efectos sean diferentes dependiendo de ella.

Existen evidencias que indican que el Hg, el Cd, el As, el Pb y el CrVI son cancerígenos pero también exhiben un amplio rango de efectos tóxicos sobre la mayoría de los sistemas del organismo, efectos que dependen del grado y el tiempo de exposición además de la edad del individuo expuesto (Agency for Toxic Substances and Disease Registry,

2008; Sears y col., 2012).

En general, la exposición prolongada a estos elementos metálicos lleva a una predisposición a enfermedades renales, cardiovasculares, inmunológicas, endocrinas, hepáticas, óseas y neurológicas. Los niños y los fetos son los que corren más riesgo ya que la exposición temprana predispone potencialmente a dichas enfermedades en los jóvenes y, debido a la mayor susceptibilidad del sistema nervioso, a problemas cognitivos y conductuales. La exposición en poblaciones adultas aumenta la presencia de las enfermedades relacionadas con la mayoría de los sistemas del organismo y favorece un declive temprano de la función cognitiva (Sears y col., 2012).

La exposición a los elementos metálicos puede tener un origen natural o antropogénico. Algunas poblaciones por sus características geoquímicas están expuestas a elevados niveles de elementos tóxicos, por ejemplo, se encuentran niveles elevados de As y CrVI en regiones de Asia como Bangladesh, de As en la zona cordillerana de Argentina y Chile y en diferentes regiones de México y Estados Unidos de América (Bardullas y col., 2008). Por su parte, el Cd y el Hg así como también el Pb y el CrVI son productos cuyo origen es principalmente antropogénico. Los desechos industriales contaminan las aguas y los suelos y como consecuencia los vegetales, las carnes, los granos, los alimentos marinos (mariscos, peces y otros). (Copes y col., 2008; Perilli y col., 2010)

El problema más grave que inicialmente enfocó la atención de los investigadores sobre estos metales y metaloides pesados se basó en sus efectos nocivos sobre la salud reproductiva, lo cual llevó a que fueran

denominados **“toxinas reproductivas”**. El deterioro de la salud reproductiva es un problema mundial no sólo como consecuencia de la disminución en la fertilidad femenina y masculina sino también por los efectos deletéreos en la salud de las generaciones futuras.

La envergadura de este problema mundial pero también muy nacional, la importancia del eje hipotálamo-hipofisario en la reproducción y los conocimientos aún escasos del efecto de estos elementos metálicos sobre el mismo, nos condujo a investigar el efecto de algunos metales y metaloides (Cd, Cr VI, As) sobre dicho eje (Quinteros y col., 2007; Nudler y col., 2009; Ronchetti y col., 2012). En este trabajo nos dedicaremos a mostrar los estudios realizados particularmente con Cd.

■ CADMIO

El Cd es un componente natural de la corteza terrestre. Este metal está ampliamente disperso en todo el ecosistema y se encuentra a menudo combinado con otros elementos, como el zinc, el plomo y el cobre.

La presencia de Cd en el ambiente tiene, en buena parte, un origen natural tal como el producido como consecuencia de la actividad volcánica. La erosión de las rocas y los incendios forestales constituyen otras formas naturales de liberación de este metal. Sin embargo, actualmente, gran parte del Cd liberado al ambiente proviene de diferentes actividades humanas (Thornton, 1992). El uso industrial del Cd se ha expandido notablemente a partir de la mitad del siglo pasado. El Cd es utilizado en la elaboración de algunos plaguicidas y fertilizantes, en la galvanoplastia, en la fabricación de pilas y baterías, en la estabilización de algunos plásticos y en la indus-

tria minera (Goering y col., 1995; Satarug y col., 2003). Otras fuentes importantes de descarga de Cd al ambiente son la quema de combustibles fósiles (como el carbón o el petróleo) y la incineración de los residuos domésticos comunes.

La exposición humana al Cd se produce primariamente a través de la inhalación o ingestión siendo mucho mayor el porcentaje absorbido por la vía inhalatoria. Esta vía es muy significativa en los soldadores (Bernhoft, 2013). La inhalación del humo del tabaco es otra importante fuente de intoxicación por Cd (Koller, 1998). Se sabe que la planta de tabaco acumula Cd del suelo y que puede alcanzar concentraciones muy elevadas (Scherer y Barkemeyer, 1983; Chaney y col., 1999). El óxido de cadmio formado durante la combustión del cigarrillo es altamente absorbible por el organismo y aproximadamente el 50% del metal inhalado ingresa a circulación. Se ha detectado hasta 5 veces más Cd en los órganos de los fumadores que en los de los no fumadores (Benedetti y col., 1999; Satarug y col., 2003).

La capacidad de ciertas plantas de acumular Cd del suelo y ser relativamente resistentes a sus efectos tóxicos (De Figueiredo, 1965) está siendo aprovechada para la fitorremediación de suelos contaminados (Liu y col., 2012; Shukla y col., 2012).

La exposición al Cd por ingestión sucede a través del agua y/o los alimentos contaminados (carne, vegetales, peces, crustáceos, etc.). Diferentes drogas y suplementos dietarios también pueden ser una fuente de contaminación (Genuis y col. 2012). La exposición ocupacional incrementa aún más el grado de intoxicación pues se suman al consumo de agua o alimentos contaminados, la inhalación del humo o del

polvo en el lugar de trabajo (Miura, 2009).

Los efectos tóxicos del Cd dependen de la vía de acceso, la cantidad y el grado de exposición. El Cd se elimina difícilmente, con lo cual se va acumulando en los diferentes tejidos y alcanza una vida media mayor a 20 años en el organismo. La exposición prolongada al Cd ha sido asociada a numerosos problemas de salud en humanos que se manifiestan en el desarrollo y funcionalidad de diversos órganos y sistemas, produciendo alteraciones neurológicas, óseas, cardiovasculares, reproductivas, endocrinas, inmunológicas, así como en el desarrollo de diferentes tumores. Este metal ha sido clasificado como un carcinógeno humano de tipo I por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) y por el Programa Nacional de Toxicología (International Agency for Research on Cancer, 1993; Huff y col., 2007). La inhalación de Cd durante períodos largos es una de las causas condicionantes para el desarrollo de cáncer de pulmón y de mama (Waalkes y col., 1999; Waisberg y col., 2003; Mosavi-Jarrahi y col., 2009; Beveridge y col., 2010), hecho que ha sido observado en el caso de muchos de los fumadores.

Clínicamente, el riñón es el órgano humano que sufre el mayor impacto tóxico del metal. El Cd induce estrés oxidativo y daño mitocondrial, lo cual lleva a la muerte celular programada o apoptosis de las células tubulares. El daño renal determina que se afecten las múltiples funciones de este órgano como la filtración y la reabsorción, la síntesis de vitamina D, etc. que pueden llevar al Síndrome de Fanconi, a una mayor susceptibilidad a la diabetes, la osteomalacia y/o la osteoporosis (Bernhoft, 2013). El ejemplo más extremo de la intoxicación prolongada con Cd es la enfermedad de itai-itai

en Japón (Jarup y col., 1998; Ogawa y col., 2004).

El Cd parece tener un papel determinante como inductor de cáncer en tejidos hormona-dependientes tales como mama, útero, ovario y próstata (García-Morales y col., 1994; Antila y col., 1996; Martin y col., 2003; Siewit y col., 2010), hechos observados principalmente en animales experimentales o en células *in vitro*. Apoyando estos estudios, hallazgos recientes en humanos han mostrado una estrecha relación entre los niveles de Cd en sangre y el cáncer de mama (Nagata y col., 2013; Lafuente, 2013), así como también con el cáncer de páncreas y la mortalidad cardiovascular (Lukkett y col., 2012) o con alteraciones endocrinas (Ciarroca y col., 2013). Sin embargo, hay que considerar que el individuo no está expuesto a un solo metal en el ambiente sino a una mezcla de ellos que potencian entre sí sus efectos nocivos favoreciendo el desarrollo de enfermedades neoplásicas.

■ EL CADMIO SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO

El eje hipotálamo-hipofisario controla la homeostasis del organismo. Regula funciones fisiológicas básicas como el crecimiento, la reproducción y el metabolismo, así como también la adaptación a cambios del medio externo y al estrés.

El hipotálamo es una estructura nerviosa situada en la base del encéfalo. Es el sitio de la regulación neuroendocrina, autonómica y homeostática ya que actúa como un centro integrador que coordina mensajes del entorno, ritmos, patrones de desarrollo endógenos y señales corporales para evocar respuestas autonómicas y endocrinas.

La hipófisis es la glándula en-

docrina directriz. Se localiza en la región ventral del cerebro, aunque fuera de la barrera hematoencefálica, en íntima relación con el hipotálamo a través de la eminencia media y el tallo pituitario (Page y col., 1994). Está compuesta por el tallo pituitario, la hipófisis anterior o adenohipófisis y la hipófisis posterior o

neurohipófisis.

La adenohipófisis es la glándula productora de cinco hormonas: prolactina, hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante de tiroideas (TSH) y adrenocorticotrofina (ACTH), que regulan las respectivas

glándulas periféricas y los tejidos efectores.

A su vez, existe un retrocontrol desde las diferentes glándulas periféricas hacia el hipotálamo y la hipófisis (**Figura 1**).

■ EL CADMIO Y LA SECRECIÓN HORMONAL

Diferentes estudios han demostrado que el Cd afecta la secreción de varias hormonas, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como también que existe una relación neta entre los niveles de Cd plasmático y las alteraciones en los niveles de dichas hormonas en animales de experimentación y en humanos (Iavicoli y col., 2009; Lafuente, 2013).

Con respecto a los efectos del Cd a nivel neuroendocrino y en especial sobre la glándula adenohipofisaria, las evidencias iniciales indicaban que este metal modificaba la liberación de neurotransmisores hipotalámicos y la secreción hormonal adenohipofisaria (Lafuente, 2013). Sin embargo, no se conocía si éste era un efecto directo ni sus mecanismos de acción. Iniciamos nuestro estudio demostrando que el Cd se acumula tanto en el hipotálamo como en la glándula hipofisaria así como también en el hígado. La acumulación de Cd es mayor en la glándula hipofisaria que en el hipotálamo (Poliandri y col., 2003). También se ha observado que se acumula en las gónadas (Lafuente, 2013).

Como mencionamos más arriba el Cd es un disruptor endocrino el cual, dependiendo de la concentración, es capaz de inhibir o estimular la secreción hormonal adenohipofisaria.

El Cd es capaz de actuar a nivel hipotálamo-hipofisario causando estrés oxidativo, impidiendo la función

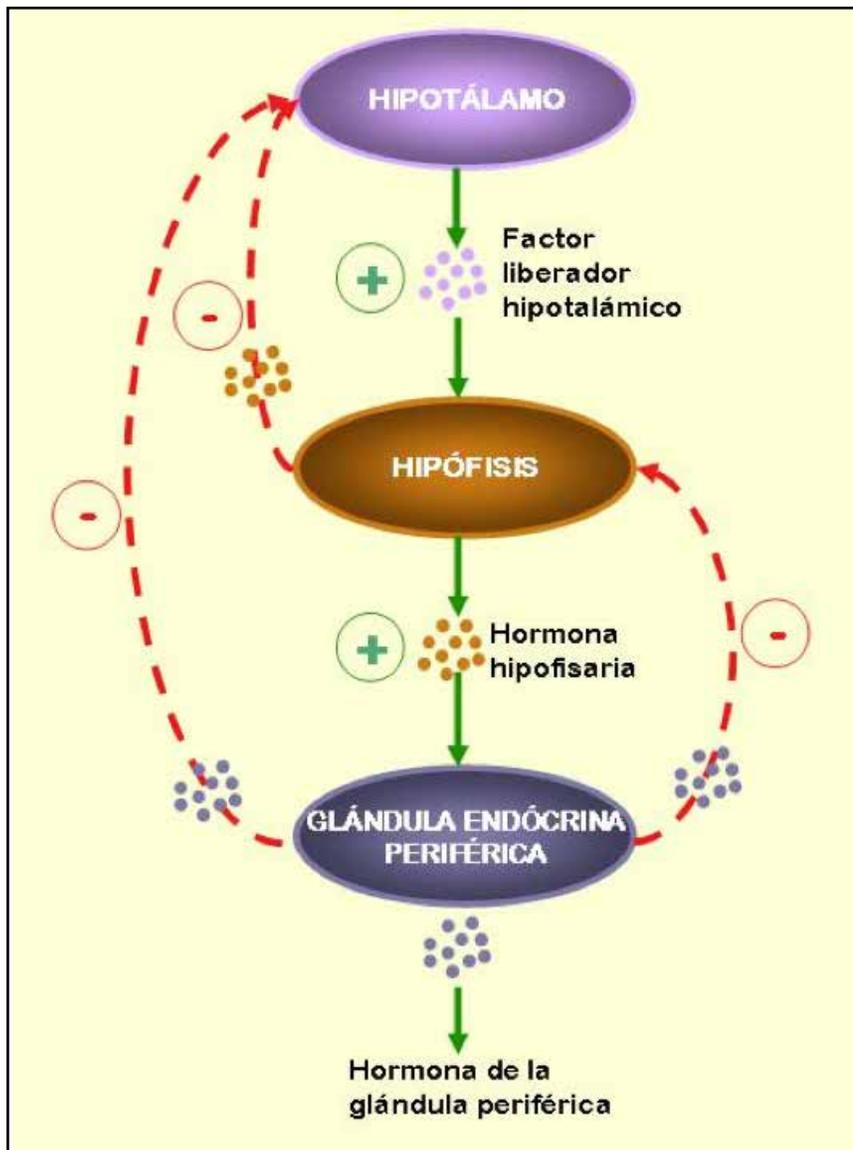


Figura 1. Caminos clásicos de control en el eje hipotálamo-hipófisis-glándula periférica. Las células de la adenohipófisis responden a factores estimuladores hipotalámicos (+) secretando la hormona correspondiente hacia la circulación general. Esta hormona ejerce su efecto (+) en una glándula periférica blanco y a su vez sobre el hipotálamo generando un circuito inhibitorio corto (-) de manera de regular su propia secreción. La glándula periférica responde secretando su propia hormona, que tiene efecto sobre los tejidos receptores. Además, forma un circuito inhibitorio largo (-) que al actuar a nivel del eje hipotálamo-hipofisario regula su propia secreción.

mitocondrial e induciendo apoptosis, *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, este metal es capaz de mimetizar los efectos de los estrógenos sin serlo, al actuar como un metaloestrógeno. Uno de los blancos preferenciales del Cd a nivel adenohipofisario es la secreción de prolactina y las células que la liberan, los lactotropos.

■ EL CADMIO COMO INHIBIDOR DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA

Estudios in vitro y mecanismos de acción.

El estudio del efecto de la exposición al Cd demostró que este metal (en forma dependiente de la dosis y el tiempo) afecta la viabilidad de las células adenohipofisarias de las ratas de la cepa Wistar en cultivos primarios e inhibe la liberación de prolactina pero no de LH. En estas condiciones, el Cd induce apoptosis especialmente de los lactotropos (Poliandri y col., 2003). La inhibición de la liberación de prolactina causada por el metal se debe, en buena parte, a la muerte de estas células, prueba de ello es que sustancias capaces de prevenir la muerte celular reducen simultáneamente el efecto inhibitorio sobre la liberación de la hormona (Poliandri y col., 2003; Poliandri y col., 2004; Poliandri y col., 2006).

El estudio de los mecanismos de acción a través de los cuales el Cd interfiere con el metabolismo celular y afecta la secreción hormonal y la viabilidad celular adenohipofisaria nos permitió demostrar que este metal posee un efecto nocivo sobre las mitocondrias. El Cd altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la cadena mitocondrial de transporte de electrones, lo cual lleva a un aumento en la producción de **especies reactivas del oxígeno** (ERO). Este aumento en

la producción de ERO es el responsable del efecto deletéreo del metal sobre las mitocondrias y, como consecuencia, sobre las células (Poliandri y col., 2006a). Prueba de ello es que el tratamiento con distintos antioxidantes reduce el efecto del Cd no sólo sobre las mitocondrias sino que también previene la apoptosis y la inhibición de la liberación de prolactina (Poliandri y col., 2003; Poliandri y col., 2006a).

Otro radical libre que también interviene en los efectos del Cd es el **óxido nítrico (NO)**, elemento de gran importancia para la homeostasis celular y que regula la cadena mitocondrial de transporte de electrones (Poderoso y col., 1996). El Cd estimula la producción de NO en las células adenohipofisarias. Este incremento tiene un efecto citoprotector. El NO reduce la producción de ERO aumentada por el Cd (Poliandri y col., 2004) previniendo el estrés oxidativo, el daño a las mitocondrias y la activación de las caspasas, enzimas que intervienen específicamente en el proceso de apoptosis (Poliandri y col., 2003; Poliandri y col., 2004).

El Cd también estimula la síntesis de **metalotioneínas (MT)** en la adenohipofisis (Miler y col., 2010). Estas proteínas pequeñas ricas en cisteínas funcionan como el principal secuestrador celular de los metales y su síntesis se induce por la presencia de los mismos (Coyle y col., 2002). Se ha sugerido que las MT cumplen un papel importante en la homeostasis de los metales esenciales (Zn, Cu, etc.) y que además desempeñan funciones de protección contra las ERO (Kumari y col., 1998). El NO, ejerce un efecto dual: aunque tiene la capacidad de liberar Cd y Zn unidos a las MT (Khatai y col., 2004), favoreciendo así el efecto tóxico de los metales, también actúa como protector al estimular la síntesis de

las MT. La citotoxicidad del Cd no pudo ser evitada de manera completa en presencia de los inhibidores de caspasas (Poliandri y col., 2003) ni de ciclosporina A (CsA), una molécula que previene la disrupción de la integridad mitocondrial (Poliandri y col., 2006a), lo cual sugiere la existencia de alguna vía alternativa independiente de la vía mitocondrial. Observamos que el Cd afecta los niveles citosólicos de calcio y la actividad de calpaínas indicando la existencia de otra vía, posiblemente la microsomal, por la cual el Cd manifiesta sus efectos deletéreos sobre estas células (Poliandri, 2006c).

Que el estrés oxidativo es el mecanismo principal por el cual el Cd induce su toxicidad fue comprobado mediante el tratamiento simultáneo con antioxidantes. Tres antioxidantes fueron usados, un análogo hidrosoluble de la vitamina E, que protege las membranas de la peroxidación lipídica, la N-acetil cisteína, un precursor del glutatión que interviene en la regulación de las ERO, o la melatonina, hormona secretada por la glándula pineal que tiene propiedades antioxidantes y es secuestradora de ERO (Jou y col., 2004). Los antioxidantes protegen a las células adenohipofisarias del efecto citotóxico del Cd y regulan la secreción de prolactina (Poliandri y col., 2003).

De esta manera, podemos concluir que el efecto citotóxico del Cd a nivel de las células adenohipofisarias parece seguir al menos dos vías paralelas: una mitocondrial y otra relacionada con los cambios en los niveles citosólicos de calcio sugiriendo que también esté involucrado el retículo endoplasmático (estrés microsomal). El efecto inhibitorio del Cd sobre la secreción de prolactina parece estar relacionado con la citotoxicidad preferencial de este metal por los lactotropos dado que no se

observó cambios en la hormona luteinizante (LH), otra de las hormonas adenohipofisarias predominantes en la glándula.

Estudios *in vivo*.

Con el fin de corroborar si el tratamiento *in vivo* con Cd reproducía los efectos observados en el modelo de células adenohipofisarias en cultivo, ratas de la cepa Wistar fueron expuestas a 5 ppm de Cd en el agua de bebida de forma crónica durante un mes (Poliandri y col., 2006b). Esta concentración corresponde a la menor dosis que produjo cambios en los niveles hormonales de prolactina. En estas condiciones observamos que, al igual que en las células en cultivo, el Cd reduce la liberación de prolactina pero no la de LH. Además el Cd disminuye los niveles séricos de TSH.

El tratamiento con Cd causó estrés oxidativo en la adenohipófisis, aumentando los niveles de peroxidación lipídica y la expresión de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Poliandri y col., 2006b) y de MT (Miler y col., 2010), ambos marcadores de estrés oxidativo. Además el Cd provocó un incremento de la expresión de las enzimas oxido nítrico sintasas (NOSs) 1 y 2 (Poliandri y col., 2006b). Estos resultados *in vivo* serían los correlatos del aumento en la producción de ERO y NO observados *in vitro*.

En el hipotálamo, la exposición al Cd también causó estrés oxidativo, medido como un incremento en la expresión de HO-1 y MT-3 pero no modificó la peroxidación lipídica (Poliandri y col., 2006b; Miler y col., 2010). El hecho de que estos parámetros no hayan sido afectados en el hígado (tejido usado como control) indicó la existencia de una sensibilidad diferencial del eje hipotálamo-hipofisario a este metal (Poliandri y

col., 2006b).

Estos resultados, tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que el Cd induce estrés oxidativo y que el incremento en la producción de ERO sería el factor determinante del daño celular que lleva a la apoptosis. Estudios posteriores han corroborado estos resultados (Cuyper y col., 2010; Kim y col., 2013).

En el estudio *in vitro* con las células adenohipofisarias en cultivo mostramos que el tratamiento con antioxidantes previene los efectos del Cd sobre la viabilidad celular y la secreción de prolactina. De igual manera, el tratamiento con melatonina *in vivo* reduce el estrés oxidativo inducido por Cd en el hipotálamo y la adenohipófisis (Poliandri y col., 2006b), lo cual nos permite concluir que el tratamiento con antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro* reduce el estrés oxidativo. Es interesante notar también que es posible revertir el estrés oxidativo inducido por la exposición prolongada al Cd un tiempo después de que ésta fuera suspendida (Miler y col., 2010).

Los efectos citotóxicos del cadmio sobre la adenohipófisis, tanto *in vivo* como *in vitro*, se resumen en la **figura 2**.

■ DISRUPTOR ENDOCRINO

Desde mediados del siglo pasado, distintos informes indicaban que las poblaciones animales manifestaban alteraciones en la capacidad reproductiva, aumento de la mortalidad en los adultos y en su progenie, deformaciones en los órganos reproductivos, comportamientos sexuales anormales y alteraciones del sistema inmunológico. Algunos de estos problemas también fueron observados en los seres humanos. La Dra. Theo Colborn (zoóloga) encaja las piezas de este rompecabezas y encuentra

el punto común de las múltiples manifestaciones observadas en las diferentes especies y en distintas partes del mundo: "todas las especies de animales estudiadas sufrían alteraciones en el funcionamiento de su sistema endocrino ocasionadas por la exposición a sustancias químicas de constitución muy heterogénea a los cuales denominamos **disruptores endocrinos**" (Colborn y col., 1993).

Los disruptores endocrinos (DE) son agentes químicos naturales o sintéticos que interfieren con la biosíntesis, el metabolismo o la acción de las hormonas endógenas, alterando la homeostasis y por lo tanto, provocando variaciones en la reproducción y en el desarrollo del organismo y/o de su progenie (Diamanti-Kandarakis y col., 2009). El grupo de moléculas clasificadas como DE es altamente heterogéneo e incluye químicos sintéticos utilizados como solventes/lubricantes y plastificantes industriales y sus productos derivados (bifenilos policlorados, bifenilos policromados, dioxinas), plásticos (bisfenol A), plastificantes (ftalatos), pesticidas (diclorodifeniltricloroetano, DDT), fungicidas (vinclozolina) y agentes farmacéuticos (dietilstilbestrol). Pertenecen a este grupo sustancias naturales como los fitoestrógenos (genisteína y cumestrol), tan abundantes en alimentos como la soja.

La mayoría de los estudios realizados sobre los DE revelan que estas sustancias ejercen sus efectos actuando como agonistas o antagonistas de receptores hormonales específicos (Waring y Harris, 2005). Los DE son, por lo tanto, capaces de imitar la actividad de las hormonas y producir efectos equivalentes, pueden bloquear la actividad normal de las hormonas al competir por los receptores específicos o modificar la concentración fisiológica de las mismas al afectar los mecanismos de

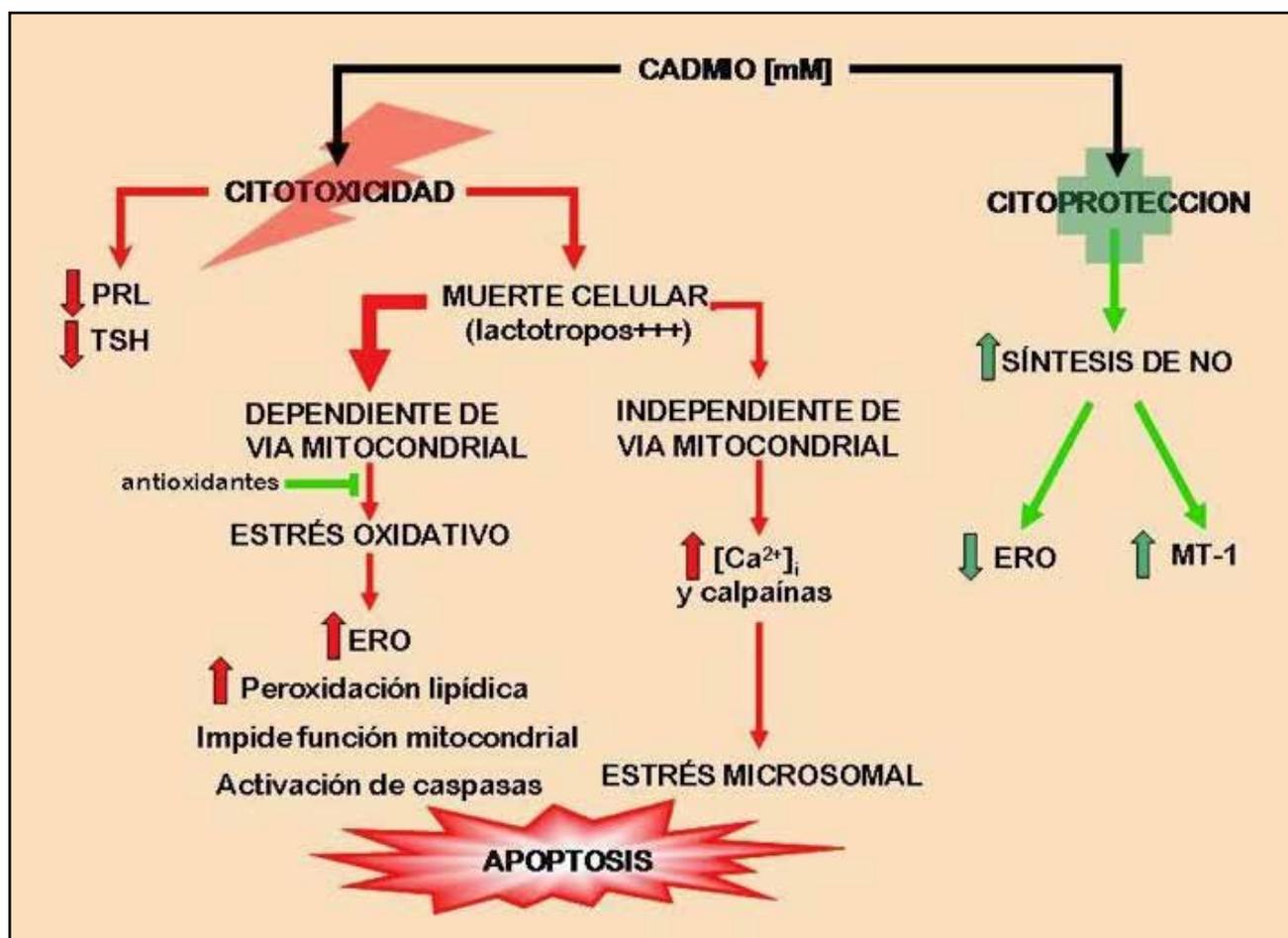


Figura 2. Efectos citotóxicos del cadmio sobre la hipófisis. El cadmio (Cd) se acumula significativamente en la adenohipófisis y, en concentraciones micromolares, ejerce efectos tóxicos inhibiendo la liberación de prolactina (PRL) y tirotrófina (TSH). Los lactotropos son blanco preferencial de este metal. La citotoxicidad del Cd se debe mayormente a la generación de estrés oxidativo que dispara la apoptosis por la vía mitocondrial. El Cd también causa desbalances en la concentración de calcio intracelular e incrementa la actividad de calpaínas lo cual conduce a la apoptosis por la vía de estrés microsomal. Ambas vías pueden ser prevenidas por el tratamiento con antioxidantes. Por otra parte, el Cd induce la síntesis de óxido nítrico (NO), el cual ejerce efectos citoprotectores en las células disminuyendo la concentración de especies reactivas del oxígeno (ERO) y aumentando la síntesis de metalotioneína-1 (MT-1)..

retrocontrol alterando así su bio-disponibilidad (Waring y Harris, 2005).

Los “**xenoestrógenos**” son un grupo particular de DE, capaces de reproducir las acciones de los estrógenos y/o interferir con su señalización normal. Algunos metales, tales como Cd, Hg, Pb, U (uranio), Ni y As, también pueden actuar como DE mimetizando las acciones de los estrógenos y se denominan “**metaloes-trógenos**” (García-Morales y col., 1994; Stoica y col., 2000; Martin y

col., 2003; Diamanti-Kandarakis y col., 2009; Iavicoli y col., 2009).

■ **ESTRÓGENOS**

Los estrógenos (E2) son una familia de hormonas esteroideas sintetizadas principalmente por los ovarios durante la edad reproductiva y en menores cantidades por las glándulas adrenales y otros tejidos. Su función más importante es promover el crecimiento y la diferenciación de los órganos sexuales y de otros te-

jidos relacionados con la reproducción. También tienen un papel muy importante en el funcionamiento del cerebro, en la remodelación del hueso y en la acumulación de tejido adiposo. El 17β -estradiol (E2) es el estrógeno natural más potente y ejerce sus efectos mediante la activación de múltiples vías de señalización tanto genómicas como no genómicas (Heldring y col., 2007; Shanle y Xu, 2010; Shanle y Xu, 2011). Sus acciones están mediadas por dos receptores específicos (RE α

por REβ), que pueden actuar como factores de transcripción nuclear (Drummond y col., 1999; Rousseau y col., 2002; Adamson y col., 2008). Esta hormona, actúa a nivel hipotálamo-adenohipofisario regulando la secreción de varias hormonas hipofisarias (**Figura 1**). De las hormonas adenohipofisarias, la prolactina es la única que se libera espontáneamente por lo cual requiere de factores hipotalámicos inhibidores que controlen dicha secreción. La dopamina hipotalámica es el principal factor inhibidor de la secreción de esta hormona. Sin embargo, su secreción también puede ser estimulada y el E2 no solo es el principal regulador de su secreción (Rhode y Gorski, 1991) sino que además funciona como un factor trófico que induce la proliferación de los lactotopos (Lam y col., 1990; Hashi y col., 1996) y la trans-diferenciación de somatolactotopos a lactotopos (Boockfor y col., 1986; Kineman y col., 1992).

La prolactina es una hormona vital implicada en una variedad de funciones fisiológicas tales como el desarrollo fetal, la reproducción y la respuesta inmune, de manera tal que cualquier alteración en su producción y liberación afecta diferentes funciones del organismo (Bolefeysot y col., 1998).

■ EFECTOS XENOESTROGÉNICOS DEL Cd O CADMIO

Como comentamos más arriba, diversos estudios epidemiológicos indican un aumento en la incidencia de enfermedades a nivel del sistema reproductor, tanto en humanos como en otros animales, así como también un incremento en la incidencia de cánceres hormona-dependientes. Diversas investigaciones sugieren que estas y otras patologías relacionadas son consecuencia de la exposición a contaminantes ambientales. Entre ellos, los conocidos

como xenoestrógenos parecen jugar un papel significativo en el desencadenamiento y desarrollo de dichas enfermedades (Jones y King, 1995).

Las hormonas de la adenohipofisis regulan a las diferentes glándulas periféricas. Los estrógenos, actuando a nivel del eje hipotálamo-hipofisario, regulan la secreción de varias de las hormonas adenohipofisarias en especial la de prolactina. La integridad de la unidad de este eje es un factor fundamental para el desarrollo y funcionamiento normal del sistema reproductivo y del individuo como un todo. Sin embargo, aún teniendo un papel cardinal sobre el sistema reproductor, poco se conocía sobre un posible efecto xenoestrógeno del Cd a este nivel.

Nuestro estudio nos permitió demostrar que el Cd, en concentraciones nanomolares, promueve la proliferación celular adenohipofisaria (Ronchetti y col., 2013). Mediante técnicas inmunocitoquímicas determinamos que este efecto se manifiesta principalmente en los lactotopos. Los somatotopos y los gonadotropos, células de la adenohipofisis que sintetizan la hormona de crecimiento y las hormonas LH y FSH, respectivamente, en cambio, no modificaron su tasa de proliferación por efecto del metal. Confirmando el efecto del Cd sobre la proliferación celular, este metal estimula la expresión de proteínas que controlan el ciclo celular tales como las ciclinas D1 y D3, que modulan la progresión de la transición G1/S (Altucci y col., 1996; Dinda y col., 1997), y c-fos, cuya expresión es rápidamente inducida ante estímulos mitogénicos (Angel y Karin, 1991; Saulian y Karin, 2002). Un incremento en la expresión de estas proteínas es indicador de un estímulo de la proliferación celular.

La exposición al Cd también es-

timuló la proliferación de la línea celular GH3, derivada de un tumor sensible a E2 (Ronchetti y col., 2013). Es decir que el Cd es capaz de incrementar la proliferación celular no sólo de las células adenohipofisarias normales sino también de las tumorales, a pesar de su alta tasa de proliferación intrínseca. En este sentido, existen evidencias de que el Cd es capaz de inducir un efecto similar en diferentes líneas celulares tumorales de mama humanas (Siewit y col., 2010; Byrne y col., 2009), así como también de próstata humana LNCaP (Martin y col., 2002).

El Cd estimula la secreción de prolactina. Este metal aumenta la síntesis (expresión del ARN mensajero) y la liberación de prolactina en las células adenohipofisarias en cultivo (Ronchetti y col., 2013). Existen muy pocos trabajos que hayan estudiado los efectos xenoestrógenos de los contaminantes ambientales sobre la secreción de esta hormona. Wade y col. reportaron que el endosulfano (pesticida órgano clorado) no posee efectos sobre la liberación de prolactina *in vivo* (Wade y col., 1997), mientras que Rousseau y col. postularon que dicho xenoestrógeno, al igual que el clordano (otro pesticida órgano clorado), aumentan la expresión de su ARN mensajero en la línea celular GH3 (Rousseau y col., 2002). El BPA (compuesto utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato, resinas y selladores dentales) presenta una potente actividad xenoestrógena y, en forma similar al Cd²⁺, modula la liberación de prolactina tanto *in vitro* como *in vivo*, además de inducir la proliferación celular de los lactotopos (Steinmetz y col., 1997).

Los efectos de este metal -sobre la proliferación celular y sobre la secreción de prolactina- se producen por activación del receptor de estrógenos alfa (REα) (Ronchetti y col.,

2013). Este hecho fue confirmado dado que los efectos del Cd no se observan en presencia de un antiestrógeno puro que se une al receptor de estrógenos (ICI 182,780) (Wakeling y col., 1991). Resultados similares fueron obtenidos en la línea celular MCF-7, derivada de un tumor de mama (Brama y col., 2007; Siewit y col., 2010). Respecto a la prolactina, Elango y col. demostraron que el aumento en la expresión de esta hormona inducido por otro xenoestrógeno como el DDT es impedido por la administración conjunta con el antiestrógeno ICI 182,780 en cultivos primarios de adenohipofisis de trucha arco iris (Elango y col., 2006).

Otro de los efectos inducidos por el Cd en las células adenohipofisarias fue su capacidad de modificar la expresión del RE α (Ronchetti y col., 2013). El E2 regula la expresión de su propio receptor en diferentes tejidos. Nuestros resultados muestran que el Cd es capaz de modular la expresión del ARN mensajero del RE α en las células adenohipofisarias. Los niveles de dicho ARN mensajero muestran un aumento marcado durante los primeros tiempos de exposición al metal (8 y 24 hs) (Ronchetti y col., 2013). Martin y col. también observaron un efecto del Cd sobre la expresión del RE α . Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, estos autores trabajando con las células MCF-7, derivada de un tumor de mama, encuentran una disminución en la expresión del ARN mensajero del RE α al cabo de 24 hs de exposición al metal (García Morales y col., 1994; Martin y col., 2003). Aunque los resultados no son totalmente comparables dado que la concentración de Cd utilizada por dicho grupo fue dos órdenes de magnitud mayor a la empleada por nosotros, apoyan el hecho de que el Cd²⁺ sea capaz de afectar la expresión del RE α .

El RE α se expresa en diferentes

isoformas, la isoforma con un peso molecular de 66 kDa y sus variantes truncadas de 46 kDa y 36 kDa. La adenohipofisis expresa tanto la isoforma de 66 kDa del RE α (RE α 66), como las dos variantes truncadas (RE α 46 y RE α 36). El Cd modifica los niveles proteicos de la isoforma del RE α 66 y de su variante truncada RE α 46, siendo estos cambios paralelos a aquellos observados en la expresión del mensajero. La expresión de la variante RE α 36 fue comparativamente baja y difícil de detectar en las mismas condiciones de ensayo.

Existen evidencias bibliográficas que muestran que el tratamiento con E2 afecta la expresión del RE α 66 y de sus variantes truncadas. Se ha demostrado que el tratamiento con estrógenos aumenta la expresión de

los ARN mensajeros de ambas variantes truncadas en las hipófisis de ratas de la cepa Fischer 344, mientras que en las ratas de la cepa Sprague-Dawley se afecta una sola de las variantes (Mitchner y col., 1998). Otros autores han observado que el tratamiento con estrógenos induce la expresión de la isoforma RE α 66 y la variante RE α 46 en cultivos de macrófagos humanos (Murphy y col., 2009). Se ha propuesto que el RE α 46 es capaz formar un dímero con el RE α 66, el cual sería menos activo y por lo tanto funcionaría como un dominante negativo regulando así la actividad del receptor (Mitchner y col., 1998).

Estos resultados confirman que el Cd es un disruptor endocrino con una potente actividad xenoestrogé-

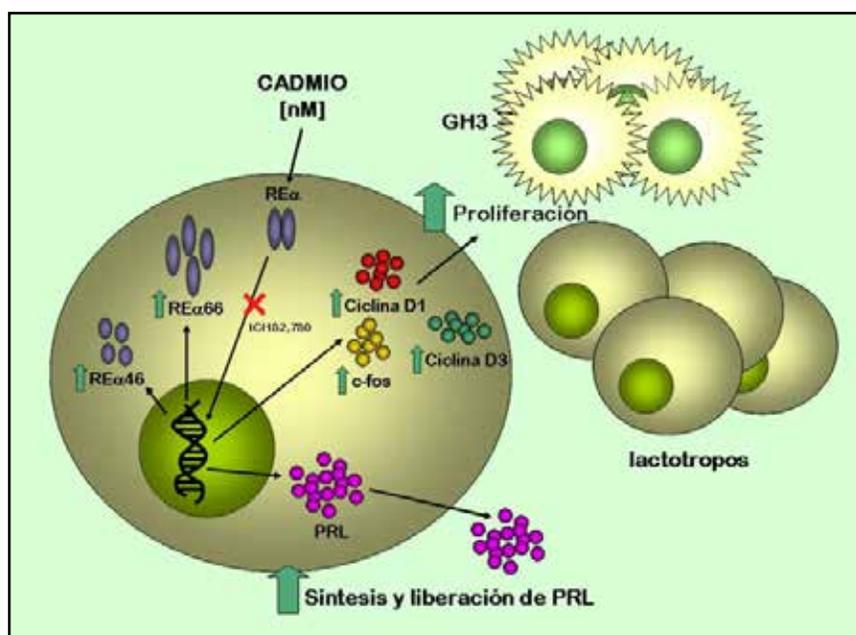


Figura 3. Efectos xenoestrogénicos del cadmio sobre la adenohipofisis.

El Cd a concentraciones nanomolares es capaz de unirse al receptor de estrógenos α (RE α) y estimular la expresión de diferentes genes blanco activados por el E2 (vía genómica), hecho impedido en presencia de un antagonista del RE (ICI 182,780). El Cd aumenta la expresión del propio RE α tanto en su versión completa (RE α 66) como en su versión truncada (RE α 46). El metal estimula preferencialmente la proliferación de los lactotopos incrementando la expresión de proteínas clave en la progresión del ciclo celular, como c-fos y las ciclinas D1 y D3. Al igual que el E2, el Cd también estimula la síntesis y liberación de la prolactina (PRL). Un efecto similar se observa en línea tumoral de lactosomatropos GH3.

nica en las células adenohipofisarias (Figura 3).

■ RESUMEN FINAL

El Cd tiene un efecto directo sobre las células adenohipofisarias en cultivo y dependiendo de su concentración presenta un efecto citotóxico o un efecto xenoestrogénico.

El Cd, en concentraciones micromolares, afecta la viabilidad celular y la secreción de prolactina. Este metal induce apoptosis en especial de los lactotropos por, al menos, dos vías independientes: la vía mitocondrial con un aumento en la producción de ERO y la vía citosólica a través de un incremento en los niveles citosólicos de calcio. Por otro lado, demostramos que el Cd estimula la síntesis de NO y este radical libre cumple un papel citoprotector. El Cd específicamente causa una inhibición de la liberación de prolactina pero no de LH.

La exposición al Cd *in vivo* produce estrés oxidativo en el eje hipotálamo-hipofisario (peroxidación lipídica, expresión de hemooxigenasa-1, de metalotioneínas y NO sintasas, confirmando los efectos observados en el modelo de células adenohipofisarias en cultivo.

Mediante el uso de antioxidantes es posible prevenir muchos de los efectos del Cd sobre las células en cultivo. *In vivo*, utilizando melatonina, también se redujo el estrés oxidativo generado por el Cd pero no su acción sobre las hormonas. Futuros tratamientos con otros antioxidantes o con melatonina -en dosis que no afecten por sí mismas la liberación hormonal- es posible que se puedan mejorar también estos parámetros.

El Cd como xenoestrógeno, actuando a través del RE α es capaz de inducir proliferación celular en

cultivos celulares de adenohipofisis en especial de los lactotropos. Este efecto se ve corroborado por un aumento en la expresión de las ciclinas D1 y D3, así como también de c-fos, indicadores de la estimulación del proceso de proliferación.

Este metal estimula la síntesis y liberación de prolactina y modula la expresión del RE α y de sus variantes truncadas imitando los efectos del E2 sobre su receptor en las células adenohipofisarias.

■ CONCLUSIÓN

Los humanos así como el resto de los animales están expuestos a numerosos contaminantes químicos que les llegan a través del aire, el agua y los alimentos. Muchos de ellos son nocivos para la salud y afectan la mayoría de los sistemas del organismo, desde el sistema nervioso al inmunológico y el endocrino. Diferentes mecanismos dan cuenta de sus efectos tóxicos. Estos contaminantes por sí mismos son capaces de inducir estrés oxidativo y daño celular. Además, por su capacidad de interactuar con diferentes receptores hormonales, actúan como disruptores endocrinos afectando la homeostasis hormonal y de los tejidos regulados por dichas hormonas

Dentro de los muchos contaminantes ambientales, los metales han incrementado notablemente su presencia en el ambiente debido al uso antropogénico de los mismos. Evidencias bien sustentadas han demostrado que el sistema reproductivo es muy sensible a estos elementos metálicos, tanto aquellos con actividad de disruptores endocrinos como los de actividad citotóxica. Estos últimos, generalmente, inducen estrés oxidativo que lleva a la muerte celular y/o a modificaciones en la estructura del ADN o alteraciones

epigenéticas que causan cambios en la expresión genética favoreciendo la inducción de cáncer.

Los disruptores endocrinos, por su capacidad de activar algunos tipos de receptores y sus vías celulares de señales, pueden actuar a muy bajas concentraciones y alterar la homeostasis hormonal. Teniendo en cuenta el papel crítico que juegan las hormonas en el organismo, los disruptores endocrinos, al igual que ellas, pueden controlar todos los mecanismos fisiológicos de un individuo. Además, y debido a esta misma propiedad, pueden afectar tejidos sensibles durante el proceso de desarrollo. Es posible que los disruptores endocrinos estén asociados al aumento significativo en una variedad de enfermedades endocrinas que incluyen infertilidad y pubertad prematura, obesidad y diabetes, cánceres endocrinos tales como los de mama, ovario, útero y próstata. Como hemos indicado existen evidencias en animales de experimentación y en células *in vitro* de la participación de los disruptores endocrinos en dichos efectos. Estudios en humanos también han demostrado una relación entre los niveles sanguíneos de algunos de los metales y ciertas patologías endocrinas. Sin embargo, por la variedad de contaminantes y sus combinaciones en el ambiente es aun difícil establecer una conclusión definitiva, aunque los resultados presentados sean suficientes para pensar que los contaminantes metálicos son un problema para la salud pública y deben ser tenidos en cuenta.

■ GLOSARIO Y ABREVIATURAS

Antioxidante: compuesto capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Apoptosis: proceso de muerte celular programada debido a la pérdida

de señales de supervivencia o a la presencia de señales de muerte.

Carcinógeno: agente físico, químico o biológico potencialmente capaz de producir cáncer al exponerse a tejidos vivos.

Ciclo celular: conjunto ordenado y secuencial de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas.

Estrés oxidativo: desequilibrio entre la producción aumentada de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermediarios o reparar el daño resultante.

Homeostasis: capacidad de los seres vivos de mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior.

Peroxidación lipídica: daño oxidativo de los lípidos de las membranas biológicas.

Traza: elemento químico necesario en cantidades mínimas para el crecimiento, desarrollo y procesos fisiológicos de un organismo.

E2: estrógenos

ERO: especies reactivas del oxígeno

HO-1: hemooxigenasa-1

MT-1: metalotioneína-1

NO: óxido nítrico

PRL: prolactina

RE: receptor de estrógenos

TSH: hormona estimulante de tiroides

LH: hormona luteotrófica

FSH: hormona folículo estimulante

■ AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), de la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad de Buenos Aires.

Los resultados presentados aquí forman parte de las tesis de doctorado y/o son publicaciones relacionadas de los Dres. Ariel H. Poliandri, Fernanda A. Quinteros, Eliana A. Miler, Silvana I. Nudler y de la Lic. Sonia A. Ronchetti.

■ BIBLIOGRAFÍA

Adamson A.D., Friedrichsen S., Semprini S., Harper C.V., Mullins J.J., White M.R.H, Davis J.R.E. (2008) Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: Convergence with tumor necrosis factor- α signaling. *Endocrinology* 149, 687–694.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2008) Toxicological Profile: Cadmium, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>.

Altucci L., Addeo R., Cicatiello L., Dauvois S., Parker M.G., Truss M., Beato M., Sica V., Bresciani F., Weisz A. (1996) 17 β -Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 12, 2315–2324.

Angel P., Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in

cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1072, 129-157.

Antila E., Mussalo-Rauhamaa H., Kantola M., Atroschi F., Westermarck T. (1996) Association of cadmium with human breast cancer. *Science of the Total Environment* 186, 251–256.

Bardullas U., Limón-Pacheco J.H., Giordano M., Cardizales L., Mendoza-Trejo M.S., Rodríguez V.M. (2008) Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic system and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 239, 169-177.

Benedetti J.L., Samuel O., Dewailly E., Gingras S., Lefebvre M.A. (1999) Levels of cadmium in kidney and liver tissues among a canadian population (Province of Quebec). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 56, 145-163.

Ben-Jonathan N., Steinmetz R. (1998) Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 9, 124-8.

Bernhoft R.A. (2013) Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal* Volume 2013, Article ID 394652, 7 pag.

Beveridge R., Pintos J., Parent M.E., Asselin J., Siemiatycki J. (2010) Lung cancer risk associated with occupational exposure to nickel, chromium VI, and cadmium in two population-based case-control studies in Montreal. *American Journal of Industrial Medicine* 53, 476-485.

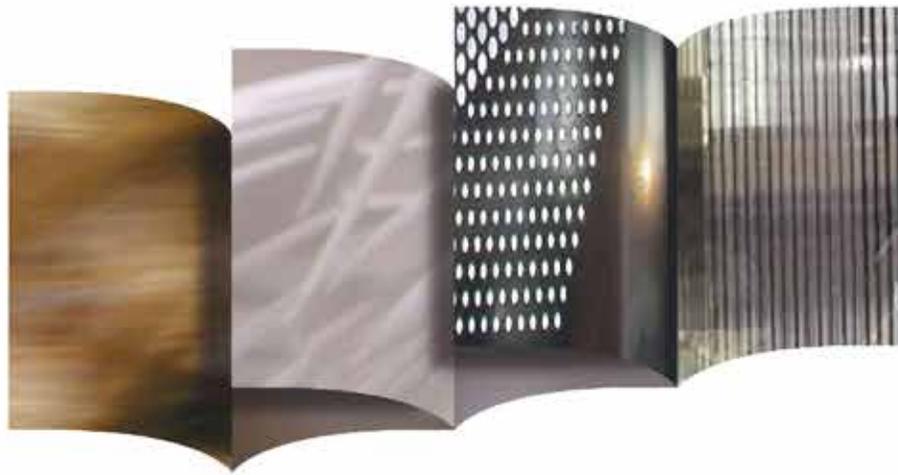
Bole-Feysot C., Goffin V., Edery

- M., Binart N., Kelly P.A. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19, 225-268.
- Boockfor F.R., Hoeffler J.P., Frawley L.S. (1986) Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *American Journal of Physiology* 250, E103-E105.
- Brama M., Gnessi L., Basciani S., Cerulli N., Politi L., Spera G., Mariani S., Cherubini S., d'Abusco A.S., Scandurra R., Migliaccio S. (2007). Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology* 264, 102-108.
- Byrne C., Divekar S.D., Storchan G.B., Parodi D.A., Martin M.B. (2009) Cadmium - a metallo-hormone?. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 266-271.
- Ciarrocca M., Capozzella A., Tomei F., Tomei G., Caciari, T. (2013). Exposure to cadmium in male urban and rural workers and effects on FSH, LH and testosterone. *Chemosphere* 90, 2077-2084.
- Colborn T., vom Saal F.S., Soto A.M.. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101, 378-384.
- Copes R., Clark N.A., Rideout K., Palaty J., Teschke K. (2008) Uptake of cadmium from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in British Columbia oyster growers. *Environmental Research* 107, 160-169.
- Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 627-647.
- Cuyper A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A.R., Munters E., Artois T.J., Nawrot T., Vangronsveld J., Smeets K. (2010) Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals* 23, 927-940.
- Chaney R.L., Ryan J.A., Li Y.M., Brown S.L. (1999). Soil cadmium as a threat to human health. In: McLaughlin, M.J., Singh, B.R. (Eds.), *Developments in Plant and Soil Sciences*, vol. 85. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 219-256.
- De Figueiredo F.J. (1965). Piqui Plant Food. *Revista Brasileira Medicina* 22, 580-582.
- Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.P., Giudice L.C., Hauser R., Prins G.S., Soto A.M., Zoeller R.T., Gore A.C. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30, 293-342.
- Dinda S., Kodali-Gali S., Sevilla L., Burkley M., Hurd C. and Moudgil V. K. (1997) Inhibition of proliferation of T47D human breast cancer cells: Alterations in progesterone receptor and p53 tumor suppressor protein. *Molecular and Cellular Biochemistry* 175, 81-89.
- Drummond A.E., Baillie A.J., Findlay J.K. (1999) Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology* 149, 153-161.
- Elango A., Shepherd B., Chen T.T. (2006). Effects of endocrine disruptors on the expression of growth hormone and prolactin mRNA in the rainbow trout pituitary. *General and Comparative Endocrinology* 145, 116-127.
- García-Morales P., Saceda M., Kenney N., Salomon D.S., Kim N., Salomon D.S., Gottardis M. M., Solomon H.B., Sholler P.F., Jordan V.C., Martin M.B. (1994) Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 16896-16901.
- Genuis, S.J., Schwalfenberg, G., Siy, A.K., Rodushkin, I. (2012). Toxic element contamination of natural health products and pharmaceutical preparations. *PLoS One* 7, e49676.
- Goering P.L., Waalkes M.P., Klaassen C.D. (1995) Toxicology of cadmium, in: *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects, Handbook of Experimental Pharmacology*, Goyer R.A., Cherian M.G. (eds), Springer, New York, 189-213.
- Hashi A., Mazawa S., Chen S., Yamakawa K., Kato J., Arita J. (1996) Estradiol-induced diurnal changes in lactotroph proliferation and their hypothalamic regulation in ovariectomized rats. *Endocrinology* 137, 3246-3252.
- Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Strom A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A. (2007) Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiology Reviews* 87, 905-931.

- Huff J., Lunn R.M., Waalkes M.P., Tomatis L., Infante P.F. (2007) Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 13, 202-212.
- Iavicoli I., Fontana L., Bergamaschi A. (2009) The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. Critical Reviews* 12, 206-223.
- International Agency for Research on Cancer (1993) Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Working group views and expert opinions. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 58, 1-415.
- Jarup L., Berglund M., Elinder C.G., Nordberg G., Vahter M. (1998) Health effects of cadmium exposure-A review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 24, 1-51.
- Jones S.B., King L.B. (1995) Plasma phosphoprotein as an indicator of estrogen-induced vitellogenin production in brook trout. *International Congress of Toxicology VII* 6-P20.
- Jou M.J., Peng T.I., Reiter R.J., Jou S.B., Wu H.Y., Wen S.T. (2004) Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J. Pineal Res* 37, 55-70.
- Khatai L., Goessler W., Lorencova H., Zangger K. (2004) Modulation of nitric oxide-mediated metal release from metallothionein by the redox state of glutathione in vitro. *European Journal of Biochemistry* 271, 2408-2416.
- Kim S., Cheon H.S., Kim S.Y., Juhn Y.S., Kim Y.Y. (2013) Cadmium induces neuronal cell death through reactive oxygen species activated by GADD153. *BMC Cell Biology* 14, 4.
- Kineman R.D., Faught W.J., Frawley L.S. (1992) Steroids can modulate transdifferentiation of prolactin and growth hormone in bovine pituitary cultures. *Endocrinology* 130, 3289-3294.
- Koller L.D. (1998). Cadmium. In: *Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals*. Zelikoff J.T., Thomas, P.T. (eds.), Taylor & Francis, London 41-61.
- Kumari M.V., Hiramatsu M., Ebadi M. (1998) Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radical Research* 29, 93-101.
- Lam K.S.L., Srivastava G., Lechan R.M., Lee T., Reichlin S. (1990) Estrogen regulates the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 52, 417-421.
- Lafuente A. (2013) The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology* 59, 395-404.
- Liu Y., Wang K., Xu P., Wang Z. (2012) Physiological responses and tolerance threshold to cadmium contamination in *Eremochloa ophiuroides*. *International Journal of Phytoremediation* 14, 467-480.
- Luckett B.G., Su L.J., Rood J.C., Fontham E.T. (2012) Cadmium exposure and pancreatic cancer in South Louisiana. *Journal of Environmental and Public Health*. Article ID 180186.
- Martin M.B., Voeller H.J., Gelmann E.P., Lu J., Stoica E.G., Hebert E.J., Reiter R., Singh B., Danielson M., Pentecost E., Stoica A. (2002). Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. *Endocrinology* 143, 263-275.
- Martin M.B., Reiter R., Pham T., Avellanet Y.R., Camara J., Lahm M., Pentecost E., Pratap K., Gilmore B.A., Diverakar S., Dagata R.S., Bull J.L., Stoica A. (2003) Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 144, 2425-2436.
- Miler E.A., Nudler S.I., Quinteros F.A., Cabilla J.P., Ronchetti S.A., Duvilanski B.H. (2010) Cadmium induced-oxidative stress in pituitary gland is reversed by removing the contamination source. *Human and Experimental Toxicology* 29, 873-880.
- Miura N. (2009) Individual susceptibility to cadmium toxicity and metallothionein gene polymorphisms: with references to current status of occupational cadmium exposure. *Industrial Health* 47, 487-494.
- Mitchner N.A., Garlick C., Ben-Jonathan N. (1998) Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors {alpha} and {beta} in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139, 3976-3983.
- Mosavi-Jarrahi A., Mohagheghi M., Kalaghchi B., Mousavi-Jarrahi Y., Noori M.K. (2009) Estimating the incidence of lung cancer attribu-

- table to occupational exposure in Iran. *Population Health Metrics* 7, 7.
- Murphy A.J., Guyre P.M., Wira C.R., Pioli P.A. (2009) Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERα46 in human macrophages. *PLoS One* 4, e5539.
- Nagata C., Nagao Y., Nakamura K., Wada K., Tamai Y., Tsuji M., Yamamoto S., Kashiki Y. (2013) Cadmium exposure and the risk of breast cancer in Japanese women. *Breast Cancer Research and Treatment* 138, 235–239.
- Nudler S.I., Quinteros F.A., Miler E.A., Cabilla J.P., Ronchetti S.A., Duvilanski B.H. (2009) Chromium VI administration induces oxidative stress in hypothalamus and anterior pituitary gland from male rats. *Toxicology Letters* 185, 187-192.
- Ogawa T., Kobayashi E., Okubo Y., Suwazono Y., Kido T., Nogawa K. (2004) Relationship among prevalence of patients with Itai-itai disease, prevalence of abnormal urinary findings, and cadmium concentrations in rice of individual hamlets in the Jinzu River basin, Toyama prefecture of Japan. *International Journal of Environmental Health Research*. 14, 243-252.
- Page R. (1994) The anatomy of hypothalamus-hypophysial complex. Ed. Knobil E. and Neill J. The physiology of reproduction 2nd edition. Raven Press, New York.
- Perilli P., Mitchell L.G., Grant C.A., Pisantea M. (2010) Cadmium concentration in durum wheat grain (*Triticum turgidum*) as influenced by nitrogen rate, seeding date and soil type. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 813-822.
- Poderoso J.J., Carreras M.C., Lisdero C., Riobó N., Schöpfer F., Boveris A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and sub-mitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 328, 85-92.
- Poliandri A., Cabilla J.P., Velardez M., Bodo C., Duvilanski B.H. (2003) Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 190, 17-24.
- Poliandri A.H., Velardez M.O., Cabilla J.P., Bodo C.C., Machiavelli L.I., Quinteros A.F., Duvilanski B.H. (2004) Nitric oxide protects anterior pituitary cells from cadmium-induced apoptosis. *Free Radicals Biology and Medicine* 37, 1463-1471.
- Poliandri A.B., Machiavelli L.I., Quinteros A.F., Cabilla J.P., Duvilanski B.H. (2006a) Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress. *Free Radicals Biology and Medicine* 40, 679-688.
- Poliandri A., Esquifino A., Cano P., Jiménez A., Lafuente A., Cardinali P., Duvilanski B.H. (2006b). In vivo protective effect of melatonin on cadmium-induced changes in redox balance and gene expression in rat hypothalamus and anterior pituitary. *Journal of Pineal Research* 41, 238–246.
- Poliandri A. (2006c) Efectos del cadmio sobre la viabilidad celular y la liberación hormonal adenohipofisaria, mecanismos de acción. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Quinteros A.F., Poliandri A.B., Machiavelli L.I., Cabilla J.P., Duvilanski B.H. (2007) In vivo and in vitro effects of chromium VI on anterior pituitary hormone release and cell viability. *Toxicology and Applied Pharmacology* 218, 79-87.
- Rana S. V. (2008) Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22, 262–284.
- Rhode P.R., Gorski J. (1991) Inhibitory effects of serum and stimulatory effects of estrogen on prolactin mRNA levels in GH3 rat pituitary tumor cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 82, 1-9.
- Ronchetti S.A., Nudler S.I., Cabilla J.P., Gonsebatt M.E., Duvilanski B.H. (2012) Apoptosis induced by arsenic is partially reverted by antioxidants in anterior pituitary cells. *International Congress of Endocrinology (ICE)*. Florencia, Italia. P# 768
- Ronchetti S.A., Miler E.A., Duvilanski B.H., Cabilla J.P. (2013) Cadmium mimics estrogen-driven cell proliferation and prolactin secretion from anterior pituitary cells. *PLoS One* 8, e81101.
- Rousseau J., Cossette L., Grenier S., Martinoli M.G. (2002) Modulation of prolactin expression by xenoestrogens. *General and Comparative Endocrinology* 126, 175-182.
- Satarug S., Baker J.R., Urbenjapol S., Haswell-Elkins M., Reilly P.E.B., Willians D.J. (2003) A global

- perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters* 137, 65–83.
- Scherer G., Barkemeyer H. (1983). Cadmium concentrations in tobacco and tobacco smoke. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 7, 71–78.
- Sears M.E., Kerr K.J., Bray R.I. (2012) Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury in Sweat: A Systematic Review 2012 184745, 10.
- Shanle E.K., Xu W. (2010) Selectively targeting estrogen receptor for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 1265–1276.
- Shanle E.K., Xu W. (2011) Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chemical Research in Toxicology* 24, 6–19.
- Shaulian E., Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology* 4, 131–136.
- Shukla D., Kesari R., Mishra S., Dwivedi S., Tripathi R.D., Nath P., Trivedi P.K. (2012) Expression of phytochelatin synthase from aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. enhances cadmium and arsenic accumulation in tobacco. *Plant Cell Reports* 31, 1687–1699.
- Siewit C.L., Gengler B., Vegas E., Puckett R., Louie M.C. (2010) Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER alpha and c-Jun. *Molecular Endocrinology* 24, 981–992.
- Steinmetz R., Brown N.G., Allen D.L., Bigsby R.M., Ben-Jonathan N. (1997) The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology* 138, 1780–1786.
- Stoica A., Katzenellenbogen B.S., Martin M.B. (2000) Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Molecular Endocrinology* 14, 545–553.
- Thornton I. (1992). Sources and pathways of cadmium in the environment. IARC Scientific Publication 118, 149–162.
- Waalkes M.P. (2003) Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research* 533, 107–120.
- Wade M.G., Desaulniers D., Leinhardt K., Foster W.G. (1997) Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes in vitro and in vivo. *Reproductive Toxicology* 11, 791–798.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis: a review. *Toxicology* 192, 95–117.
- Wakeling A.E., Dukes M., Bowler J. (1991) A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Research* 51, 3867–3873.
- Waring R.H., Harris R.M. (2005) Endocrine disruptors: A human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology* 244, 2–9.



Desarrollo y gestión de proyectos científicos y tecnológicos innovadores

FUNINTEC es una organización sin fines de lucro creada por la Universidad de San Martín cuyo objetivo es promover y alentar la investigación, el desarrollo tecnológico y la transferencia de conocimientos a los sectores público y privado, sus empresas y en particular a las PyMES.

Dentro de los alcances previstos por la Ley de Innovación Tecnológica, funciona como vínculo entre el sistema científico tecnológico y el sector productivo.

CONTACTO:
www.funintec.org.ar

Fundación
Innovación
y Tecnología

FUNINTEC

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN



Recuperación de tecnologías ancestrales y sustentables en Jujuy

La vicuña como modelo de producción sustentable

Ciencia e historia se unen para preservar a la vicuña

*Cazando vicuñas anduve en los cerros
Heridas de bala se escaparon dos.*

*- No caces vicuñas con armas de fuego;
Coquena se enoja, - me dijo un pastor.*

*- ¿Por qué no pillarlas a la usanza vieja,
cercando la hoyada con hilo punzó ?*

*- ¿Para qué matarlas, si sólo codicias
para tus vestidos el fino vellón ?*

Juan Carlos Dávalos, Coquena

Lo primero es pedir permiso a la Pachamama. Porque a ella, en la cosmovisión andina, pertenecen las vicuñas que se extienden por el altiplano de Perú, Bolivia, Chile y Argentina. Una ceremonia ancestral, unida a la ciencia moderna, permite que comunidades y científicos argentinos exploten de manera sustentable un recurso de alto valor económico y social.

La vicuña es una especie silvestre de camélido sudamericano que habita en la puna. Hasta 1950-1960 estuvo en serio riesgo de extinción debido a la ausencia de planes de manejo y conservación. Desde la llegada de los españoles se comenzó con la caza y exportación de los cueros para la obtención de la fibra, que puede llegar a valer U\$600 por kilo, lo que llevo a la casi desaparición de estos animales. Por ese entonces, la población de vicuñas en América era cercana a los 4 millones de ejemplares, en 1950 no eran más de 10.000.

A fines de la década del 70 Argentina, Bolivia, Chile, Perú y Ecuador firmaron un Convenio para la conservación y manejo de la vicuña que permitió recuperar su población hasta contar en la actualidad con más de 76 mil ejemplares en nuestro país.

En Santa Catalina, Jujuy, a 3.800 metros sobre el nivel del mar, investigadores de CONICET, junto a comunidades y productores locales, han logrado recuperar una tecnología prehispánica sustentable para la obtención de la fibra de vicuña. Se trata de una ceremonia ancestral y captura mediante la cual se arrean y esquilan las vicuñas silvestres para obtener su fibra. Se denomina chaku y se realizaba en la región antes de la llegada de los conquistadores españoles. Según Bibiana Vilá, investigadora independiente de CONICET y directora del grupo Vicuñas, Camélidos y Ambiente (VICAM) *"Hoy podemos pensar en volver a hacer ese chaku prehispánico sumado a técnicas que los científicos aportamos para que las vicuñas pasen por toda esa situación sufriendo el menor stress posible. Las vicuñas vuelven a la naturaleza, la fibra queda en la comunidad, y nosotros tomamos un montón de datos científicos."*

El chaku

El chaku es una práctica ritual y productiva para la esquila de las vicuñas. Durante el imperio inca, las cacerías reales o chaku eran planificadas por el inca en persona. En esta ceremonia se esquilaba a las vicuñas y se las liberaba nuevamente a la vida silvestre. La fibra obtenida era utilizada para la confección de prendas de la elite y su obtención estaba regulada por mecanismos políticos, sociales, religiosos y culturales. Se trata de un claro ejemplo de uso sustentable de un recurso natural. Hugo Jacobaccio, zoológico e investigador principal de CONICET, explica que *"actualmente el chaku concentra hasta 80 personas, pero durante el imperio inca participaban de a miles. Hoy las comunidades venden esa fibra a acopiadores textiles y obtienen un ingreso que complementa su actividad económica principal, el pastoreo de llamas y ovejas"*.

El proceso comienza con la reunión de todos los participantes, luego toman una soga con cintas de colores reunidos en semicírculo y arrean lentamente a las vicuñas guiándolas hacia un embudo de red de 1 km de largo que desemboca en un corral. Cuando los animales están calmados se los esquila manipulándolos con sumo cuidado para reducir el stress y se los libera. Hoy, 1500 años después del primer registro que se tiene de esta ceremonia, la ciencia argentina suma como valor agregado: el bienestar animal y la investigación científica. En tiempo del imperio Inca, el chaku se realizaba cada cuatro años, actualmente se realiza anualmente sin esquila a los mismos animales *"se van rotando las zonas de captura para que los animales renueven la fibra"* explica Jacobaccio. Según Vilá *"es un proyecto que requiere mucho trabajo pero que demuestra que la sustentabilidad es posible, tenemos un animal vivo al cual esquilamos y al cual devolvemos vivo a la naturaleza. Tiene una cuestión asociada que es la sustentabilidad social ya que la fibra queda en la comunidad para el desarrollo económico de los pobladores locales."*

Yanina Arzamendia, bióloga, investigadora asistente de CONICET y miembro del equipo de VICAM, explica que se

esquilan sólo ejemplares adultos, se las revisa, se toman datos científicos y se las devuelve a su hábitat natural. Además destaca la importancia de que el chaku se realice como una actividad comunitaria *“en este caso fue impulsada por una cooperativa de productores locales que tenían vicuñas en sus campos y querían comercializar la fibra. Además participaron miembros del pueblo originario, estudiantes universitarios y científicos de distintas disciplinas. Lo ideal es que estas experiencias con orientación productiva tengan una base científica.”*

Paradojas del éxito.

La recuperación de la población de vicuñas produjo cierto malestar entre productores ganaderos de la zona. Muchos empezaron a percibir a la vicuña como competencia para su ganado en un lugar donde las pasturas no son tan abundantes. En este aspecto el trabajo de los investigadores de CONICET fue fundamental, según Arzamendia *“el chaku trae un cambio de percepción que es ventajoso para las personas y para la conservación de la especie. Generalmente el productor ve a las vicuñas como otro herbívoro que compite con su ganado por el alimento y esto causa prejuicios. Hoy comienzan a ver que es un recurso valioso y ya evalúan tener más vicuñas que ovejas y llamas. Nuestro objetivo es desterrar esos mitos”,* concluye.

Pedro Navarro es el director de la Cooperativa Agroganadera de Santa Catalina y reconoce los temores que les produjo la recuperación de la especie: *“Hace 20 años nosotros teníamos diez, veinte vicuñas y era una fiesta verlas porque habían prácticamente desaparecido. En los últimos años se empezó a notar un incremento y más próximamente en el último tiempo ya ese incremento nos empezó a asustar porque en estas fincas tenemos ovejas y tenemos llamas”.* Navarro identifica la resolución de estos problemas con el trabajo del grupo VICAM: *“Yo creo que como me ha tocado a mí tener que ceder en parte y aprender de la vicuña y de VICAM, se puede contagiar al resto de la gente y que deje de ser el bicho malo que nos perjudica y poder ser una fuente más productiva.”*

La fibra de camélido

Además de camélidos silvestres como la vicuña o el guanaco, existen otros domesticados como la llama cuyo manejo es similar al ganado, para impulsar la producción de estos animales y su fibra, el Estado ha desarrollado dos instrumentos de fomento. En la actualidad se encuentran en evaluación varios proyectos para generar mejoras en el sector productor de fibra fina de camélidos que serán financiados por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Se trata de dos Fondos de Innovación Tecnológica Sectorial destinados a la agroindustria y al desarrollo social que otorgarán hasta \$35.000.000 y \$8.000.000 respectivamente. Los proyectos destinados a la Agroindustria son asociaciones entre empresas y organismos del sector público con el objetivo de mejorar la calidad de la fibra de camélido doméstico a partir del desarrollo de técnicas reproductivas, mejoramiento genético e innovaciones en el manejo de rebaños; incorporar valor a las fibras a partir de mejoras en la materia prima o el producto final; permitir la trazabilidad de los productos para lograr su ingreso en los mercados internacionales y fortalecer la cadena de proveedores y generar empleos calificados.

La convocatoria Desarrollo Social tiene como fin atender problemas sociales mediante la incorporación de innovación en acciones productivas, en organización social, en el desarrollo de tecnologías para mejorar la calidad de vida de manera sostenible y fomentar la inclusión social de todos los sectores. Otorgará hasta \$8.000.000 por proyecto que mejore las actividades del ciclo productivo de los camélidos domésticos, la obtención y/o el procesamiento de la fibra, el acopio, el diseño y el tejido, el fieltro y la confección de productos.



EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS EN LA VIDA INTRAUTERINA: MECANISMOS TOXICOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS A CORTO Y LARGO PLAZO

Palabras clave: plaguicidas, exposición intrauterina, mecanismos de toxicidad, efectos a corto y largo plazo.
Key words: pesticides, intrauterine exposure, toxicity mechanisms, short and long term effects.

Se han hallado residuos de plaguicidas y/o sus metabolitos en sangre de embarazadas, placenta, sangre de cordón, líquido amniótico y meconio evidenciándose que en la etapa intrauterina, de alta vulnerabilidad a los efectos de xenobióticos, se produce el primer contacto con estos tóxicos. Dicha exposición puede alterar el delicado equilibrio del sistema madre-placenta-feto produciendo consecuencias adversas en la salud a corto y a largo plazo. De hecho, en este trabajo se hace referencia a los efectos de la exposición ambiental a plaguicidas sobre el desarrollo del embarazo, el crecimiento intrauterino, la fisiología de la placenta y la programación fetal. También se describen alteraciones de la función inmunitaria, y del desarrollo y la función del sistema nervioso, que se pueden manifestar en etapas posteriores de la vida, con especial énfasis en la infancia. Se presentan también evidencias experimentales y epidemiológicas sobre los posibles mecanismos toxicológicos involucrados. Entre ellos se incluyen a la disrupción endocrina, la inhibición del sistema detoxificante, los cambios epigenéticos y mecanismos de acción colinérgicos y no colinérgico .

Pesticides and/or their metabolites have been detected in blood of pregnant women, placenta, umbilical cord blood, amniotic fluid and meconium, showing that during prenatal life, the most sensitive stage to the effects of xenobiotics, the first contact with these toxics occurs. Early exposure to pesticides may alter the equilibrium of the mother- placenta- fetus triad and increase the risk of adverse health effects during childhood and adult life. In fact, the present work refers to the effects of the environmental exposure to pesticides on the course of pregnancy, intrauterine growth, placental physiology and fetal programming. Additionally, disturbances at a later stage of life of the immune function and the development and the function of the nervous system are described with emphasis in childhood. Experimental and epidemiological evidences of potential toxicological mechanism involved are presented. These include endocrine disruption, inhibition of the detoxification system, epigenetic modifications and cholinergic and non-cholinergic mechanisms of action.

■ INTRODUCCIÓN

La aparición de contaminantes en el medio ambiente, producto de distintas actividades antropogénicas, es uno de los cambios ambientales

más notables de las últimas décadas. Muchos de estos contaminantes son plaguicidas. Estos compuestos empezaron a utilizarse intensamente en la década del cuarenta del siglo pasado y desde entonces se ha des-

atado una guerra química contra los insectos con la expectativa de eliminar completamente las plagas. Esta situación ha generado un considerable daño ambiental cuya intensidad depende de diversos factores como

■ **Gladis Magnarelli^{1, 2 *},
Natalia Guíñazú^{1,3} y
María Gabriela Rovedatti⁴.**

¹ Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Químicas y del medio Ambiente (LIBIQUIMA), Departamento de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, (8300) Neuquén, Argentina.

² Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Toschi y Arrayanes, (8324) Cipolletti, Río Negro, Argentina.

³ Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Argentina.

⁴ Laboratorio de Toxicología de Mezclas Químicas (LATOMEQ), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*ggmag23@gmail.com

la cantidad de producto utilizado y la capacidad del medio ambiente para transportarlo y/o degradarlo.

Según Ramírez y Lacasaña (2001), los plaguicidas se pueden clasificar en base al lapso necesario para que la cantidad del compuesto liberado en el medio ambiente se reduzca a la mitad (tiempo de vida media, TPM). Entre los plaguicidas permanentes, de TPM indefinido, se incluyen productos que contienen mercurio y arsénico. Entre los persistentes, cuyo TPM es de 1 a 20 años, a plaguicidas órgano-clorados (OC) como el DDT. Entre los moderadamente persistentes, de TPM de 1 a 18 meses, a plaguicidas órgano-fosforados (OF) como el paratión y entre los no persistentes a carbamatos y piretroides (TPM días hasta 12 semanas).

A diferencia de la exposición directa, que tiene lugar cuando el individuo reconoce y está en contacto directo con la fuente de contaminación o bien la misma es identificable por terceros, en la exposición indirecta, el individuo desconoce la presencia del plaguicida (Figura 1). Este tipo de exposición adquiere relevancia por sus efectos en la salud de las poblaciones rurales residentes en zonas de intensa aplicación de plaguicidas. La exposición de dichas poblaciones tiene lugar por la presencia de residuos de plaguicidas en el aire, suelo y agua, mientras que la exposición de la población en general se debe fundamentalmente a la presencia de residuos en alimentos.

El impacto de la exposición a plaguicidas en la salud humana depende no sólo de la dosis, el tiempo de exposición y la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria, etc.) sino también del momento de la vida en que se produce la exposición. Desafortunadamente, la exposición comienza desde la vida intrauterina, en la que

los mecanismos de detoxificación y el sistema inmunológico no están completamente desarrollados (Vizcaíno y col., 2014) y en la que existen períodos de mayor susceptibilidad definidos por diferencias en los procesos dinámicos a nivel molecular, celular, de órgano y fisiológico. Se sabe, además, que la barrera hematoencefálica del feto es inmadura y, por lo tanto, más permeable a los agentes neurotóxicos. La llegada de los plaguicidas al embrión o al feto

depende de su masa molecular, polaridad y grado de unión a proteínas. La mayoría de los plaguicidas poseen propiedades que favorecen su llegada al ambiente intrauterino. De hecho, se han determinado residuos de plaguicidas persistentes en placenta, sangre de cordón y meconio. También se han detectado plaguicidas menos persistentes y/o sus metabolitos en sangre de cordón, líquido amniótico y meconio (Barr y col., 2007; Bradman y col., 2003; Ostrea

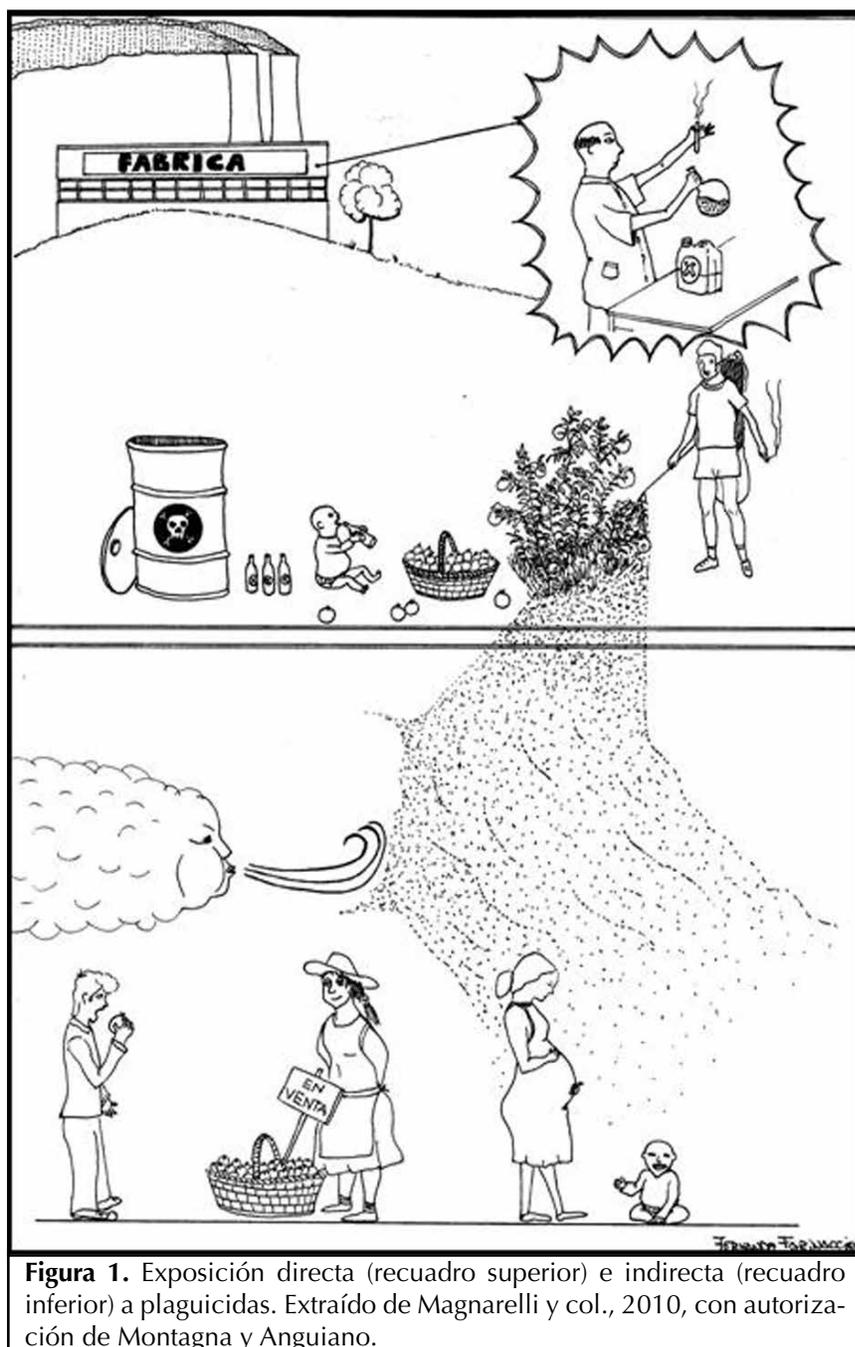


Figura 1. Exposición directa (recuadro superior) e indirecta (recuadro inferior) a plaguicidas. Extraído de Magnarelli y col., 2010, con autorización de Montagna y Anguiano.

y col., 2009; Vizcaíno y col., 2014).

El estudio de los efectos de la exposición ambiental a plaguicidas en poblaciones vulnerables ha cobrado interés en el ámbito científico en los últimos años. El mismo resulta complejo y ha provocado profundas revisiones poniendo de manifiesto la necesidad de la reevaluación de la mayoría de los ingredientes activos de uso corriente.

La exposición prenatal a plaguicidas resulta preocupante ya que puede alterar el delicado equilibrio del sistema madre-placenta-feto. El presente trabajo hace referencia a posibles mecanismos de acción toxicológica por los que los plaguicidas afectarían la vida intrauterina produciendo consecuencias adversas en la salud a corto y a largo plazo.

■ 1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBARAZO Y EL CRECIMIENTO INTRAUTERINO.

El crecimiento fetal está fuertemente influenciado no sólo por la carga genética sino también por factores externos como el hábito de fumar y la dieta materna. También la exposición a tóxicos ambientales durante el embarazo es un factor de alerta, como se evidenció a partir de los estudios epidemiológicos disponibles.

Para evaluar el impacto de la exposición a plaguicidas sobre el desarrollo intrauterino en poblaciones expuestas se han utilizado distintos parámetros como la edad gestacional y los parámetros morfométricos del neonato (el peso, la talla y el perímetro cefálico, entre otros) o bien el porcentaje de alteraciones del embarazo. Windham y Fenster (2008), en su revisión sobre estudios de exposición a OC, concluyeron que altos niveles de DDT/

DDE se asociaron a un menor desarrollo *in utero* y al parto prematuro, alteración del embarazo reconocida como una de las causas más importantes de la muerte perinatal en los países en desarrollo. En cuanto a los posibles efectos por exposición a OF, estos autores concluyeron que el mayor problema en los estudios realizados fue la falta de un estándar validado como medida de la exposición. Sin embargo, basados en el peso de la evidencia y en el principio precautorio sugirieron que la exposición a OF debería ser evitada durante el embarazo. Entre las recomendaciones para la investigación sobre la exposición a OF y alteraciones del desarrollo incluyeron diseños de tipo prospectivos, el uso de biomarcadores validados y la consideración de la susceptibilidad genética. En ese sentido, un trabajo más reciente que contempló tales requisitos, demostró que los neonatos de madres residentes rurales, cuyo fenotipo y niveles de actividad de la enzima Paraoxonasa 1 las hacen más susceptibles a los OF, presentaron menor crecimiento fetal y menor edad gestacional (Harley y col., 2011).

1.1. Posibles mecanismos de toxicidad asociados.

1.1.1 Disrupción endocrina.

Hay suficiente evidencia para afirmar que los procesos endocrinos de la triada madre-placenta-feto influyen en el desarrollo fetal y en la salud del neonato (Buss y col., 2009). Muchos plaguicidas actúan como disruptores endocrinos (DEs) pudiendo interferir directamente con la función de las hormonas al interactuar con diversos receptores hormonales. De hecho, se ha establecido que el o,p'-DDT es el más estrogénico del grupo del DDT, mientras que el p,p'-DDE es antiandrogénico. También un DE pue-

de afectar la síntesis, el transporte, la señalización y el catabolismo de hormonas.

1.1.1.1 Disrupción endocrina en el compartimiento materno.

Un estudio prospectivo realizado por nuestro grupo en embarazadas residentes rurales del Alto Valle de Río Negro, en la norpatagonia argentina, demostró que los niveles de cortisol (CTS) materno aumentaron significativamente en el primer trimestre de embarazo en el período en el que se aplican intensivamente los plaguicidas OF en esta región frutícola. Resulta de interés que todas las embarazadas que sufrieron alteraciones durante el curso del embarazo, tales como amenaza de parto prematuro y amenaza de aborto, cursaron el primer trimestre durante dicho período (Cecchi y col., 2012). En coincidencia con estos resultados, se observó que altos niveles de CTS materno por situaciones de estrés en las primeras semanas de embarazo y hasta la semana 15, incrementa el riesgo de abortos y partos prematuros, respectivamente (Sandman y col., 2006).

1.1.1.2 Disrupción endocrina en la placenta.

En la placenta se lleva a cabo una activa esteroideogénesis que depende de su interacción con la unidad materno-fetal (Figura 2). Así, la placenta sintetiza grandes cantidades de progesterona (P4) a partir del colesterol proveniente del compartimiento materno. También utiliza el sulfato de deshidroepinandrosterona (S-DHA), andrógeno sintetizado en las glándulas suprarrenales materna y fetal para sintetizar estrógenos como la estrona (E1) y el estradiol (E2) (Guibourdenche y col., 2009). La Aromatasa (ARM), enzima que cataliza la conversión de la androstenodiona (A-diona) y de la testos-

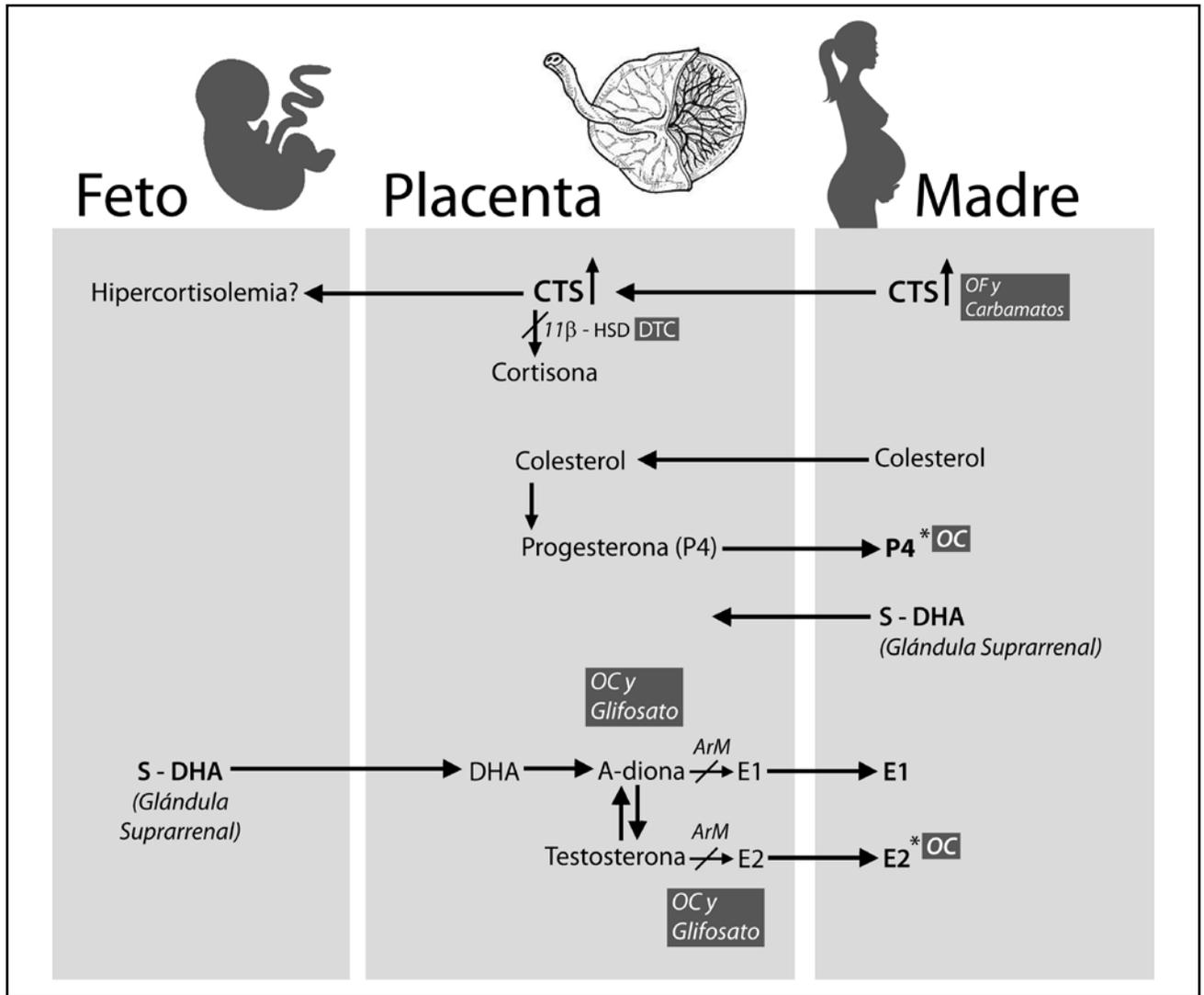


Figura 2. Efectos de plaguicidas en el metabolismo y la secreción* de hormonas en la tríada madre-placenta-feto. Las flechas con trazo oblicuo indican inhibición de la enzima que cataliza la reacción. Las flechas verticales indican aumento en los niveles de CTS (cortisol). A-diona (androstenediona), 11 β-HSD-2 (11β hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2), DHA (deshidroepinadrosterona), DTC (ditiocarbamatos), E1 (estróna) y E2 (estradiol), OF (organofosforados), OC (organoclorados), S-DHA (sulfato de deshidroepinadrosterona). Adaptado de Magnarelli y Guiñazú, 2013, con autorización de NOVA Publishers.

terona a estrógenos, es la enzima limitante de la velocidad de esta vía biosintética en la placenta. Se ha demostrado, en distintos modelos experimentales, que diferentes OC como aldrin, clordano, endosulfán y metoxicloro, así como también o,p'-DDT y p,p'-DDT y sus metabolitos (o,p'-DDE y p,p'-DDE) afectan la actividad ARM y alteran la secreción de P4, hormona esencial para mantener el reposo uterino y de E2, que interviene en el mantenimiento del embarazo (Wójtowicz y col., 2007,

2008). Dado que en estos experimentos se utilizaron concentraciones que cubren el rango de niveles OC frecuentemente presente en el suero de mujeres embarazadas, se propuso que estos desequilibrios hormonales podrían influir en el resultado del embarazo.

También se conoce que el herbicida glifosato, en concentraciones menores a las que se usan en agricultura, afectó la actividad de la ARM en células trofoblásticas JEG-3

(Richard y col., 2005).

1.1.2. Inhibición de mecanismos de detoxificación placentarios.

Si bien la capacidad de biotransformación de la placenta representa del 2-3% de la capacidad hepática (Rama Satry, 1998), las enzimas metabolizantes de xenobióticos cumplen un rol en la detoxificación de contaminantes ambientales y de drogas de adicción minimizando así su llegada al feto. La inhibición de

tales mecanismos de detoxificación por p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDE y o,p'-DDE en modelos experimentales (Wójtowicz y col., 2011) o por exposición a OF, como hemos reportado en embarazadas residentes rurales (Vera y col., 2012), aumenta el riesgo de injuria en el compartimiento fetal.

1.1.3 Alteración en receptores colinérgicos de la placenta.

Aunque la placenta es un tejido sin inervaciones, contiene todos los componentes del sistema colinérgico: acetilcolina y las enzimas responsables de su síntesis y degradación, así como también múltiples subtipos de receptores muscarínicos y nicotínicos (Bhuiyan y col., 2006; Lips y col., 2005). Se considera que la acetilcolina controlaría la entrada de nutrientes, el flujo sanguíneo y la vascularización durante el desarrollo placentario (Bhuiyan y col., 2006). La expresión del receptor muscarínico de acetilcolina disminuyó en ratas preñadas expuestas a OF (González-García y col., 2006), lo que sugiere que la función colinérgica de la placenta podría verse afectada por estos compuestos.

■ 2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN LA PROGRAMACIÓN FETAL.

Desde la concepción hasta el nacimiento el feto está expuesto a señales químicas que provienen de la sangre materna, como hormonas y factores de crecimiento. Las condiciones adversas del ambiente uterino pueden alterar los patrones de crecimiento de varios órganos y sistemas, aumentando el riesgo de sufrir alteraciones en la programación de su sistema inmuno-neuroendocrino. Como se mencionó anteriormente, hay períodos de mayor susceptibilidad, llamados ventanas

críticas, durante las cuales el feto es más sensible a las señales ambientales que alteran su proyecto de crecimiento o programación fetal. También la placenta cumple un rol fundamental en la programación fetal dado que controla el intercambio materno-fetal de nutrientes y hormonas y participa tanto de la metabolización de xenobióticos como de su transporte al feto. Respecto al intercambio materno-fetal de hormonas se ha establecido, por ejemplo, que hormonas maternas relacionadas con el estrés, como el CTS, afectan la programación fetal. Sin embargo, no necesariamente las señales de estrés que le lleguen al feto van a ser iguales a las generadas en el ambiente materno ya que la placenta juega un papel importante en la posible modificación o "filtrado" de esa información. En ese sentido, la enzima placentaria 11 β hidroxesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD-2) (Figura 2) tiene papel clave como barrera parcial para reducir los niveles de CTS materno que puedan llegar al feto.

En cuanto a los procesos de transporte y metabolismo de xenobióticos de la placenta humana, existe consenso acerca de que los xenobióticos competirían con el sustrato fisiológico de los transportadores placentarios interfiriendo con el pasaje de nutrientes al feto, aunque aún se desconoce en qué medida esta interacción puede alterar el intercambio entre el feto y la madre. La modulación de este intercambio traería consecuencias en el crecimiento y desarrollo en un estadio crucial en el cual pequeñas alteraciones pueden conducir a modulaciones a largo plazo de la regulación metabólica y la programación (Prouillac y col., 2010).

2.1 Posibles mecanismos de toxicidad asociados.

2.1.1 Disrupción endocrina.

La evidencia acumulada indica que la exposición fetal a un exceso de glucocorticoides (GC) constituye un mecanismo crítico que subyace a la asociación entre la reducción del crecimiento fetal y el aumento del riesgo de desarrollar enfermedades crónicas en etapas posteriores de la vida. Los estudios en animales indican que los cambios en los niveles de GC maternos afectan el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) fetal resultando en cambios funcionales que persisten a lo largo de la vida. Estos cambios parecen ser modulados a nivel de los receptores de GC y de mineralocorticoides en el cerebro y la hipófisis. De hecho, se ha reportado asociación entre los síntomas del tipo del trastorno hiperactivo de déficit de atención (THDA), la alteración cognitiva y conductual más comúnmente diagnosticada en la edad escolar, en niños con exposición *in utero* a dosis repetidas de GC exógenos. Este fenotipo comportamental está posiblemente ligado a alteraciones en las señales de dopamina sugiriendo que los GC pueden modificar o "programar" permanentemente este sistema (Kapoor y col., 2007). Los plaguicidas podrían modificar caminos metabólicos relacionados con la entrada de GC al feto. En este sentido, resulta de interés el hallazgo experimental que los ditiocarbamatos (DTC), inhiben en forma irreversible a la enzima 11 β -HSD-2 *in vitro* (Atanasov y col., 2003) como se indica en la Figura 2. También, resulta sugerente el aumento de CTS en sangre de embarazadas expuestas a OF que hemos detectado en el Alto Valle de Río Negro, lo que podría ocasionar hipercortisolemia en el compartimiento fetal (Figura2).

En cuanto a la exposición prena-

tal a OC, Freire y col. (2011) investigaron la asociación entre dicha exposición y los niveles de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) en neonatos varones. Se midió TSH en sangre de cordón umbilical encontrándose relaciones entre los niveles de TSH y los niveles de endrin, endosulfan y p,p'-DDE en placenta, aunque con un patrón poco claro, difícil de dilucidar.

2.1.2 Cambios en el epigenoma.

Los mecanismos epigenéticos representan uno de los blancos más probables sobre el que contaminantes ambientales como los plaguicidas ejercerían sus efectos a largo plazo. Las consecuencias de la desregulación del epigenoma fetal serían desórdenes subsecuentes en el desarrollo, enfermedades que se manifiestan en la infancia o durante la vida adulta e inclusive por herencia transgeneracional, como síndromes neurológicos y algunos cánceres. Resulta preocupante nuestro hallazgo de cambios en los niveles de CTS por exposición materna a plaguicidas en el Alto Valle del Río Negro, ya que los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos sobre la programación del desarrollo de un exceso de GC prenatales son cambios epigenéticos en las regiones promotoras de los genes blanco. Es crucial que estos cambios persistan mucho tiempo después de estos eventos iniciales, predisponiendo al individuo a enfermedades en etapas posteriores de la vida. Es curioso cómo los efectos de una gestación con este tipo de eventos parecen ser transmitidos posiblemente a una o 2 generaciones subsecuentes, lo que sugiere que los efectos epigenéticos persisten (Harris y Seckl, 2011).

Aunque se siguen descubriendo nuevos mecanismos epigenéticos, los que están mejor caracterizados son: la metilación del ADN, modi-

ficaciones covalentes en las histonas que empaquetan al ADN y la expresión de ARNs no codificantes. La interacción entre estos mecanismos epigenéticos genera la diversidad de tipos celulares durante el desarrollo y así mantiene los perfiles de expresión de los diferentes tipos celulares a lo largo de la vida. El término "epigenómica ambiental" refleja la constante interrelación entre el ambiente, que incluye tanto a factores endógenos (como los niveles hormonales o el estado inmunitario) como a factores exógenos.

Como los mecanismos regulatorios epigenéticos controlan la expresión de los genes y pueden responder o ser alterados por el ambiente, ellos podrían representar la base mecanística de las interacciones genes-ambiente y sus efectos sinérgicos. Si bien el epigenoma es susceptible de ser regulado a lo largo de toda la vida, está claro que los marcadores epigenéticos son muy susceptibles a las exposiciones ambientales que ocurren durante el desarrollo prenatal temprano, momento en que tiene lugar una extensa programación y reprogramación de la metilación del ADN y una modificación del patrón de histonas en el establecimiento de la expresión de los genes, específica de cada tejido. Más aún, hay evidencia experimental que indica que exposiciones durante las "ventanas críticas" pueden aumentar el riesgo de enfermedades transgeneracionales a través de epimutaciones en la línea germinal. También se hallaron evidencias de que la acción epigenética de los plaguicidas podría actuar no sólo en la madre en gestación sino influir en las generaciones subsiguientes (F1 a F4). De hecho, estudios experimentales han demostrado que exposiciones al plaguicida OC metoxicloro, durante el desarrollo embrionario, influyeron en la siguiente generación (F1).

Las investigaciones en animales, *in vitro* y en humanos identificaron que plaguicidas como el DDT, DDE, paraquat, dieldrin, propoxur, diclorvos modifican marcadores epigenéticos. En diversos trabajos se examinaron los efectos de las exposiciones ambientales sobre los marcadores epigenéticos y se identificaron los tóxicos que los modifican. Estas modificaciones son similares a las encontradas en muestras de tejidos patológicos (Collotta y col., 2013).

La exposición temprana a plaguicidas que son DEs tiene efectos a largo plazo en la metilación del ADN y la expresión de genes neuroendócrinos causando también disfunciones reproductivas. Estudios realizados con el fungicida vinclozolin administrado a ratas gestantes durante el período de determinación del sexo gonadal mostraron que se promovió una reprogramación del epigenoma de la línea germinal que indujo la aparición transgeneracional de enfermedades. Esta modificación del epigenoma de la línea germinal tiene lugar en el período del desarrollo en el cual se produce la desmetilación de las células germinales primordiales seguido de la remetilación durante la determinación del sexo gonadal. La modificación del programa epigenético de la línea germinal masculina (esperma) trae como consecuencia la alteración del epigenoma y del transcriptoma de todos los tejidos derivados de esta línea germinal, lo que favorecería la aparición de enfermedades en el adulto. La metilación alterada de ADN en esta línea germinal se transmite a través de las siguientes generaciones debido a que, aparentemente, se producen fenómenos del tipo de la impronta genómica (Manikkam y col., 2012).

También se observó que la exposición de ratas durante la gestación al insecticida clorado metoxicloro

(MXC) afectó al sistema reproductor de las descendientes hembras en su adultez, reprogramando la expresión de una serie de genes hipotalámicos que controlan la función reproductiva por cambios en su patrón de metilación. Las ratas tratadas con MXC tuvieron diferente patrón de metilación en dos genes con impronta paterna y en tres con impronta materna (Stouder y Paoloni-Giacobino, 2011). Estudios previos habían demostrado que la exposición fetal/neonatal a MXC causó disfunción ovárica en el adulto debido a alteración en la expresión de genes clave del ovario, como es la disminución en la expresión del receptor β de estrógenos (Zama y Uzumcu, 2009).

En humanos, resulta sugerente el hallazgo de asociaciones inversas entre la metilación global del ADN y niveles en sangre de OC (DDT, DDE, BHC, oxiclordano, clordano) en población de Groenlandia, Corea y una comunidad del sur de México. Estudios con el fungicida vinclozolina, en ratones, utilizaron cantidades superiores a la que los seres humanos suelen estar expuestos con el propósito de determinar los mecanismos mediante los cuales se producen sus efectos. Se trataron hembras preñadas para buscar posibles perturbaciones epigenéticas en *loci* con impronta en los embriones. Se aisló ARN de tejidos extraembrionarios y órganos de los embriones y se midió la expresión específica de alelo en 38 genes. Los resultados sugirieron que el mantenimiento de la expresión monoalélica de los genes con impronta fue sensible a este DE (Kang y col., 2011).

De todos modos, el papel de los plaguicidas en la herencia transgeneracional por metilación del ADN requiere de mayor cantidad de estudios. Hasta el momento, en la mayoría de los estudios de evaluación de riesgo los cambios epigenéticos

no han sido analizados. Más aún, no está claro cómo la metilación del ADN, especialmente a través de la línea germinal masculina, podría sortear los mecanismos normales de reprogramación del embrión, pasar a las siguientes generaciones y ser responsable de la herencia transgeneracional que se le atribuye. Tampoco está claro, en muchos casos, si la herencia transgeneracional se da a través de la línea germinal masculina o femenina y cuáles son los grupos de genes afectados (Leon Olea y col., 2014).

No hay información sobre modificaciones en las histonas ni cambios en la expresión de ARNs no codificantes asociados a la exposición de plaguicidas *in utero*.

■ 3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN EL NEURODESARROLLO.

La prevalencia del autismo y del THDA va en aumento en el mundo. Estas deficiencias tienen severas consecuencias en la calidad de vida, el bienestar, los logros académicos y la productividad. Si bien las causas de esta pandemia global de trastornos del neurodesarrollo son sólo conocidas en parte, se sabe que el factor genético no puede explicar los aumentos recientes en la prevalencia. Por lo tanto, se considera que una de sus causas podría ser la exposición a contaminantes ambientales, probablemente sumada a la predisposición genética. El desarrollo del cerebro humano es especialmente vulnerable a la exposición a tóxicos durante el desarrollo intrauterino y la primera infancia. Durante estas etapas de vida, los agentes químicos pueden causar daño cerebral permanente aún a niveles de exposición tan bajos que tendrían poco o ningún efecto adverso en un adulto (Granjen y Landrigam, 2014). Como el cerebro se desarrolla a partir de

las primeras semanas después de la concepción, los factores adversos que perjudican el crecimiento fetal, como la insuficiencia placentaria, podrán afectar negativamente el desarrollo del sistema nervioso central en forma continua durante el embarazo. Los períodos determinantes en los que el entramado cerebral puede ser lesionado, con la consiguiente alteración de las funciones son: el periodo de producción celular, el de proliferación y migración neuronal hasta su ubicación definitiva y el periodo de producción de la conexión sináptica, desarrollo glial y mielinización. Como las diferentes zonas del cerebro difieren temporalmente en cuanto a la ocurrencia de dichos períodos, algunas zonas pueden ser más afectadas que otras. Por lo tanto, la evaluación neuropatológica de alteraciones inducidas por agentes químicos resulta sumamente compleja (Gill y col., 2013). Dichas alteraciones involucran efectos en el comportamiento, en la neuroquímica, la histología y/o grandes alteraciones morfológicas del sistema nervioso central, observables en el recién nacido e incluso a largo plazo como resultado de la exposición de la madre a compuestos tóxicos durante el embarazo o la lactancia.

3.1. Efectos morfológicos y funcionales en el cerebro.

Los efectos de la exposición a bajas dosis de OF en el cerebro de animales en desarrollo desencadenó una serie de estudios en niños a fin de examinar si los niveles de exposición supuestamente "seguros" producen consecuencias similares a las halladas en esos modelos experimentales. Se estudiaron parámetros morfológicos de la superficie cerebral y del espesor de la corteza cerebral en una cohorte de niños entre 5, 9 y 11 años de edad cuya exposición prenatal a plaguicidas se había documentado previamente.



Figura 3. Efectos de la exposición a plaguicidas en el período prenatal y en la infancia y posibles mecanismos subyacentes.

IgE (inmunoglobulina E), THDA (trastorno hiperactivo de déficit de atención).

Si bien los niveles de exposición al OF clorpirifos no habían sido altos, se halló una asociación significativa entre la exposición prenatal y alteraciones en la estructura cerebral y en la función neurocognitiva. Dentro del grupo estudiado, los expuestos a mayores concentraciones de clorpirifos también presentaron alteración del dimorfismo sexual normal cerebral (Rahu y col., 2014).

En una población mexicana, residente en un área donde se había usado DDT hasta 1998 como parte de una campaña contra la malaria, se estudió el efecto de la exposición a DDE sobre el neurodesarrollo. El

nivel de DDE en suero materno durante el primer trimestre de embarazo se asoció negativamente con el desarrollo psicomotor en el primer año de vida (Torres-Sánchez y col., 2007), mientras que el DDE en suero materno durante el tercer trimestre se asoció negativamente con el índice cognitivo general, habilidades cuantitativas, verbales y de memoria entre 3,5 y 5 años de edad. Aunque la exposición a DDE durante el embarazo no cambió sustancialmente durante un período de 9 meses, los diferentes efectos observados se relacionarían con el hecho que las distintas zonas del cerebro difieren temporalmente en cuanto

a la ocurrencia de los procesos del desarrollo, la migración y la organización celular (Torres Sanchez y col., 2013). También se ha asociado la exposición prenatal a los plaguicidas con el aumento de la incidencia de trastornos mentales como el autismo y el TDAH en los niños de forma concomitante con déficits en la psicomotricidad y la percepción visuoespacial (Kajta y Wójtowicz, 2013).

3.2. Posibles mecanismos asociados.

3.2.1. Disrupción endocrina.

Ciertos DEs son capaces de alterar la sinaptogénesis, la mielinización, la transmisión nerviosa y la formación de las redes neuronales. Las evidencias experimentales y epidemiológicas demostraron que los DEs afectan al sistema nervioso mediante la interacción con el eje hipotálamo-pituitario-tiroideo que es esencial para el desarrollo adecuado del cerebro. La exposición prenatal y neonatal a algunos DE impide la liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) desde el hipotálamo y de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) desde la glándula pituitaria. Se sabe que algunos plaguicidas que actúan como DE pueden alterar la síntesis de T3 y T4, bloquear la captación de yodo y afectar la unión de estas hormonas al receptor. La presencia de DDTs en sangre de embarazadas se asoció con una disminución de hormonas tiroideas (T3 y T4 total y libre) en la sangre de esas embarazadas, las que son cruciales para el neurodesarrollo fetal y la función cognitiva. Los cambios sutiles en las hormonas tiroideas en una población resultan preocupantes, ya que mínimos cambios en una embarazada determinada podrían traer consecuencias significativas, especialmente en poblaciones sensibles como son los fetos (Kim y col., 2012).

Otro efecto en el sistema nervioso es la alteración de la vía esteroidal, por interacción con diversos receptores, como los receptores de estrógenos como se citó en 1.1.1. Es conocido que dichos receptores están implicados en el desarrollo del cerebro y que la alteración de esa vía de señalización puede resultar en anomalías observadas durante la ontogenia y el comienzo de enfermedades neurodegenerativas (Kajta y Wójtowicz, 2013).

3.2.2. Cambios epigenéticos.

También los cambios epigené-

ticos producidos por la exposición prenatal y postnatal temprana a plaguicidas se asocian a la etiología de enfermedades neurológicas que se manifiestan en períodos posteriores de la vida. Así, bajas dosis de DDT pueden causar metilación incompleta de genes específicos en el cerebro en desarrollo y afectar la neurogénesis a través de generaciones (Kajta y Wójtowicz, 2013).

Estudios recientes asocian la enfermedad de Alzheimer con la "regulación latente asociada a la vida temprana" (LEARn, siglas en inglés). LEARn serían cambios temporarios inducidos por agentes ambientales que se hacen latentes y se presentan nuevamente en la madurez o en la vejez, causando enfermedades como la mencionada. Se vio que los cambios epigenéticos causados por algunos plaguicidas pueden aumentar la producción de la proteína amiloide β y causar la enfermedad de Alzheimer (Maloney y col., 2012).

3.2.3. Mecanismos de acción no colinérgicos.

En cuanto a los OF, es ampliamente conocido que su efecto neurotóxico agudo se basa en la unión irreversible con la acetilcolinesterasa, lo que prolonga la acción del neurotransmisor acetilcolina. Por lo tanto, es lógico suponer que si la exposición a OF tuvo lugar durante los períodos críticos del desarrollo del sistema nervioso, la hiperactividad colinérgica resultante podría alterar el proceso de maduración. Sin embargo, se considera que es poco probable que los niveles ambientales de exposición a OF, a los que normalmente estarían expuestos los fetos y los niños, produzcan una inhibición significativa de la acetilcolinesterasa en el cerebro y, por lo tanto, induzcan hiperactividad del sistema colinérgico. Esto no quiere decir que la exposición a bajos niveles de OF no impacte en el desarrollo del cerebro.

De hecho, los estudios de laboratorio han informado efectos neuroquímicos y conductuales adversos por la exposición a OF en los niveles que inducen sólo cantidades mínimas de inhibición de AChE cerebral y poca hiperactividad en el sistema colinérgico. Estos hallazgos han llevado a la hipótesis de que "los efectos toxicológicos de OF durante el desarrollo del cerebro implican mecanismos de acción no-colinérgicos". Los estudios experimentales involucran al sistema endocannabinoide (Carr y col., 2014), a la expresión de genes que regulan el ciclo celular y a la apoptosis en el cerebro en desarrollo (Slotkin y Seider, 2012).

■ 4. EFECTOS INMUNOTÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS.

Un número cada vez mayor de enfermedades en la infancia, tales como alergias (por ejemplo, rinitis alérgica, dermatitis atópica, asma), algunos tipos de cáncer (por ejemplo, leucemia) y otras (por ejemplo, diabetes tipo 1) se han relacionado con la exposición ambiental a xenobióticos durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano. Debido a que el sistema inmunológico se desarrolla y madura en dichos períodos y a que la respuesta inmunológica juega un papel crítico en el desarrollo de cada una de estas enfermedades, es importante conocer el efecto de los xenobióticos en el sistema inmunitario en desarrollo.

Según Corsini y col. (2013), los efectos inmunotóxicos se encuadran en dos grandes grupos:

- alteraciones en la inmunocompetencia, lo cual resulta en infecciones más prolongadas, severas o a repetición, así como también el desarrollo de cáncer.
- inmunostimulación alterada, que puede resultar en enfermedades inmunológicas con auto-

inmunidad o hipersensibilidad.

Se reconocen cinco grandes eventos de maduración en el desarrollo del sistema inmunológico: (1) el inicio de la hematopoyesis, (2) la migración celular y la expansión de las células, (3) la colonización de la médula ósea y el timo, (4) la maduración de la inmunocompetencia y (5) el establecimiento de memoria inmunológica (Dietert y col., 2000). Se cree que fallas durante un evento madurativo en particular darían origen a alteraciones o disfunciones inmunológicas detectables en los hijos una vez que han alcanzado la inmunocompetencia (DeWitt, 2011). Además, la clase de disfunción inmunológica que resulte después de la exposición prenatal o postnatal temprana puede estar influenciada por la naturaleza y concentración del inmunotóxico, la vía y duración de la exposición, la genética y el sexo del individuo (Dietert y col., 2000).

Los efectos de la exposición prenatal y posnatal de plaguicidas persistentes en el desarrollo de distintas patologías respiratorias son tal vez los más estudiados debido al elevado TPM de estos contaminantes, lo que hace posible asociar más certeramente la exposición con el riesgo de sufrir cierta patología. En una revisión realizada por Gascon y col. (2013) se llegó a la conclusión que existe evidencia suficiente para establecer la asociación entre la exposición prenatal a DDE y el riesgo de padecer asma e infecciones en el tracto respiratorio. Este mismo grupo de investigadores, estudiaron los niveles de distintos OC en sangre de 2150 embarazadas en España, encontrándose que la exposición prenatal a DDE, se asocia con un mayor riesgo de infecciones en vía respiratoria baja y sibilancia respiratoria en la niñez (Gascon y col., 2012). En un modelo animal de exposición prenatal y postnatal se demostró que se afecta la inmunidad innata, la

inmunidad celular y la humoral de las crías frente a una mezcla que mimetiza la compleja mezcla de compuestos órgano-clorados (entre los que se incluyeron plaguicidas) que se encuentra en la grasa de mamíferos en el mar en el Ártico canadiense (Bilrha y col., 2004).

Por otra parte, los efectos inmunotóxicos de los plaguicidas con menor TPM que los OC, han sido menos estudiados. Se ha asociado la exposición prenatal a OF y piretroides con el desarrollo de patologías mediadas por una disfunción inmunológica. En este sentido, la exposición prenatal a cis-permetrina se asoció con la frecuencia y aparición de tos en niños de 5 años (Liu y col., 2012).

4.1 Posibles mecanismos asociados con la disfunción del sistema inmunológico.

Los mecanismos biológicos mediante los cuales los plaguicidas pueden ser inmunotóxicos no han sido dilucidados completamente. Dentro de los mecanismos propuestos es posible mencionar:

4.1.1 Hipersensibilización.

Cuando un individuo ha sido programado inmunológicamente para reconocer un antígeno como extraño, el contacto *a posteriori* con el antígeno conduce a un refuerzo secundario de la respuesta inmunitaria. Cuando esta respuesta secundaria es excesiva y causa alteraciones en el tejido, se denomina hipersensibilización. Hay algunos agentes que pueden actuar directamente con componentes de la respuesta inmunológica innata y causar reacciones de hipersensibilidad sin la intervención de la respuesta secundaria. Como la mayoría de los plaguicidas son moléculas pequeñas, se ha postulado que podrían exacerbar los síntomas del asma o de la dermatitis

atópica por distintos mecanismos de hipersensibilidad.

4.1.2 Aumento de inmunoglobulina E.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs) son moléculas producidas por los linfocitos B diferenciados a células plasmáticas y tienen la capacidad de reconocer específicamente un antígeno y, a su vez, activar al sistema complemento y unirse a los fagocitos. La inmunoglobulina E (IgE) es un isotipo (clase) de Ig cuyo papel fisiológico es la protección de sitios anatómicos susceptibles a la entrada de patógenos (Delves y col., 2008). La IgE también juega un papel esencial en las reacciones de hipersensibilidad como son el asma alérgica, sinusitis, rinitis alérgica, alergia a los alimentos, entre otras, y en condiciones alérgicas tales como reacciones anafilácticas a ciertos medicamentos. La IgE es la Ig menos abundante en suero. En individuos atópicos los niveles de IgE pueden aumentar hasta 10 veces respecto a los valores normales.

Uno de los mecanismos propuestos de inmunotoxicidad es el incremento en los niveles de IgE inducido por los plaguicidas. En un estudio realizado en Alemania, donde se evaluó exposición posnatal a OC en niños entre 7-10 años, se encontró que los niveles en sangre de DDE se correlacionaron positivamente con los niveles de IgE (Karmaus y col., 2005). Por otra parte, la exposición prenatal a DDE se asoció con sibilancia respiratoria pero no se encontró aumento significativo de IgE (Sunyer y col., 2003).

4.1.3 Desarrollo de respuesta Tipo 2.

Se conocen diferentes fenotipos de linfocitos T cooperadores, los más estudiados han sido el cooperador tipo 1 (Th1) y cooperador tipo 2 (Th2). La respuesta Th1 se caracteri-

za por una respuesta pro-inflamatoria que es especialmente importante para la defensa de patógenos intracelulares, mientras que la respuesta Th2 se caracteriza por favorecer la producción de Igs, entre otros efectos (Delves y col., 2008). Cabe aclarar que la clasificación del fenotipo Th1/Th2, representa un modelo muy básico y puede no reflejar la complejidad de las respuestas cooperadoras, existiendo en la actualidad una clasificación mucho más amplia (Tuomela y Lahesmaa, 2013).

Uno de los mecanismos de inmunotoxicidad propuestos es que la exposición a plaguicidas favorecería el perfil cooperador tipo Th2. En un estudio realizado por Duramad y col. (2007) se encontró que los hijos de mujeres que trabajan en agricultura, expuestos prenatalmente a diferentes plaguicidas, poseen linfocitos cooperadores que tienen un perfil de activación Th2, hecho que se podría asociar al desarrollo de diferentes patologías inmunológicas como la alergia.

4.1.4. Alteraciones en los niveles de citoquinas.

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que estimulan o inhiben distintos procesos como la diferenciación, proliferación o función de las células inmunitarias y juegan un rol fundamental prácticamente en todos los procesos inmunológicos. Las citoquinas de un fenotipo Th2, IL-4, IL-5, IL-13, están clásicamente asociadas con la patología asmática y se conoce que durante el primer año de vida la producción favorecida de las citoquinas IL-4 e IL-5 por células mononucleares de sangre periférica se asocia con el desarrollo de asma y aumento en los niveles de IgE a los 5 años (Rother y col. 2011). En un modelo de laboratorio de asma inducido por ovalbúmina, se observó que la exposición previa al OC metoxiclor, al

OF paratión o al sinergista piperonil butóxido, favoreció la producción de citoquinas asociadas con esta patología (Nishino, 2013). Un estudio realizado en las comunidades agrícolas en California, demostró que los linfocitos de niños de madres empleadas en trabajos agrícolas, expuestas principalmente a OF, produjeron preferentemente IL-4 (Duramad, 2007). Otro estudio realizado en Canadá, encontró una asociación negativa entre los niveles de DDE y la producción de la citoquina TNF α por células mononucleares de sangre de cordón umbilical activadas con el mitógeno celular fitohemoaglutinina (Bilrha y col., 2003).

4.1.5 Alteración en el número de células inmunológicas.

Otro de los mecanismos propuestos de inmunotoxicidad es la alteración en el número de células inmunológicas por una reducción de viabilidad producida por el xenobiótico parental o sus metabolitos o asociado a otras alteraciones inducidas, como el estrés oxidativo.

La exposición a DDE se ha asociado con niveles alterados y con una reducción en la viabilidad y proliferación de las células inmunológicas. Uno de los mecanismos más estudiados de muerte inducida por xenobióticos es la apoptosis o muerte celular programada (Pérez-Maldonado y col., 2006; Alegría Torres y col., 2009). Este mecanismo juega un papel muy importante en condiciones fisiológicas normales, sin embargo cuando no se encuentra regulada, la apoptosis puede contribuir al desbalance inmunológico. Por otra parte, las células apoptóticas podrían regular activamente la respuesta inmunológica mediante la liberación de citoquinas inmunosupresoras y mediante la supresión de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, lo que favorece una respuesta inmunosupresora que

podría conducir a un mayor riesgo de contraer infecciones entre otras patologías.

En este sentido, en niños expuestos prenatalmente y postnatalmente a plaguicidas OC se encontró una disminución de linfocitos de sangre periférica y una disminución en la secreción de citoquinas como IL-10 e IFN γ (Schaalan y col., 2012). Otros estudios que analizaron la relación entre el número de linfocitos y la exposición prenatal a OC no encontraron relación entre los niveles de DDE y el número de células del sistema inmunológico adaptativo (Dewailly y col., 2000; Glynn y col., 2008) pero sí con una disminución en los niveles de células del sistema inmunológico innato, como eosinófilos y/o su contenido de gránulos (Karmaus y col., 2005).

Referido a otros plaguicidas con menor TPM, en modelos de exposición *in vitro* a diferentes células inmunológicas, macrófagos de la inmunidad innata, o linfocitos de la inmunidad adaptativa, se demostró la capacidad de plaguicidas OF clorpirifos, de inducir la muerte celular por apoptosis en estas células (Li y col., 2007, 2009)

■ 5. CONCLUSIONES.

La evidencia experimental y la epidemiológica permiten afirmar que la exposición ambiental a los plaguicidas impacta sobre la tríada madre-placenta-feto con efectos que se pueden manifestar en períodos tempranos de la vida como también a mediano y largo plazo. En los tres compartimientos, la DE aparece como uno de los mecanismos claves que subyacen a los efectos observados no sólo por su efecto en el sistema endocrino *per se*, sino también por las consecuencias en eventos epigenéticos. Por otra parte, la placenta, como órgano blanco de la acción toxicológica, ha pro-

bado ser una matriz de estudio útil ya que pueden utilizarse modernos abordajes metodológicos para dilucidar los mecanismos de toxicidad de mezclas químicas de relevancia ambiental. En cuanto al estudio de los efectos en el feto, presenta varios desafíos. Quizás el más importante, desde el punto de vista epidemiológico, sea que el reconocimiento de la neurotoxicidad e inmunotoxicidad del desarrollo deben apoyarse en evidencias obtenidas en dos instancias muy separadas en el tiempo: los datos de exposición, obtenidos frecuentemente de la madre durante la gestación y los datos posnatales del desarrollo neuroconductual del niño o de patologías asociadas a una disfunción inmunológica, obtenidos varios años después. Además, los reportes disponibles sobre los efectos de la exposición *in utero* a plaguicidas deben ser considerados con cautela, ya que no son muchos los que han abarcado un gran número de individuos, ni han contemplado la co-exposición ambiental a otros tóxicos o las características genéticas de la población.

Es evidente el papel conjunto que poseen la toxicología y la epidemiología en el discernimiento de los efectos sobre la salud producidos por los agentes ambientales, si bien es tarea pendiente el proveer una mirada unificada sobre la relación causal entre exposición a plaguicidas y enfermedad, tanto en la generación bajo estudio como en las generaciones subsiguientes. A pesar de que existen numerosos aspectos aún no explorados, los expertos y profesionales de la salud coinciden en la necesidad de minimizar el uso de plaguicidas y establecer políticas sanitarias que incluyan monitoreos y acciones de prevención en las poblaciones más vulnerables

Hasta el presente, muchos de los mecanismos de toxicidad han

sido dilucidados en modelos experimentales no siendo posible la extrapolación directa de esos resultados al hombre. Sin embargo, a medida que se integren los datos obtenidos de las investigaciones en epidemiología toxicológica con los de la toxicogenómica, metabolómica y proteómica aumentará el conocimiento de los mecanismos que subyacen a los efectos descritos en humanos.

■ 6. AGRADECIMIENTOS.

Las autoras agradecen al Lic. Diego Potás por el diseño de las figuras 2 y 3.

■ GLOSARIO

Antígeno: Es toda molécula capaz de generar una respuesta del sistema inmunológico.

Barrera hematoencefálica: formación densa de células endoteliales entre los vasos sanguíneos y el sistema nervioso central que evita que muchas sustancias la atraviesen, al tiempo que permite el pasaje de nutrientes y oxígeno.

Biomarcador: respuesta biológica a una sustancia química o a un grupo de agentes químicos. Su determinación provee información sobre la exposición, el efecto tóxico y la susceptibilidad individual a contaminantes ambientales.

Cambios epigenéticos: cambios heredables en la expresión de los genes o el fenotipo que ocurre sin cambios en la secuencia de ADN.

Células trofoblásticas JEG-3: línea de células trofoblásticas malignas que tiene la capacidad para secretar hormonas tales como la beta gonadotropina coriónica humana (β -hCG) y progesterona (P4). Esta línea celular se utiliza, entre otras líneas, para estudiar las interaccio-

nes de drogas y xenobióticos con los trofoblastos que conforman la placenta.

Disruptor endocrino (DE): sustancia química exógena o mezcla de sustancias que altera la estructura o función del sistema endocrino.

Edad gestacional: edad de un embrión, feto o neonato desde el primer día de la última menstruación. Permite cuantificar la progresión del embarazo.

Efectos sinérgicos: un efecto de dos o más agentes actuando en conjunto que es mayor al esperado considerando a la suma de las acciones de los agentes por separado.

Eje hipotalámico-pituitario-adrenal (eje HPA): interacciones homeostáticas entre el hipotálamo, la glándula pituitaria o hipófisis y las glándulas suprarrenales que controlan las reacciones al estrés y regulan la digestión, el sistema inmunitario, las emociones, la conducta sexual y el metabolismo energético.

Epimutación: mutación del material genético que no involucra cambios en la secuencia de bases del ADN.

Esteroidogénesis: vía de síntesis de hormonas esteroideas a partir del colesterol.

Estudio prospectivo: estudio epidemiológico cuya característica fundamental es la de iniciarse con la detección de una supuesta causa y luego seguir a una población a través del tiempo hasta determinar si se presenta o no el efecto.

Glucocorticoides: hormonas esteroideas secretadas por la corteza de las glándulas suprarrenales. Participan en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, de lípidos y proteínas y tienen un efecto

inmunosupresor. En el ser humano los glucocorticoides producidos son el cortisol, la cortisona y la corticosterona.

Herencia transgeneracional epigenética: la herencia entre generaciones de información epigenética, a través de las células germinales que lleva a variaciones en el fenotipo en ausencia de influencias ambientales directas.

Impronta genómica: fenómeno genético por el cual ciertos genes se expresan de una manera específica dependiendo del progenitor del cual provienen. Involucra la metilación del alelo no expresado.

Inmunidad adaptativa: es un sistema de reconocimiento específico de agentes nocivos para el organismo (patógenos y extraños) que, por poseer memoria inmunológica, frente a un segundo encuentro con el agente es capaz de eliminarlo en forma más rápida y eficiente. Está conformada por un componente celular, los linfocitos y un componente humoral, las inmunoglobulinas.

Inmunidad innata: es la primera línea de defensa contra la invasión de agentes patógenos. Está conformada por un componente celular, por ejemplo los macrófagos y polimorfonucleares, y un componente humoral, por ejemplo el sistema del complemento.

Inmunocompetencia: es la capacidad del cuerpo para producir una respuesta inmunológica normal después de la exposición al antígeno (el cual puede ser un componente de un microorganismo o partículas no microbianas extrañas al organismo).

Inmunotóxico: se define como una sustancia que puede alterar una o más funciones inmunológicas resul-

tando en un efecto adverso para la persona.

Línea germinal: línea celular precursora de los gametos: óvulos y espermatozoides.

Linfocito T cooperador: es una clase de linfocitos T (CD4), son células encargadas de coordinar la respuesta inicial frente a los antígenos.

Metilación del ADN: modificación covalente del ADN que consiste en la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas del ADN situadas previa y contiguamente a una guanina. La metilación del ADN es heredable en las células somáticas luego de la división celular. Generalmente la hipermetilación del sector promotor de un gen está asociada a una disminución de la expresión de dicho gen. Por otra parte, la hipometilación de una región no codificante ha sido ligada a inestabilidad cromosómica.

Ontogenia: describe cómo se desarrolla un ser humano o un animal. La noción se focaliza sobre todo en la etapa embrionaria y fetal.

Paroxonasa 1: enzima plasmática capaz de hidrolizar metabolitos oxones de algunos plaguicidas organofosforados. Altos niveles de paraoxonasa 1 protegen frente a la intoxicación.

Parto prematuro: parto que comienza antes de la semana 37 de gestación.

Prevalencia: proporción de individuos de un grupo o de una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un período definido.

Programación fetal: eventos vitales tempranos que suceden dentro del útero materno y tienen la capacidad

de modelar el fenotipo preparando al feto para la vida extrauterina.

Proteína amiloide β : péptido que constituye el principal componente de las placas o depósitos que se encuentran en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Región promotora del gen: secuencia específica de ADN, localizada justo donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción del ADN, que contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula.

Sibilancia: es el sonido que hace el aire al pasar por las vías respiratorias congestionadas.

Sistema colinérgico: incluye al neurotransmisor acetilcolina, los receptores a los que se une y a las enzimas involucradas en la síntesis de acetilcolina y su degradación.

Sistema endocannabinoide: incluye a los endocannabinoides, receptores a los que se unen, enzimas involucradas en su síntesis y degradación. Los endocannabinoides actúan como neuromoduladores en el cerebro.

Trastorno hiperactivo de déficit de atención (THDA): trastorno del comportamiento caracterizado por distracción moderada a grave, períodos de atención breve, inquietud motora, inestabilidad emocional y conductas impulsivas.

Xenobiótico: cualquier sustancia extraña al organismo, que puede actuar como tóxico.

■ BIBLIOGRAFIA

Alegría-Torres JA, Díaz-Barriga F, Gandolfi AJ, Pérez-Maldonado IN. (2009) Mechanisms of p,p'-DDE-induced apoptosis in hu-

- man peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology In Vitro* 23, 1000-1006.
- Atanasov A, Tam S, Röcken J, Baker M, Odermatt A. (2003) Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by dithiocarbamates. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 257-262.
- Barr DB, Bishop A, Needham LL. (2007) Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reproductive Toxicology* 23, 260-266.
- Bhuiyan MB, Murad F, Fant ME. (2006) The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide. *Cell Communication and Signaling* 4, 4-10.
- Bilrha H, Roy R, Moreau B, Belles-Isles M, Dewailly E, Ayotte P. (2003) In vitro activation of cord blood mononuclear cells and cytokine production in a remote coastal population exposed to organochlorines and methyl mercury. *Environmental Health Perspectives* 111, 1952-1957.
- Bilrha H, Roy R, Wagner E, Belles-Isles M, Bailey JL, Ayotte P. (2004) Effects of gestational and lactational exposure to organochlorine compounds on cellular, humoral, and innate immunity in swine. *Toxicological Sciences* 77, 41-50.
- Bradman A, Barr DB, Henn BGC, Drumheller T., Curry C., Eskenazi B. (2003) Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environmental Health Perspectives* 111, 1779-1782.
- Buss, C, Poggi Davis E, Shahbaba B, Pruessner JC, Head K, Sandman CA. (2009) Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E1312-E1319.
- Cecchi A, Rovedatti MG, Sabino G, Magnarelli GG. (2012) Environmental exposure to organophosphate pesticides: Assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 280-287.
- Corsini E, Sokooti M, Galli CL, Moretto A, Colosio C. (2013) Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* 307, 123-135.
- Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. (2008) *Roitt Inmunología. Fundamentos* (11ª edición) Editorial Médica Panamericana, ISBN 950061869-9 8479038144, 544 pp.
- Dewailly E, Ayotte P, Bruneau S, Gingras S, Belles-Isles M, Roy R. (2000) Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environmental Health Perspectives* 108, 205-211.
- DeWitt JC, Peden-Adams MM, Keil DE, Dietert RR. (2012) Current status of developmental immunotoxicity: early-life patterns and testing. *Toxicologic Pathology*, 40, 230-236.
- Dietert RR, Etzel RA, Chen D, Halonen M, Holladay SD, Jarabek AM, Landreth K, Peden DB, Pinkerton K, Smialowicz RJ, Zoetis T. (2000) Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: immune and respiratory systems work group summary. *Environmental Health Perspectives* 108 Suppl 3, 483-490.
- Duramad P, Harley K, Lipsett M, Bradman A, Eskenazi B, Holland NT, Tager IB. (2006) Early environmental exposures and intracellular Th1/Th2 cytokine profiles in 24-month-old children living in an agricultural area. *Environmental Health Perspectives* 114, 1916-1922.
- Freire C, López-Espinosa MJ, Fernández M, Molina-Molina JM, Prada R, Olea N. (2011) Prenatal exposure to organochlorine pesticides and TSH status in newborns from Southern Spain. *Science of the Total Environment* 409, 3281-3287.
- Gascon M, Morales E, Sunyer J, Vrijheid M. (2013) Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review. *Environment International* 52, 51-65.
- Gascon M, Vrijheid M, Martínez D, Ballester F, Basterrechea M, Blarduni E, Esplugues A, Vizcaino E, Grimalt JO, Morales E, Sunyer J. (2012) Pre-natal exposure to dichlorodiphenyldichloroethylene and infant lower respiratory tract infections and wheeze. *European Respiratory Journal* 39, 1188-1196.
- Gill S, Bowers W J, Nakai JS, Yagminas A, Mueller R, Pulido O. (2013) Effects of Environmentally Relevant Mixtures of Persistent Organic Pollutants on the Developmental Neurobiology in Rats. *Toxicologic Pathology* 41, 38-47.

- Glynn A, Thuvander A, Aune M, Johansson A, Darnerud PO, Ronquist G, Cnattingius S. (2008) Immune cell counts and risks of respiratory infections among infants exposed pre- and postnatally to organochlorine compounds: a prospective study. *Environmental Health* 7, 62.
- González-García B, Levario-Carrillo M, Ramos-Martínez E, Arévalo-Gallegos S, Infante-Ramírez R, Olave-Arreola ME, González-Horta C, Sánchez-Ramírez B. (2006) Muscarinic Cholinergic Receptor Expression in Placenta From Rats Exposed to Methyl Parathion. *Placenta* 27, A56.
- Guibourdenche J, Fournier T, Malassiné A, Evain-Brion D. (2009) Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 47, S35-S42.
- Harley KG, Huen K, Schall RA, Holland N T, Bradman A, Barr DB, Eskenazi, B. (2011) Association of organophosphate pesticide exposure and paraoxonase with birth outcome in Mexican-American women. *PLOS One* 6, e23923, 1-10.
- Kajta M, Wójtowicz AK. (2013) Impact of endocrine-disrupting chemicals on neural development and the onset of neurological disorders. *Pharmacological Reports* 65, 1632-1639.
- Kang ER, Iqbal K, Tran DA, Rivas GE, Singh P, Pfeifer GP, Szabo PE. (2011) Effects of endocrine disruptors on imprinted gene expression in the mouse embryo. *Epigenetics* 6, 937-950.
- Kapoor A., Dunn E., Kostaki A., Andrews M., Matthews S. (2006) Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *Journal of Physiology* 572, 31-44.
- Karmaus W, Brooks KR, Nebe T, Witten J, Obi-Osius N, Kruse H. (2005) Immune function biomarkers in children exposed to lead and organochlorine compounds: a cross-sectional study. *Environmental Health* 4, 1-5.
- Kim S, Park J, Kim HJ, Lee JJ, Choi G, Choi S, Kim S, Moon H, Kim S, Choi, K. (2013). Association between several persistent organic pollutants and thyroid hormone levels in serum among the pregnant women of Korea. *Environment International* 59, 442-448.
- León-Olea M, Martyniuk CJ, Orlando EF, Ottinger, MA, Rosenfeld CS, Wolstenholme JT, Trudeau VL. (2014) Current concepts in neuroendocrine disruption. *General and Comparative Endocrinology* (en prensa).
- Li Q, Kobayashi M, Kawada T. (2007) Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. *Toxicology* 239, 89-95.
- Li Q, Kobayashi M, Kawada T. (2009) Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. *Toxicology* 255, 53-57.
- Lips KS, Brüggmann D. (2005) Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta* 26, 735-746, ISSN 0143-4004.
- Liu B, Jung KH, Horton MK, Camann DE, Liu X, Reardon AM, Perzanski MS, Zhang H, Perera FP, Whyatt RM, Miller RL. (2012) Prenatal exposure to pesticide ingredient piperonyl butoxide and childhood cough in an urban cohort. *Environment International* 48, 156-161.
- Magnarelli GG, Rovedatti MG, Pechén de D'Angelo AM. (2010) Capítulo 6: Plaguicidas y salud humana, pp 307-340. En: Anguiano OL y Montagna CM. Clasificación y toxicología de plaguicidas. EDUCO. Editores Montagna G. y Anguiano L. Universidad Nacional del Comahue, ISBN: 978-987-604-154-6, 380 pp
- Magnarelli G, Guñazú N. (2013) Chapter 11: Placental Toxicology of organic pollutants. NOVA publishers Editor Richard Nicholson, NY. USA. ISBN: 978-1-62618-295-0, 368pp
- Maloney B, Sambamurti K, Zawia N, Lahiri DK (2012) Applying epigenetics to Alzheimer's disease via the latent early-life associated regulation (LEARn) model. *Current Alzheimer Research* 9, 589-599.
- Nishino R, Fukuyama T, Tajima Y, Miyashita L, Watanabe Y, Ueda H, Kosaka T. (2013) Prior oral exposure to environmental immunosuppressive chemicals methoxychlor, parathion, or piperonyl butoxide aggravates allergic airway inflammation in NC/Nga mice. *Toxicology* 309, 1-8.
- Ostrea Jr. E M, Bielawski DM, Posecion Jr. NC, Corrion M, Villanueva-Uy E, Bernardo RC, Ager JW. (2009) Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environmental Research* 109, 116-122.
- Pérez-Maldonado IN, Athanasiadou M, Yáñez L, González-Amaro R, Bergman A, Díaz-Barriga F.

- (2006) DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite. *Science of the Total Environment* 370, 343-51.
- Prouillac C, Lecoœur S (2010) The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metabolism and Disposition* 38, 1623-1635.
- Rama Sastry, B. (1997) Human Placental Cholinergic System. *Biochemical Pharmacology* 53,1577-1586.
- Ramírez JA, Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales* 4, 67-75.
- Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini G.E. (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives* 113, 716-720.
- Rothers J, Halonen M, Stern DA, Lohman IC, Mobley S, Spangenberg A, Anderson D, Wright AL. (2011) Adaptive cytokine production in early life differentially predicts total IgE levels and asthma through age 5 years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128, 397-402.
- Sandman C, Glynn L, Dunkel Schetter C, Wadhwa P, Garite T, Chic-DeMet A, Hobe C. (2006) Elevated maternal cortisol early in pregnancy predicts third trimester levels of placental corticotropin releasing hormone (CRH): Priming the placental clock. *Pesticides* 27, 1457-1463.
- Schaalan MF, Abdelraouf SM, Mohamed WA, Hassanein FS. (2012) Correlation between maternal milk and infant serum levels of chlorinated pesticides (CP) and the impact of elevated CP on bleeding tendency and immune status in some infants in Egypt. *Journal of Immunotoxicology* 9, 15-24.
- Stouder C, Paoloni-Giacobino A. (2011) Specific transgenerational imprinting effects of the endocrine disruptor methoxychlor on male gametes. *Reproduction* 141, 207-216.
- Sunyer J, Torrent M, Muñoz-Ortiz L, Ribas-Fitó N, Carrizo D, Grimalt J, Antó JM, Cullinan P. (2005) Prenatal dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and asthma in children. *Environmental Health Perspectives* 113, 1787-1790.
- Torres-Sánchez L, Rothenberg SJ, Schnaas L, Cebrián ME, Osorio E, Hernández MC, del Río García C, Wolff M, López Carrillo L. (2007) In utero p,p'-DDE exposure and infant neurodevelopment: a perinatal cohort in Mexico. *Environmental Health Perspectives* 115, 435-439.
- Torres-Sánchez, L, Schnaas, L, Rothenberg, SJ, Cebrián, ME, Osorio-Valencia, E, Hernández, M, García Hernández R, López-Carrillo, L. (2013) Prenatal p, p-DDE exposure and neurodevelopment among children 3.5-5 years of age. *Environmental Health Perspectives* 121, 263-268.
- Tuomela S, Lahesmaa R. (2013) Early T helper cell programming of gene expression in human. *Seminars in Immunology* 25, 282-290.
- Vera B, Santa Cruz S, Magnarelli G.. (2012) Plasma cholinesterase and carboxylesterase activities and nuclear and mitochondrial lipid composition of human placenta associated with maternal exposure to pesticides. *Reproductive Toxicology* 34, 402-407.
- Vizcaino E, Grimalt JO, Fernández-Somoano A, Tardon A. (2014) Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. *Environment International* 65, 107-115.
- Windham G, Fenster L. (2008) Environmental contaminants and pregnancy outcomes. *Fertility and Sterility* 89, e111-e116.
- Wójtowicz A K, Honkisz E, Ziêba-Przybylska D, Milewicz T, Kajta M. (2011) Effects of two isomers of DDT and their metabolite DDE on CYP1A1 and AhR function in human placental cells. *Pharmacological Reports* 63, 1460-1468.
- Wójtowicz AK, Milewicz T, Gregoraszcuk E. (2007) DDT and its metabolite DDE alter steroid hormone secretion in human term placental explants by regulation of aromatase activity. *Toxicology Letters* 173, 24-30.
- Wójtowicz AK, Milewicz T, Gregoraszcuk E. (2008) Time-dependent action of DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane) and its metabolite DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene) on human chorionic gonadotropin and progesterone secretion. *Gynecological Endocrinology* 24, 54-58.
- Zama AM, Uzumcu M, (2009) Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology* 150, 4681-4691.

LA HERENCIA Y LA TOXICIDAD INTERACCIONAN EN LAS PORFIRIAS

Palabras clave: porfirias, camino metabólico del hemo, porfirinogenicidad, modelos experimentales.
Key words: porphyrin, heme metabolic pathway, porphyria, porphyrinogenicity experimental models.

Las porfirinas están compuestas por un anillo tetrapirrólico y son conservadas en los seres vivos. Están presentes en la clorofila y el hemo. El camino de síntesis del hemo involucra ocho enzimas. Las porfirias son un grupo de enfermedades metabólicas, principalmente hereditarias, en las que hay fallas en la síntesis de hemo. Pueden clasificarse en hepáticas o eritropoyéticas; agudas o crónicas. Las agudas son susceptibles al desencadenamiento y exacerbación por drogas. La capacidad de una droga para precipitar la enfermedad, esto es, su porfirinogenicidad, depende principalmente de su capacidad para aumentar la actividad de la primera enzima del camino de biosíntesis del hemo, al inhibir su control fisiológico por retroalimentación negativa, por reducción del pool de hemo regulatorio. El citocromo P450 es importante tanto en la metabolización de drogas prescritas, como de xenobióticos tóxicos. Se describen propiedades químicas y mecanismo de acción de estas drogas: hidrofobicidad, capacidad de inducir o destruir al citocromo P450 y capacidad de unirse a receptores nucleares que median la inducción de la transcripción del gen de la 5-aminolevulínico sintasa. Respecto a las porfirias experimentales, se reseñan cinco grupos de drogas que modelan en animales, porfirias humanas y se describen sus mecanismos de toxicidad. El primero comprende aquellas drogas que inactivan al citocromo P450; el segundo, sustancias que son potentes inductores multifuncionales; el tercero, drogas que inhiben a la uroporfirinógeno descarboxilasa; el cuarto, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa y el quinto, metales pesados que inhiben metaloenzimas. Las porfirias experimentales permiten el estudio de estas enfermedades y el desarrollo de tratamientos más efectivos.

Porphyrins are conserved tetrapyrroles in living organisms. They are present in chlorophyll and heme. The metabolic heme synthesis pathway involves eight enzymes. The porphyrias are a group of mainly inherited metabolic diseases in which there are alterations on the heme synthesis pathway. They can be classified as hepatic or erythropoietic; acute or chronic. Acute porphyrias are susceptible to acute onset and exacerbation by drugs. The ability of a drug to precipitate the disease, that is, its porphyrinogenicity, depends primarily on its ability to increase 5-aminolevulinic acid synthase activity, the first enzyme of the heme biosynthetic pathway by inhibition of their physiological negative feedback control by reducing the pool of regulatory heme. The cytochrome P450 is important in the metabolism of prescription drugs, as toxic xenobiotics. Chemical properties and mechanism of action of these drugs are described: hydrophobicity, ability to induce or destroy the cytochrome P450 and ability to bind to nuclear receptors that mediate the induction of gene transcription of 5-aminolevulinic acid synthase. About the animal models for human porphyrias, five groups of drugs and their mechanisms of toxicity are reported. The first includes those drugs that inactivate cytochrome P450; second, substances that are potent multifunctional inducers; third, uroporphyrinogen decarboxylase inhibitors; fourth, protoporphyrinogen oxidase inducers, and fifth, heavy metals that are metalloenzymes inhibitors. The experimental porphyrias permit the study of these diseases, allowing the development of more effective treatments.

■ ¿QUÉ SON LAS PORFIRINAS?

Las porfirinas son tetrapirroles, macrociclos que consisten en cua-

tro anillos pirrólicos, unidos a su vez por cuatro puentes meteno (Figura 1), que se clasifican químicamente según la naturaleza y ordenamiento

de sus cadenas laterales. Estos compuestos reúnen ciertas propiedades físicas, químicas y biológicas que les conceden una gran importancia

María Florencia D'Andrea y Marta Blanca Mazzetti*

*Laboratorio de Disturbios Metabólicos por Xenobióticos, Salud Humana y Medio Ambiente, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pab. II, 4to Piso, C1428EGA Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Fax: +54 11 4576 3342.

mazzetti@qb.fcen.uba.ar

en el funcionamiento de los seres vivos. Son precursores del hemo en el reino animal y de la clorofila en el reino vegetal (Nordmann y Puy, 2002, Bonkovsky et al., 2013), por lo que son metabolitos clave en los procesos de respiración y fotosíntesis, respectivamente. Como moléculas, se caracterizan por ser conjugadas, cíclicas, aromáticas, poseer alta estabilidad y características fotofísicas particulares. (Mauzerall, 1998).

El nombre particular que recibe la porfirina depende de los distintos tipos de sustituyentes que la conforman. Por ejemplo si la molécula posee ocho sustituyentes de dos clases diferentes, como cuatro ácidos acéticos y cuatro grupos propiónicos, se llama a dicha conformación uroporfirina. Estas cadenas laterales pueden encontrarse en cuatro combinaciones posibles, alrededor de la periferia de la molécula, que se denotan para este ejemplo utilizando

los números romanos del I-IV.

Las porfirinas forman complejos con átomos metálicos como el hierro o el magnesio que influyen en la actividad biológica de los mismos, que se denominan metaloporfirinas. Las propiedades catalíticas inherentes a los metales de transición, debido a sus orbitales parcialmente llenos, se ven potenciadas cuando son quelados por las porfirinas o sus derivados (Mauzerall, 1998). De esta manera se generan pequeñas variaciones en la estructura básica del tetrapirrol que conforma la molécula, así como cambios en las cadenas sustituyentes, permitiendo gran diversidad de reacciones bioquímicas esenciales, en las que intervienen.

Dentro de las metaloporfirinas, el hemo o ferroprotoporfirina IX (Figura 2) es estructuralmente un compuesto formado por un átomo de hierro coordinado al anillo tetrapirrólico de la protoporfirina IX. Ésta molécula forma parte de la hemoglobina, permitiendo la unión reversible de oxígeno con sus grupos hemo, logrando así suministrar el O_2 necesario a los diferentes tejidos y órganos alrededor del cuerpo. La estructura proteica alrededor de los grupos hemo genera un ambiente particular que permite que se lleve a cabo la reacción que cataliza.

Otras metaloporfirinas de relevancia biológica se encuentran en los organismos fotosintetizadores. La molécula de clorofila posee magnesio como especie metálica unida a la estructura de la porfirina. La función que cumple la molécula en este caso es la de capturar protones de luz en el UV cercano (400 nm) y la región roja del espectro visible (650-700 nm). Para la cobalamina o coenzima de la vitamina B_{12} , la unión de la porfirina precursora se da con cobalto, el cual facilita la reducción de especies orgánicas en reacciones

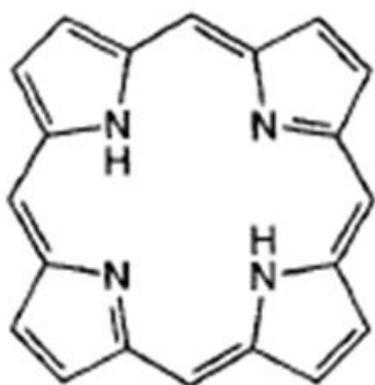


Figura 1. Macrocielo no sustituido de la molécula de porfirina. Se observan los cuatro anillos pirrólicos en los vértices de la estructura.

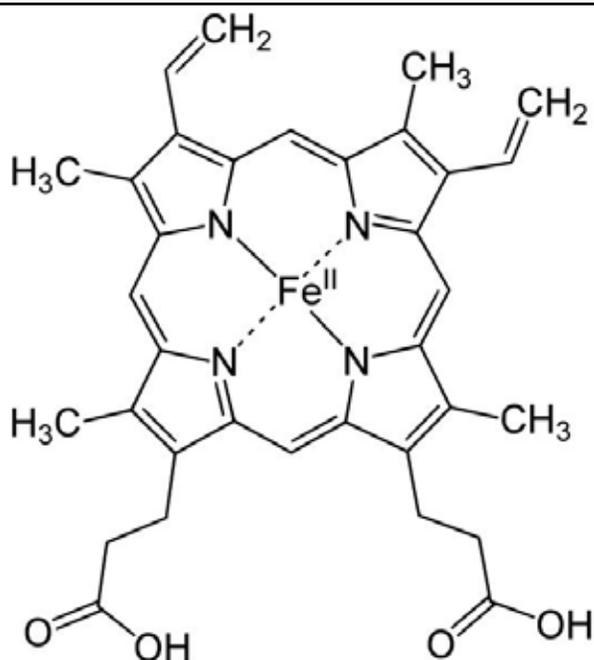


Figura 2. Estructura de la molécula de hemo.

que involucran la transferencia de átomos de hidrógeno.

El camino biosintético de las porfirinas es probablemente el camino metabólico más conservado. Con excepción de la síntesis del intermediario ácido 5-aminolevulínico (ALA), los otros pasos son semejantes tanto en bacterias primitivas como humanos (Mauzerall, 1998). Las metaloporfirinas clorofila, cobalamina y el hemo, tienen como precursor biosintético común a uroporfirinógeno III (Uro'gen III) (Figura

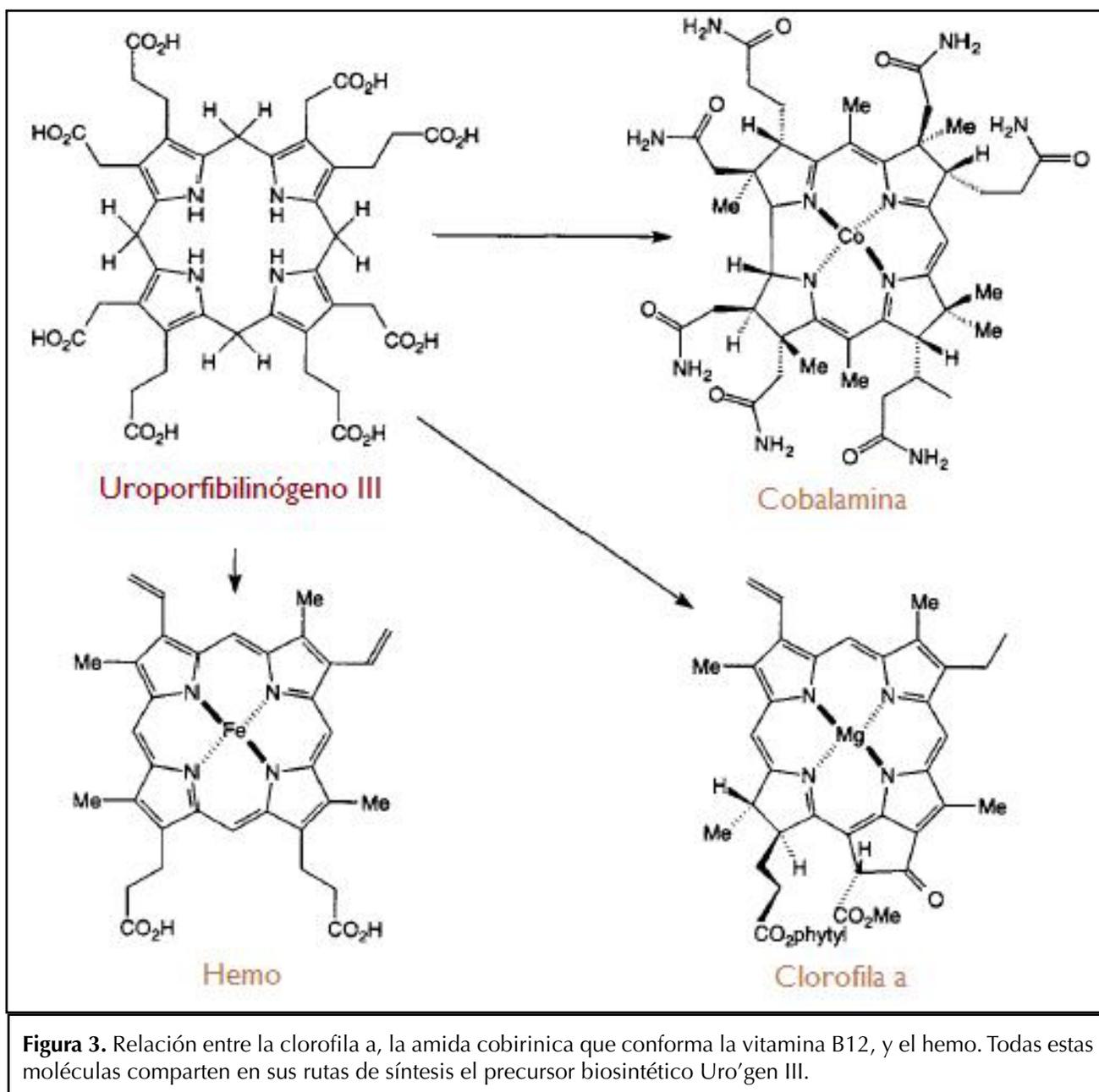
3), diferenciándose recién posteriormente los caminos de sus síntesis.

El alto grado de conservación de las porfirinas refleja la importancia de su ruta metabólica en los sistemas biológicos, considerándose a estas moléculas junto con la bicapa lipídica, las proteínas y los ácidos nucleicos como componentes clave de los seres vivos.

■ EL GRUPO HEMO

El hemo es una molécula esen-

cial para la función de todas las células aeróbicas. Ésta sirve de grupo prostético de varias hemoproteínas que juegan un papel fundamental en funciones biológicas vitales como ser unión de oxígeno (hemoglobina, mioglobina), transferencia de electrones (citocromos) y metabolismo del oxígeno (catalasas, peroxidasas y oxidasas); siendo también grupo prostético de enzimas que intervienen en la producción de moléculas señal tales como GMP cíclico (guanilato ciclasa), hormonas esteroideas (hidroxilasas) y óxido nítrico (óxido



nítrico sintasa); así como controla la expresión de numerosas proteínas (globina, enzimas de la ruta metabólica del hemo, mieloperoxidasa, hemo oxigenasa-1 y receptor de transferrina) (Tsifsoglou et al., 2006).

Las propiedades únicas del hemo le permiten actuar tanto como transportador de electrones y catalizador de reacciones redox. Si bien el Fe^{2+} se une a oxígeno, no se produce su oxidación. La combinación entre el ligando de la porfirina y el ambiente proteico cambia el potencial redox del hierro y detiene la formación de un complejo con el agua, inhibiendo la oxidación Fe^{2+} a Fe^{3+} .

El hemo se oxida a hemina *in vitro* teniendo una carga positiva residual y por lo general se aísla como cloruro. Se transforma en hematina cuando al ser disuelto en solución alcalina se adiciona un radical hidroxilo, eventualmente transformándose en hemo en la célula (Figura 4) (Sassa y Nagai, 1996; Tsiftoglou et al. 2006).

■ SÍNTESIS DEL HEMO

La biosíntesis del hemo (Figura 5) puede dividirse en cuatro procesos: i) formación del pirrol, ii) ensambla-

do del tetrapirrol, iii) modificación de las cadenas laterales del tetrapirrol, iv) oxidación del protoporfirinógeno (Proto'gen) IX a protoporfirina IX e inserción del hierro.

La síntesis de hemo involucra ocho enzimas, cuatro de las cuales son citoplasmáticas y cuatro mitocondriales. El primer paso ocurre en la mitocondria e involucra la condensación de los metabolitos succinil-CoA y el aminoácido hidrofílico glicina para formar ALA, reacción catalizada por la enzima ALA-sintasa (ALA-S). La enzima citosólica 5-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) convierte a continuación, dos moléculas de ALA en el monopirrol porfobilinógeno (PBG).

Las enzimas de los dos pasos siguientes se encargan de transformar cuatro moléculas de PBG en el tetrapirrol cíclico Uro'gen III, el cual es posteriormente descarboxilado de sus cuatro grupos acetato de las cadenas laterales permitiendo la formación de coproporfirinógeno (Copro'gen) III, menos soluble que sus precursores .

Las siguientes dos descarboxilaciones hacia grupos metilo ocurren en la mitocondria por acción de

la Copro'gen III oxidasa, siendo el Proto'gen producido posteriormente oxidado a protoporfirina debido a la remoción de átomos de hidrógeno gracias a la actividad de la enzima proto'gen III oxidasa. La inserción de un catión de hierro en la protoporfirina IX, se realiza por la acción de la enzima ferroquelatasa.

■ DEGRADACIÓN DEL HEMO Y METABOLISMO DEL HIERRO

Todas las células, salvo los eritrocitos maduros y tal vez otras células altamente diferenciadas, pueden degradar hemo.

El hemo se cataboliza a bilirrubina a través de la acción de las enzimas microsomales hemo oxigenasa (HO) y biliverdina reductasa. Si bien ha sido descrita la degradación no enzimática del hemo *in vivo*, no se considera que esta sea la principal vía de degradación (Wu y Wang, 2005).

La enzima HO abre el anillo del hemo permitiendo, mediante liberación de CO y hierro, la formación del pigmento biliverdina, que absorbe a las longitudes de onda correspondientes al verde. La biliverdina es luego reducida al pigmento ama-

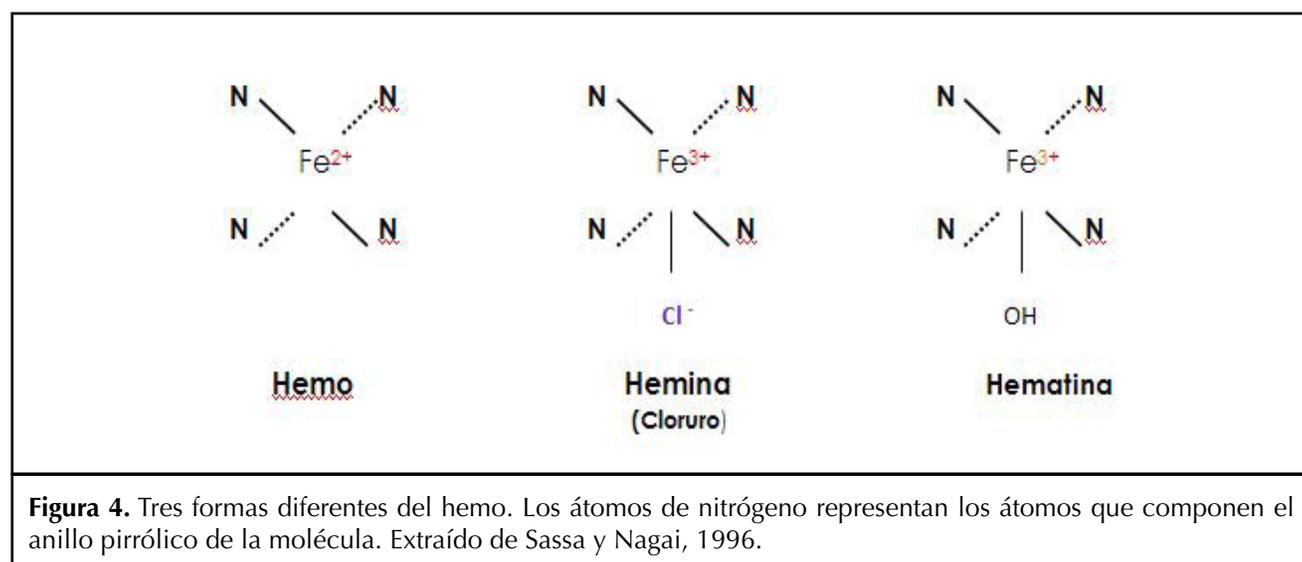


Figura 4. Tres formas diferentes del hemo. Los átomos de nitrógeno representan los átomos que componen el anillo pirrólico de la molécula. Extraído de Sassa y Nagai, 1996.

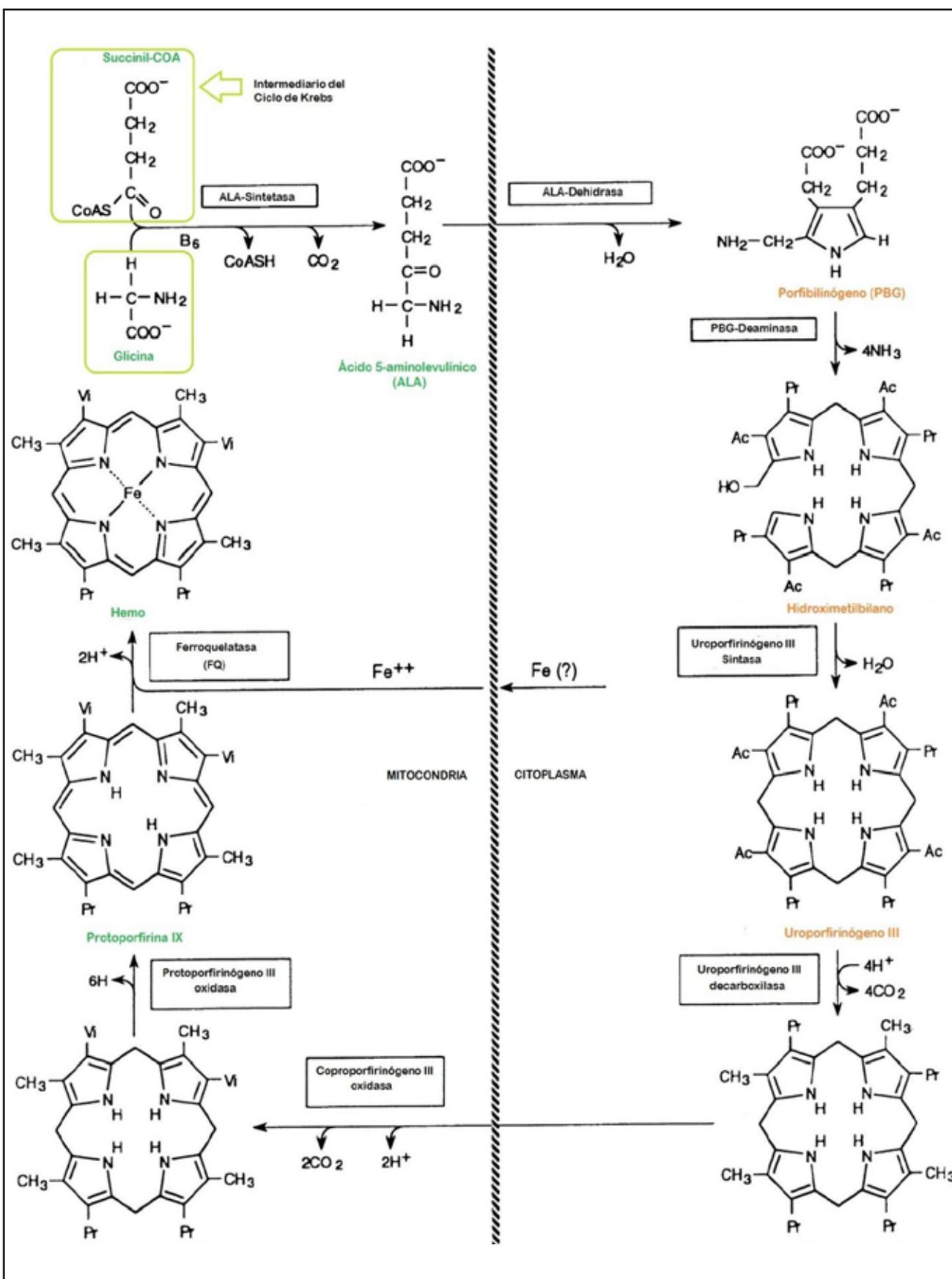
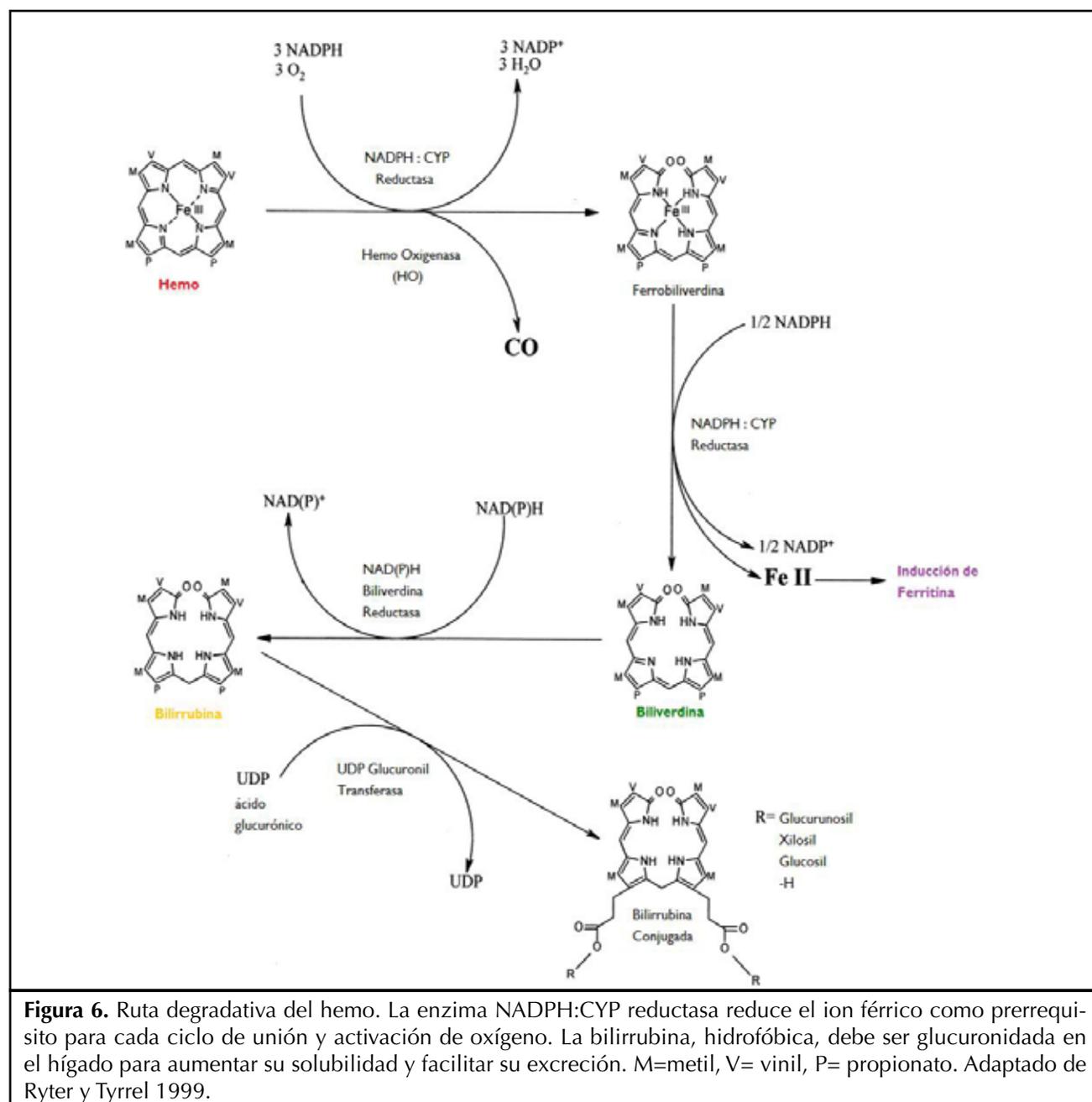


Figura 5. Ruta biosintética del hemo conformada por ocho enzimas de localización citoplasmática y mitocondrial. Modificado de Ponka et al., 1997.



rillo bilirrubina por la enzima bilirrubina reductasa (Figura 6).

El catabolismo del hemo produce la liberación de hierro, el cual, siendo un oxidante, estimula la síntesis de la proteína ferritina. La misma actúa a su vez como un repositor de hierro intracelular, secuestrando el hierro libre (Wu y Wang, 2005), que es tóxico para la célula ya que actúa en la formación de especies reactivas del oxígeno (EROS) a través de la reacción de Fenton.

■ LOCALIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL HEMO

En mamíferos, alrededor del 80% del hemo total producido es sintetizado en células eritroides inmaduras de la médula ósea y eventualmente incorporado a la hemoglobina (Norman y Puy, 2002). El hemo remanente es sintetizado predominantemente en el hígado en células nucleadas como el hepatocito, donde es incorporado a hemoproteínas, en particular al citocromo P450 (CYP)

(Podvinec et al., 2004; Hift et al., 2011), representando el 15% del total de hemo producido por el organismo (Sassa y Nagai, 1996; Norman y Puy, 2002). El 5% restante se sintetizaría en el riñón y otros tejidos (Puy et al., 2010).

A su vez, en el hígado de una rata adulta, cerca del 65% del hemo que se produce se utiliza para la formación de CYP en microsomas, 15% para síntesis de catalasa en los peroxisomas, 6% para la formación

de los citocromos mitocondriales y 8% para la formación del citocromo b₅ (Sassa y Nagai, 1996).

La velocidad de síntesis de hemo en las células eritroides en desarrollo supera en un orden de magnitud al hemo sintetizado en el hígado. Esto se debe a que si bien la mayor cantidad de hemo se sintetiza en los eritrocitos inmaduros, el número total de estos es considerablemente menor al de hepatocitos.

El hemo extracelular ingresa a la célula a través de transportadores de hemo (Wu y Wang, 2005). Siendo el hemo un quelante hidrófobo de bajo peso molecular, altas concentraciones de hemo libre en la célula podrían catalizar reacciones de oxidación dependientes de hierro generando EROS, peroxidación lipídica y disrupción de las membranas (Ryter y Tyrrell, 1999; Wu y Wang, 2005).

■ REGULACIÓN DE LA ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO SINTETASA (ALA-S).

La enzima **ALA-S** es un homodímero que reside en la matriz de la membrana mitocondrial interna y presenta una alta especificidad por la glicina como sustrato. El segundo sustrato, succinil-CoA, es un intermediario del ciclo de Krebs y provee la mayor fuente de energía para la ruta biosintética del hemo. La reacción requiere de piridoxal 5-fosfato como cofactor.

ALA-S presenta dos isoenzimas, la eritroide (ALA-S E o ALA-S 2) y la no específica o constitutiva (ALA-S N, también conocida como ALA-S1), que se expresa ubicuamente (Sassa y Nagai, 1996; Ponka, 1997). Éstas son sintetizadas a partir de genes diferentes, mapeados en el brazo corto del cromosoma 3 y el cromosoma X respectivamente (Puy et al., 2010). La expresión diferencial

de estas isoformas en los tejidos es la que determina que la regulación de la síntesis del hemo sea distinta entre células eritroides y no eritroides (Ponka, 1997).

En el hígado, la regulación de la ruta del hemo permite una respuesta rápida a los requerimientos metabólicos, mientras que en los progenitores de los eritrocitos, donde se sintetiza el hemo, la regulación permite un estado constante y elevado de síntesis dependiente de la disponibilidad de hierro.

En células eritroides, el hemo bloquea la captación de hierro por la célula, desde la proteína transferrina e induce la expresión de ALAS2 a través de un "elemento de respuesta al hierro" en la región 5'-UTR de su ARNm, así como disminuye la disponibilidad de glicina como sustrato de ALA-S. La regulación ocurre

durante la diferenciación a eritrocito en respuesta a la hormona eritropoyetina.

La velocidad de producción del hemo se encuentra entonces limitada por la disponibilidad del hierro aportado desde la transferrina y no es inhibida por hemo. Los macrófagos del hígado y el bazo degradan el hemo y lo reciclan luego de la eritrofagocitosis a través de la enzima inducible HO-1 (Puy et al., 2010).

Por otro lado, ha sido demostrado que ALA-S hepática está negativamente regulada por el producto final de la vía: el hemo (Sassa y Nagai, 1996; Norman y Puy, 2002). El efecto más relevante del hemo, en su síntesis hepática, ocurre a nivel de la inhibición de la síntesis de ALA-S1, la cual se propuso, ocurre en cuatro niveles diferentes (Figura 7): I) a nivel de expresión génica de

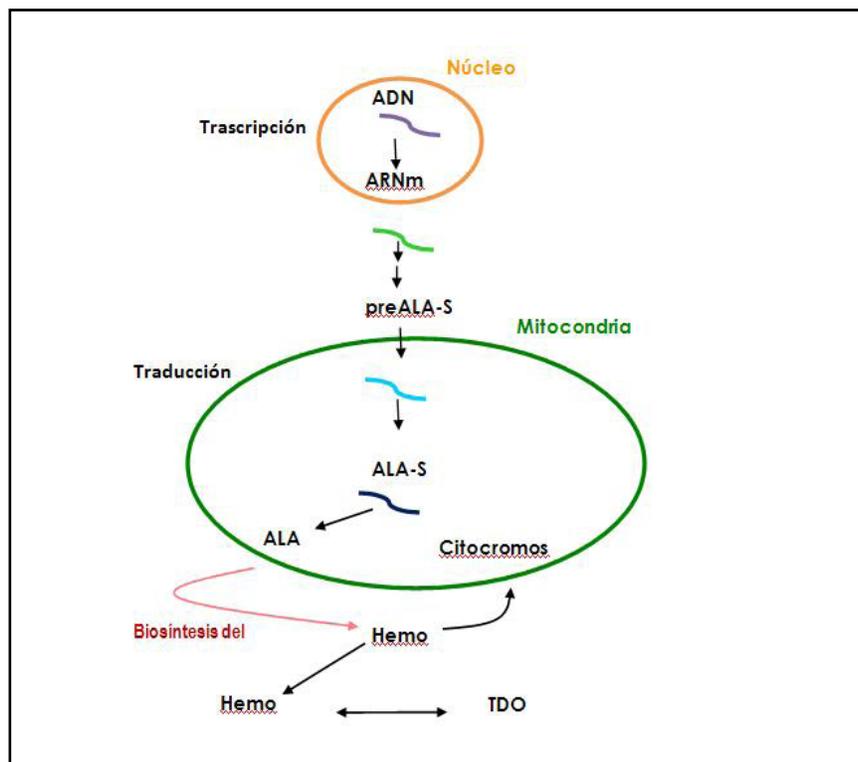


Figura 7. Niveles en los que ocurre la regulación de la enzima ALA-S. A nivel de la transcripción, mediante disminución de la vida media de su ARNm y/o evitando transferir el precursor proteico sintetizado de ALA-S a mitocondria. Triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). Adaptado de Sassa y Nagai, 1996.

ALA-S1, II) a nivel de represión post-traducciona mediante disminución de la vida media de su ARNm, III) evitando transferir el precursor proteico sintetizado a mitocondria y IV) inhibiendo la actividad catalítica de la enzima ALA-S (Sassa y Nagai, 1996). La inhibición directa de la actividad de ALA-S hepática no debería ser fisiológicamente relevante debido a que las otras clases de inhibición anteriormente mencionadas se alcanzan a concentraciones de hemo mucho menores que las necesarias para que ésta exista (Ponka, 1997), por lo cual no se considera relevante.

De hecho, la represión de ALA-S1 por hemo es responsable de que esta enzima sea la reguladora de la velocidad de síntesis en el camino biosintético del hemo hepático.

La velocidad de síntesis de hemo también responde al aumento de la demanda que ocurre frente a un cuadro de inducción de CYP por la acción deletérea de drogas sobre los CYP. En este caso los niveles del ARNm de ALAS1 son regulados positivamente para proveer de hemo a los apoCYP sintetizados *de novo*, produciendo una disminución del hemo y evitando la regulación por retroalimentación negativa sobre ALA-S1. A su vez, se ha reportado que existen *enhancers* cuya activación respondería a xenobióticos inductores e interactuarían con el receptor X de pregnano (PXR) y el receptor constitutivo androstano (CAR) teniendo un efecto inductor directamente sobre la transcripción del gen de ALA-S 1, similar al efecto observado sobre la expresión de CYP (Podvinec et al., 2004). La transcripción del gen de ALA-S 1 parece verse también regulada positivamente por el coactivador transcripcional que interactúa con los receptores llamados Activadores del Proliferador de Peroxisomas (PGC-

1 α). Este es coactivador de receptores nucleares y otros factores de transcripción, controlando la biogénesis y metabolismo oxidativo en varios tejidos, incluyendo músculo esquelético, corazón, hígado y tejido adiposo marrón (Handschin et al., 2005).

En el hígado, PGC-1 α se induce durante el ayuno, cuando éste presenta baja disponibilidad de glucosa para la obtención de energía utilizando la β -oxidación de ácidos grasos como reserva energética, bajo el control de PGC-1 α (Handschin et al., 2005). Esto explica porque la porfiria aguda intermitente (PAI) es asociada con una disminución de la energía del metabolismo hepático y desnutrición crónica (Puy et al., 2010).

Sin embargo, es de interés observar que en la inducción de ALA-S1 por drogas que ejercen un mecanismo inductor multifuncional como el fenobarbital (FB), el PGC-1 α no sería esencial para la inducción del gen de ALA-S1 (Handschin et al., 2005). Esto indicaría que el rol de PGC-1 α no podría extenderse universalmente a todos los mecanismos de inducción por drogas.

■ POOL HEPÁTICO DE HEMO LIBRE CELULAR

Se plantea hipotéticamente la existencia de un pool hepático de hemo libre, ya sea de síntesis reciente o que haya sido liberado de las hemoproteínas de las cuales formaba parte como grupo prostético. Debido a que éste se encontraría en pequeñas cantidades y sería consumido rápidamente se torna difícil de probar su existencia (Sassa y Nagai, 1996).

Este pool contiene hemo recién sintetizado y sirve como precursor de hemoproteínas y también cum-

ple funciones regulatorias. En cultivos de hepatocitos de ratas adultas, se observó que el 20% del hemo sintetizado se transformaba en pigmentos biliares directamente mientras que el 80% era empleado por la célula para la formación de las hemoproteínas. Esto parecería indicar que el hemo de los hepatocitos se forma ligeramente en exceso en relación a su requerimiento metabólico (Ponka, 1997), así como que concentraciones de hemo elevadas inducen la hemoxigenasa (HO), estimulando la ruta catabólica (Wu y Wang, 2005).

Se ha propuesto que el pool de hemo libre citosólico, en equilibrio con el hemo utilizado por la enzima de naturaleza hemoproteica triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) (Figura 7), reprimiría la formación de ALA-S e induciría a la HO-1, la enzima limitante del catabolismo del hemo (Sassa y Nagai, 1996).

■ HEMOPROTEÍNAS: CITOCROMOS P450 (CYP)

Con el término CYP se denomina a un grupo de hemoproteínas que, al combinarse en su estado reducido con monóxido de carbono (CO), forma un complejo que absorbe la luz a 450 nm. En casi todos los tejidos de mamíferos, especialmente el hígado e intestino delgado podemos encontrar CYPs, localizados en varias organelas, si bien principalmente se localizan en el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria.

Se considera a los CYPs productos de una superfamilia de genes que codifican para enzimas monooxigenasas relacionadas con el metabolismo de sustancias endógenas, drogas y otros xenobióticos. Ésta consiste en 27 familias de genes de las cuales las tres principales para el metabolismo de drogas son CYP1, CYP2, CYP3.

Los CYPs existen en diversas isoformas que exhiben polimorfismos y metabolizan la mayor parte de las drogas en humanos a diferentes tasas debido a variación genética interindividual entre ellas (Tsiftoglou et al., 2006). Un mismo sustrato puede ser metabolizado por más de una isoforma de CYP, siendo su acción sobre una amplia gama de sustratos, lo que refleja su enorme potencial detoxificante.

Muchas sustancias exógenas que ingresan al cuerpo o xenobióticos, pueden causar un marcado incremento en la cantidad de CYP en el hígado, asociado con un aumento en la síntesis del hemo en el hepatocito (Ponka et al., 1997). De esta forma, los xenobióticos deben presentar cierto grado de lipofilicidad para poder atravesar la membrana plasmática de la célula para ser metabolizados por los CYP.

El CYP presenta en su estructura un aminoácido cisteína que es clave para su coordinación con el grupo prostético hemo. El hemo interactúa de forma de alterar el estado de oxidación de ligandos específicos, como CO, NO, O₂, CN⁻ y otros que se unen directamente al hierro que conforma el complejo.

Aunque algunas de las formas de CYP muestran especificidad por un determinado sustrato, la mayoría de ellas catalizan gran número de reacciones metabólicas a la vez (Del Arco, 1997). Los CYP pueden catalizar reacciones tales como deaminación, epoxidación y desulfuración, hidroxilación y oxidación, todas necesarias para convertir los compuestos hidrofóbicos en compuestos de mayor polaridad y facilitar de esta forma su excreción.

Por su carácter de monooxigenasas, los CYPs utilizan solo una molécula de O₂, empleando un átomo

de oxígeno para la oxidación del sustrato, mientras que el otro es reducido para formar H₂O (por ello también se las denomina oxidasas mixtas), a merced de la presencia de un donante externo de electrones.

La reacción catalizada por los CYPs se caracteriza por presentar los siguientes pasos: I) adición de un sustrato a la enzima, II) donación de un electrón, III) adición de un átomo de oxígeno, y IV) donación de un segundo electrón y pérdida de agua.

Las actividades del sistema de monooxigenasas requieren de un flujo de electrones que es canalizado por la NADPH-CYP-reductasa desde el NADPH⁺ hasta un complejo formado por el sustrato o xenobiótico con CYP.

El xenobiótico en forma reducida se une, en primer lugar, al CYP oxidado (CYP-Fe³⁺). Posteriormente, el CYP es reducido por la reductasa a CYP-Fe²⁺ y el complejo CYP-Fe²⁺-xenobiótico interactúa con el O₂ para formar un complejo terciario, el oxiCYP (O₂-CYP-Fe²⁺-xenobiótico). Dicho complejo puede disociarse, dando lugar a un anión superperóxido (O₂⁻), regenerándose la hemoproteína férrica, el CYP-Fe³⁺. Además, el complejo recibe un segundo electrón para formar sucesivamente otros complejos, de modo que en definitiva un átomo de oxígeno es transferido al sustrato para oxidarlo y el otro reacciona con dos protones para formar H₂O. El sustrato oxidado queda liberado y el CYP se regenera en forma férrica.

Es importante resaltar que en este proceso de oxidación por el CYP, está involucrado también el proceso de formación de radicales libres, es decir, la liberación de productos de reducción del oxígeno que no están acoplados a sustratos de hidroxilación, como son el anión superóxido

(O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el H₂O

■ ¿QUÉ SON LAS PORFIRIAS?

Las porfirias son enfermedades metabólicas caracterizadas por un bloqueo en la síntesis del hemo y la acumulación de sus precursores (Kappas et al., 1995). Éstas son enfermedades hereditarias o adquiridas que resultan de deficiencia primaria parcial de alguna de las ocho enzimas del camino biosintético del hemo, determinando en cada caso un tipo de porfiria particular (Tabla 1) (Puy et al., 2010; Siegesmund et al., 2010). Dependiendo de los pasos deficientes en la síntesis, la acumulación de porfirinas y/o precursores se produce en los diferentes tejidos, así como su excreción en orina (Sassa, 2006).

Las porfirias se heredan con carácter autosómico dominante o autosómico recesivo. Las deficiencias enzimáticas pueden ser parciales o prácticamente totales dependiendo del tipo de mutación génica (Sassa, 2006). Existen casos documentados de herencia de mutaciones que aún encontrándose en heterocigosis pueden producir una porfiria clínicamente relevante, aunque en estos casos suelen presentarse por lo general en la vida adulta y con una severidad menor que en los casos de homocigosis (Poh-Fitzpatrick, 1998). Estudios genéticos y enzimáticos demuestran que individuos con una mutación en alguna de las enzimas de la ruta biosintética del hemo y con parientes heterocigotas con porfirias clínicamente expresadas, podrían permanecer silentes o sin síntomas asociados durante toda su vida (Sassa, 2003).

Históricamente las porfirias se han clasificado en hepáticas y eritropoyéticas, dependiendo el sitio primario de expresión de la enzima dis-

funcional prevalente (Siegesmund et al., 2010), si bien desde el punto de vista clínico, es más apropiado clasificar a las porfirias en agudas o no agudas, enfatizando de esta manera la presencia o ausencia de ataques potencialmente mortales.

Se clasificará entonces a las porfirias en: I) porfirias eritropoyéticas, II) porfirias crónicas hepáticas, ambas asociadas con fotosensibilidad cutánea como síntoma característico, y III) las porfirias hepáticas agudas que se caracterizan por sus sín-

tomas neurológicos, si bien algunas de ellas pueden presentar también fotosensibilidad (Sassa, 2006).

Las porfirias denominadas "agudas o inducibles" pueden presentar ataques agudos desencadenados por factores diversos que generan la de-represión de ALA-S (Kappas et al., 1995). Dentro de las mismas encontramos a la porfiria aguda intermitente (PAI), la porfiria variegata (PV), la coproporfiria hereditaria (CH) y la porfiria con deficiencia de ALA-dehidrasa (Hift, 2011; Puy

et al., 2010). En las PAI no se desarrollan lesiones dérmicas, las cuales aparecen en aproximadamente el 60% de los pacientes con PV (Puy et al., 2010) y raramente en pacientes con CH donde la incidencia de este síntoma ronda el 5%.

Los ataques agudos son más frecuentes en mujeres, siendo raros antes de la pubertad y después de la menopausia (Puy et al., 2010; Herrick, et al., 2005), salvo casos donde la mutación se presenta en homocigosis (Nordmann et al., 2002;

Tabla 1

Clasificación de las porfirias humanas. *En la PCT familiar ha sido reportada herencia autosómica dominante, mientras que en la PCT hepatoeritropoietica, se reportó que la herencia es autosómica recesiva. La PCT esporádica se adquiere por la exposición a xenobióticos. Extraído de Nordmann y Puy, 2002. **Recientemente se ha reportado la protoporfiria eritropoyética, ligada al cromosoma X (XLP), el defecto genético altera la actividad de ALA-S2. En la XLP se produce un aumento de la actividad de enzima ALA-S2. esto da lugar a producción de más protoporfirina para la síntesis de hemoglobina en la médula ósea (Balwani y Desnick, 2012).

Enzima deficiente	Nombre de la porfiria	Heredabilidad	Clasificación	Ataque agudo	Manifestaciones cutaneas
ALA-Dehidrasa	Porfiria por deficiencia de ALA-D (ADP)	Autosómica recesiva	Hepática	si	no
PBG deaminasa	Porfiria aguda intermitente (PAI)	Autosómica dominante	Hepática	si	no
Uroporfobilinógeno III sintasa	Porfiria Eritropoyética congénita (PEC)	Autosómica recesiva	Eritropoyética	no	Si
Uroporfobilinogeno Decarboxilasa	Porfiria cutánea tarda (PCT)	Variable*	Hepática	no	Si
Coproporfirinógeno Oxidasa	Coproporfiria hereditaria (CH)	Autosómica dominante	Hepática	si	Si
Protoporfirinógeno Oxidasa	Porfiria variegata (PV)	Autosómica dominante	Hepática	si	Si
Ferroquelatasa	Protoporfiria** Eritropoyética (PE)	Autosómica dominante	Eritropoyética	no	Si

Balwani y Desnick, 2012).

Generalmente, los síntomas de un ataque agudo pueden asociarse a la disfunción del sistema nervioso autónomo, periférico y central. Muchas personas que sufren un ataque agudo presentan severo dolor abdominal y en la zona de la espalda producto de una neuropatía autónoma con la cual se relacionan todos los síntomas iniciales. Estos se caracterizan por ser inespecíficos como náuseas, vómitos, diarrea, constipación, taquicardia, sudoración abundante, hipertensión (Puy et al., 2010; Siegesmund et al., 2010), así como fiebre, debilidad muscular y en estados más avanzados puede presentarse parálisis respiratoria y variedad de signos psiquiátricos y neurológicos (Sassa, 2006). La parálisis respiratoria puede progresar hasta el coma y la muerte, llegando la tasa de mortalidad hasta el 10%, si el paciente no se diagnostica a tiempo (Siegesmund et al., 2010).

La neuropatía porfírica es bastante menos común hoy en día, y los ataques agudos son letales en contadas ocasiones. Las manifestaciones clínicas inespecíficas indican el análisis bioquímico necesario para el correcto diagnóstico de porfiria y tratamiento.

Las porfirias que no presentan ataques agudos, dentro de su sintomatología, constituyen un grupo de enfermedades más heterogéneo. La porfiria cutánea tarda (PCT), la porfiria congénita eritropoyética (PCE) y la protoporfiria eritropoyética (PE) se caracterizan por presentar el síntoma de fotosensibilidad crónica. La PCT es el tipo de porfiria más frecuente y los pacientes que la padecen presentan manifestaciones dermatológicas y daño hepático (Puy et al., 2010), además es el único tipo de porfiria en la que se puede diferenciar una forma adquirida, que

no presenta la mutación genética característica para desarrollarse, y una forma heredada. La expresión de la forma adquirida de la enfermedad se encuentra fundamentalmente relacionada con la exposición prolongada y sostenida a diferentes sustancias. Estas, por lo general, han sido descritas como contaminantes ambientales tales como dioxinas, bifenilos policlorados, pesticidas organoclorados, que pueden producir alteraciones del camino metabólico del hemo, provocando, inhibición de la uroporfirinógeno descarboxilasa (Uro-D) hepática y porfirinurias en individuos que no presentan la mutación genética característica de la enfermedad (Cochón et al. 2005).

Por otra parte, agentes terapéuticos varios como diclofenac y ketokenazole (Sassa, 2003) se clasifican como porfirinogénicos por su potencialidad de exacerbar el cuadro porfírico. Se han generado listas de seguridad para evitar la prescripción de las mismas a pacientes con predisposición a padecer la enfermedad (Sassa, 2003; Hift et al., 2011).

Para explicar los mecanismos subyacentes al desencadenamiento de un ataque agudo, varias hipótesis se han puesto en juego.

Sassa recopiló las causas que pueden llevar al desarrollo de la sintomatología del ataque porfírico (Sassa, 2006), así enumeró: (1) exceso de PBG y ALA puede causar neurotoxicidad; (2) aumento de la concentración de ALA en el cerebro que puede inhibir la liberación de ácido gamma-amino butírico (GABA), (3) la deficiencia de hemo que se genera en el cuadro porfírico puede provocar cambios degenerativos en el sistema nervioso central; (4) la disminución de síntesis en el hígado puede resultar en una disminución en la actividad de la hemoproteína, con función catalítica TDO, provo-

cando niveles elevados de triptófano y aumento del neurotransmisor serotonina; (5) como todas las porfirias asociadas con síntomas neurovisceralas muestran elevada excreción urinaria de ALA o ALA y PBG y el ALA aumentaría los valores de peroxidación lipídica, este mecanismo podría mediar una crisis aguda de porfiria y (6) la deficiencia en TDO puede causar un descenso en los niveles de melatonina plasmáticos que puede resultar en una pérdida de protección contra la peroxidación lipídica (Sassa, 2006).

También se ha propuesto una disminución en el hemo disponible que afectaría la síntesis de citocromos involucrados en cadena respiratoria, reduciendo la subsecuente capacidad de respiración oxidativa y producción de ATP, necesario para brindar energía a procesos celulares.

■ FACTORES PRECIPITANTES DE UN ATAQUE PORFÍRICO: DROGAS PORFIRINOGENICAS.

La predisposición a sufrir un ataque agudo de porfiria se encuentra ligada a factores ambientales o adquiridos, como son el estado nutricional, la exposición a drogas porfirinogénicas, la presencia de esteroides y otros químicos tanto de origen exógeno como endógeno (Herrick y McColl., 2005; Puy et al., 2010) cuya exposición genera en el individuo porfírico un aumento sustancial en la probabilidad de desencadenar el ataque agudo (Figura 8).

Esto sugiere que existe un importante efecto exógeno en la expresión clínica del defecto génico. Investigaciones han mostrado que aproximadamente el 90% de los individuos con una deficiencia en la actividad de la enzima porfobilinógeno deaminasa nunca expresan clínicamente la enfermedad (Sassa, 2003).

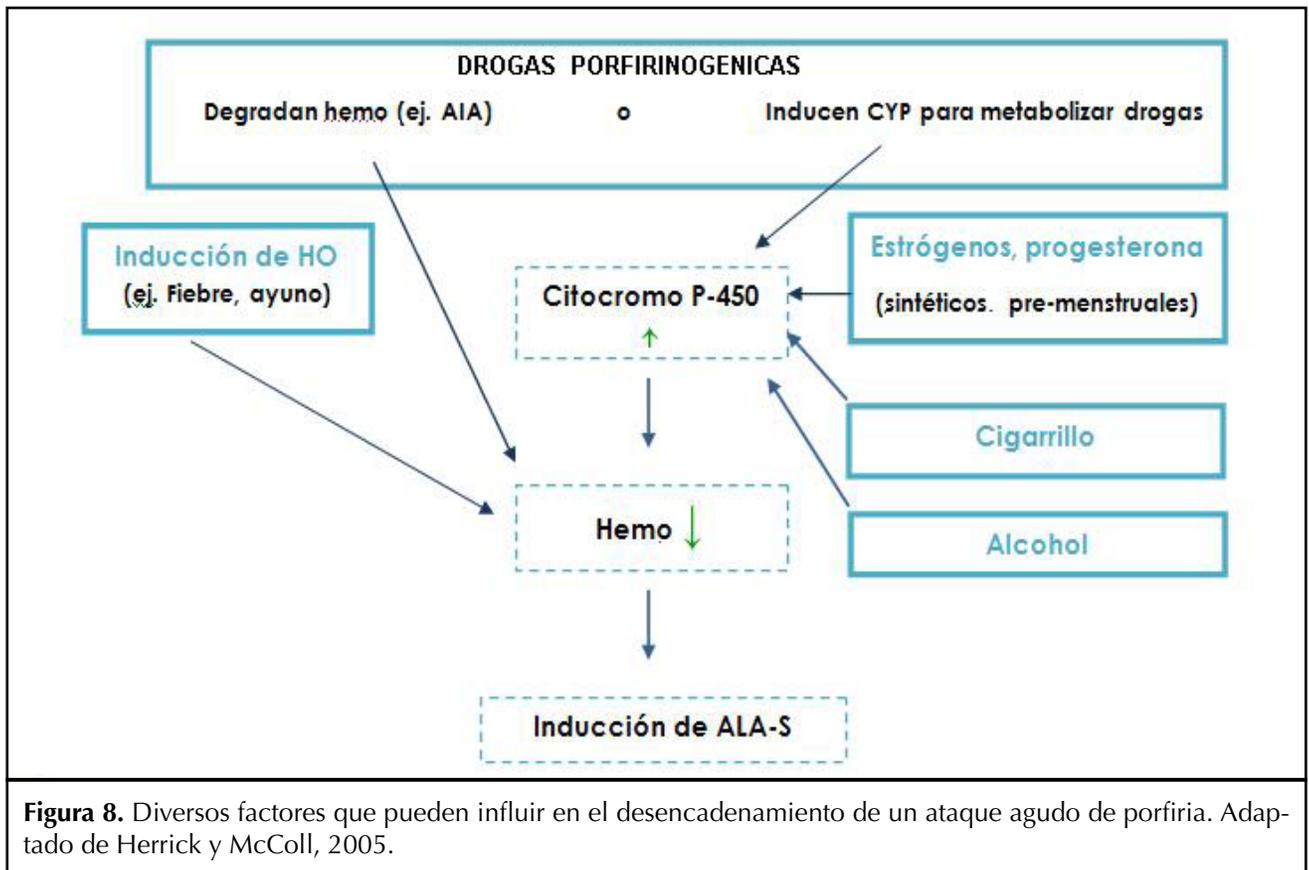


Figura 8. Diversos factores que pueden influir en el desencadenamiento de un ataque agudo de porfiria. Adaptado de Herrick y McColl, 2005.

Dentro de los factores precipitantes del ataque agudo, existe considerable evidencia de que factores endócrinos y hormonas esteroideas juegan un rol importante en desencadenar el ataque agudo de PAI (Sassa y Nagai, 1996). No es raro observar que las porfirias agudas son raramente observadas antes de la pubertad y son mayormente padecidas por mujeres, cobrando particular relevancia en la fase premenstrual.

Otro factor que se ha constatado potencia la probabilidad de sufrir un ataque de PAI, es una ingesta con bajo contenido energético que suele relacionarse con las dietas para bajar de peso. Una inadecuada ingesta de carbohidratos induce la enzima catabólica HO, que degrada el hemo e influye también en la pérdida de la represión (desrepresión) de ALA-S (Tsifoglou et al., 2006). A su vez, la transcripción de ALA-S1 también está regulada positivamente por PGC-1 α . En condiciones de baja

glucosa, PGC-1 α aumenta su producción, generando mayores niveles de ALA-S1 y generando condiciones proclives al ataque porfírico (Handschin et al., 2005).

Se ha reportado también que el alcohol inhibe algunas de las enzimas de la síntesis del hemo e induce la síntesis de CYPs, así como en pacientes fumadores se ha evidenciado una tendencia a la presencia de ataques agudos en repetidas oportunidades (Herrick y McColl, 2005; Sassa, 2006), efecto que se considera causado por la inducción de los CYPs por los hidrocarburos aromáticos policíclicos que forman parte de los componentes del tabaco (Herrick y McColl, 2005).

Entre otros factores, los ataques de porfiria suelen desencadenarse durante infecciones y aparecer de forma conjunta con otras enfermedades, al someterse a cirugías mayores y/o cuadros de estrés fisiológico.

Gran parte de estas condiciones se ha visto que afectan directamente la actividad de la enzima catabólica HO-1 (Sassa, 2006), siendo dicho mecanismo el propuesto para explicar su porfirinogenicidad.

Dentro de los desencadenantes del ataque agudo que presentan mayor variabilidad en cuanto a sus propiedades como porfirinógenos, encontramos los diversos fármacos que pueden prescribirse a los pacientes, de los que en su mayoría se carece de evidencia directa sobre su posible efecto en el paciente porfírico.

Los pacientes que presentan predisposición genética a la enfermedad pueden reaccionar de ciertas formas a la exposición a una droga porfirinogénica: con un ataque agudo, con un aumento en la excreción de porfirinas asintomático y clínicamente insignificante o no presentando ninguna reacción sintomática o bioquímicamente evidente. De he-

cho los pacientes pueden responder de forma diferente a la misma droga en distintos momentos de su administración. La variabilidad en la interacción con otras drogas así como la variación interindividual de los pacientes se vuelve algo importante a tener en cuenta para saber el efecto que va a producir la administración de la misma (Hift et al., 2011).

Más de la mitad de las drogas comúnmente prescritas son metabolizadas en el hígado por el sistema de oxidasas de función mixta, de las cuales los CYP son los miembros más importantes. Las drogas que pueden considerarse de riesgo frente a la posibilidad de desencadenar un cuadro porfírico presentan ciertas propiedades tanto químicas como mecánicas, generalmente en relación a su interacción con los CYPs. A pH fisiológico, la lipofilicidad del xenobiótico favorece el metabolismo oxidativo, por lo cual aquellas sustancias hidrofóbicas se asociarían con una afinidad mayor a las isoenzimas CYP. Dependiendo de la capacidad de la droga de inducción (o destrucción) de los CYP, que contienen hemo, muchos fármacos lipofílicos son considerados potencialmente porfirinogénicos (Thunell et al., 2007).

La exposición a drogas porfirinogénicas produce un incremento en la transcripción del gen de ALA-S1 en respuesta a un mayor requerimiento de hemo para la síntesis de CYP. En un sujeto normal, el resultado es un aumento en la producción de precursores y porfirinas que alimentan el camino biosintético de producción del hemo. En un paciente que lleva predisposición genética a una porfiria aguda, la enzima defectuosa puede volverse limitante, lo que resulta en la acumulación de porfirinas y sus precursores propiciando el ataque agudo.

Se ha reportado que el ALA-S, contiene en su gen secuencias para "xenosensores" que producen inducción de su actividad a nivel transcripcional de manera directa, a través de receptores nucleares huérfanos, que difieren en su afinidad al ligando y en los mecanismos mediante los cuales ejercen sus efectos (Podvinec et al., 2004). Paralelamente las drogas que producen este efecto inducirían los CYP para su metabolización.

En humanos, CAR y PXR median más del 50% de la mayoría de las transcripciones inducidas por xenobióticos de CYP. Algunas pocas drogas son ligando del receptor de hidrocarburos aromáticos (Ahr), el cual es prioritariamente activado por hidrocarburos policíclicos o de la familia de los receptores nucleares denominados "receptores activadores del proliferador de peroxisomas" (PPARs) (Podvinec et al., 2004; Thunell et al., 2007).

Si bien se han postulado diferentes abordajes para estimación y predicción de la capacidad porfirinogénica de drogas (Thunell et al., 2007; Hift et al., 2011) resulta imprescindible señalar su carácter predictivo. La ausencia o deficiencia en cantidad de datos básicos, para algunas drogas hace que aparezcan señaladas en las listas de indicación como "probable" y "posiblemente" segura o insegura.

■ PORFIRIAS TÓXICAS.

Las porfirias tóxicas se generan por la exposición a xenobióticos que inducen a nivel metabólico una situación de acumulación de precursores del hemo, como la que ocurre en las porfirias que presentan una base genética.

La porfiria tóxica generada en animales de experimentación con el

fin de estudiar la enfermedad se denomina porfiria experimental.

■ ANTECEDENTES DE PORFIRIAS ADQUIRIDAS.

El concepto de inducción química de la porfiria se originó a partir de 1889, cuando se comenzó a utilizar el sulfonal, trional y tetronal como sedantes, fármacos que presentan alto grado de porfirinogenicidad. Ello provocó un brote masivo de porfiria aguda, enfermedad hasta entonces desconocida. Posteriormente se desencadenaron múltiples casos semejantes y aún fatales de la enfermedad debido a la administración de barbitúricos y dosis elevadas del fármaco Sedormid, casos en los que las personas expuestas desarrollaron porfiria si bien no tenían necesariamente predisposición genética a la enfermedad.

En Turquía ocurrió un episodio masivo por el compuesto organoclorado hexaclorobenceno (HCB) que indujo cuatro mil casos de PCT por ingestión de pan realizado con harina de semillas que habían sido expuestas a este fungicida antes de ser sembradas. Más de cuatro mil individuos desarrollaron síntomas similares a los de una PCT que fueron reportados entre 1956 a 1961.

Durante los años 70 ocurrieron episodios en Estados Unidos (Michigan) y en Japón, provocados por bifenilos polihalogenados que condujeron a un cuadro porfírico de PCT en los sujetos expuestos, no siendo estas situaciones de la misma gravedad que el episodio ocurrido en Turquía con anterioridad. Cuadros semejantes se observaron en Seveso, Italia, en 1976, por la exposición a la nube tóxica de la dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD).

También se ha reportado una ex-

posición a HCB ocurrida en España, donde personas de una población en contacto con organoclorados debido a la vecindad de una fábrica de dichos compuestos, mostraron altos niveles del xenobiótico en suero, si bien no se llegó en este caso a desarrollar una PCT definida (San Martín et al., 1977; Cochón et al., 2005).

■ PORFIRIAS EXPERIMENTALES: MODELOS ANIMALES.

El empleo de drogas para generar estos modelos animales ha permitido profundizar el estudio experimental de enfermedades, tales como la diabetes y otros disturbios metabólicos. La administración de drogas puede modelar en animales, porfirias hepáticas (De Matteis, 1978; Hift et al., 2011). Así, se han modelado con diversas drogas distintos tipos de porfirias agudas y crónicas en animales utilizando agentes químicos como el HCB, 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA), 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) y la griseofulvina que mimetizan diversos tipos de porfirias agudas (Hift et al., 2011).

Los compuestos porfirinogénicos estimulan la actividad de ALA-S al disminuir la cantidad de hemo libre que puede ejercer la represión de dicha enzima. Esta disminución puede deberse a la inhibición de alguna otra enzima involucrada en la formación del hemo y/o a un aumento de los requerimientos del mismo por parte de la célula. Esta depleción del pool de hemo puede deberse a la inducción de la síntesis de hemoproteínas como, por ejemplo, de CYP en el hígado o a un aumento en la velocidad de degradación del hemo. Los químicos inductores de la síntesis del hemo en el hígado generalmente no producen aumento de la producción de hemo en células eritroides (Ponka, 1997).

La mayor parte del conocimiento

actual en porfirias proviene de estudios realizados en modelos en los que se genera un fenotipo porfírico químicamente inducido, lo que permitió testear la porfirinogenicidad de drogas tanto *in vivo* como *in vitro*. Las listas de drogas seguras para pacientes porfíricos están fuertemente influenciadas por estos resultados.

A lo largo del tiempo se han utilizado diversas drogas para modelar la porfiria. Fueron descritos modelos con diversos barbitúricos que inducían la enzima ALA-S en unas pocas horas a partir de su administración, también se sugirió que la intoxicación de ratas con DDC podía producir un modelo de porfiria adecuado y de hecho permitieron la generación de las primeras listas de seguridad de drogas (Hift et al., 2011). En estos modelos se observó acumulación de ALA y PBG en hígado y orina o aumento de ALA-S hepática como parámetros indicadores de porfiria (De Matteis, 1978).

En nuestro laboratorio se diseñó experimentalmente el modelo de HCB en ratas, bioquímicamente similar a la PCT, se estudió el mecanismo de la porfirinogenicidad *in vivo* del tóxico explicando su efecto sobre la enzima Uro-D, también se empleó este modelo para estudiar aspectos del metabolismo de lípidos y de los hidratos de carbono así como de su regulación hormonal en relación con la porfiria desarrollada (San Martín de Viale et al., 1977; Wainstok de Calmanovici et al., 1984; Mazzetti et al., 2004; Cochón et al., 2005)

Por otra parte hemos desarrollado un modelo de porfiria hepática aguda, bioquímicamente similar a las porfirias agudas humanas, por la administración conjunta de AIA y DDC a ratas, en el que se estudió el metabolismo de los hidratos de carbono y su regulación y los efec-

tos del estrés oxidativo en relación con los parámetros bioquímicos de la porfiria modelada. (Lelli et al., 2005, Matkovic et al., 2011, Faut et al., 2013).

Recientemente ha comenzado a utilizarse el oxadiazón, un herbicida que presenta una estructura de difenil éter que inhibe Proto'gen oxidasa, para probar en ese modelo la porfirinogenicidad de nuevas drogas antiepilépticas.

El uso de modelos por suministro de drogas como antihipertensivos y psicotrópicos en cultivos celulares de hígado de embriones de pollo también ha sido utilizado para medir la actividad de ALA-S, porfirinas y concentraciones de hemo libre (Hift et al. 2011).

■ ¿CUÁLES SON LOS MECANISMOS DE PORFIRINOGENICIDAD?

A continuación se describen los mecanismos por los cuales las drogas pueden desencadenar un cuadro porfírico.

Inactivación de CYP

Varios xenobióticos son metabolizadas por los CYP a intermediarios reactivos que inhiben a los mismos CYP de forma irreversible o cuasi-irreversible (Marks et al., 1988; Hift et al., 2011). Es decir, la droga es sustrato e inhibidor de la enzima que lo metaboliza.

La interacción de la droga con CYP deriva en la formación de EROS que promueven la destrucción del CYP. El hemo liberado se destruye metabolizándose como bilirrubina, hierro y CO. Esto resulta en la reducción del pool de hemo libre intracelular el cual, disminuido por la creciente demanda de hemo para la síntesis de nuevos CYP, produce una situación de depleción del pool

de hemo que desreprime el ALA-S hepática, propiciando su inducción (Thunell et al., 2007; Hift et al., 2011). La destrucción y eliminación del grupo hemo constituyente de los CYPs es acompañado así por la disminución del pool de hemo regulatorio del hepatocito, lo que produce una aceleración compensatoria de la síntesis del hemo.

Este mecanismo ha sido descrito para compuestos como secobarbital, AIA, isoniazida, progesterona, así como compuestos del tipo de las dihidropiridinas y dihidroquinolonas

Se describe en particular el mecanismo de las dihidropiridinas, dentro de las cuales se encuentra el DDC. Se ha reportado que la administración de 3,5-dietoxicarbonil-1,4 dihidro-2,4,6-trimetilpiridina o 3,5-dietoxicarbonil 1,4-dihidrocolidina (DDC) produce un aumento de la actividad de ALA-S y la acumulación de protoporfirina IX por inhibición de la enzima ferroquelatasa. Esta disminución de la actividad de la enzima no fue observada en estudios *in vitro*, debido a que la acción inhibitoria del DDC ocurría a través del metabolito N-metil protoporfirina IX. Se propuso que la interacción del DDC con el hemo del sitio activo del CYP era la responsable de la formación de este intermediario (Marks, et al., 1988).

En efecto esa misma N-metil protoporfirina es la que actúa como poderoso inhibidor a nivel de la ferroquelatasa, la enzima terminal de su síntesis (Marks et al. 1988). Como consecuencia, hay inducción de ALA-S y acumulación y excreción en exceso de protoporfirina, así como también de otros precursores (Marks et al., 1988). Se produce así, en animales expuestos a DDC, una porfiria semejante a la PV.

■ INDUCCIÓN MULTIFUNCIONAL.

Algunas sustancias son potentes inductores de enzimas hepáticas microsomales, como CYP y glucuroniltransferasas (Hift et al. 2011). Como estas actúan en más de un sistema, se los denomina inductores multifuncionales. Entre esas sustancias las drogas mejor estudiadas son las drogas antiepilépticas clásicas como el FB, fenitoína, carbamazepina y primidona. Su porfinogenicidad se explica por la transcripción masiva del gen de ALA-S1 en conjunto con la inducción de varias subclases de CYP (Thunell et al. 2007). También enzimas que forman parte de caminos metabólicos fisiológicos, como Acil-CoA oxidasa, Dopa-decarboxilasa y glutatión-S-transferasas se verían inducidas con FB (Hamadeh et al. 2002)

■ INHIBICIÓN DE UROPORFIRINÓGENO DESCARBOXILASA (URO-D)

Para explicar el mecanismo por el cual el HCB y otros polihalogenuros aromáticos (incluyendo las dioxinas) inhiben la enzima Uro-D se sugiere que estos son ligandos del receptor Ahr que se plantea tendría un rol fundamental en este mecanismo. CYP1A2 es un producto génico regulado por este receptor que parece jugar un papel central en el desarrollo de la uroporfiria en ratones (Marks et al., 1988; Hift et al., 2011). En algunos modelos en roedores, la sobrecarga de hierro es necesaria para producir uroporfiria sugiriendo su parecido al modelo humano (Smith y Elder, 2010).

■ INHIBICIÓN COMPETITIVA DE PROPORFIRINÓGENO OXIDASA (PROTO-OX).

Un numero de agentes herbicidas que incluyen el acifluorfen, oxi-

fluorfen, oxadiazón y fomesafen son inhibidores competitivos de Proto-Ox, la enzima cuya actividad se ve disminuida en la porfiria variegata (Hift et al. 2011)

■ ACCIÓN DE METALES PESADOS.

ALA-D es una enzima que contiene grupos sulfhidrilo y requiere de iones zinc para su actividad. Varios metales como el mercurio y el plomo modifican su actividad ya sea por oxidación de sus grupos sulfhidrilo o compitiendo con el zinc por su incorporación.

La ferroquelatasa, enzima que se encarga de insertar el hierro en la molécula de protoporfirina IX, puede unirse con otros metales divalentes como zinc y níquel, mientras que plomo, manganeso, mercurio y cadmio la inhiben competitivamente (Hift et al. 2011).

■ OTROS MODELOS UTILIZADOS PARA MODELAR PORFIRIAS.

Algunos investigadores han utilizado cepas genéticamente modificadas en las cuales la porfiria es reproducida por una manipulación puntual en el gen de alguna de las enzimas de la síntesis del hemo. Un modelo en ratones que mimetiza una PAI se produjo por una disrupción parcial del gen que codifica para PBG deaminasa. Estos ratones demostraron un aumento en la actividad de ALA-S1 y la excreción urinaria de ALA y PBG aumentadas, aunque para presentar un aumento en la inducción de ALA-S debieron ser además intoxicados con FB.

Si bien estos modelos mimetizan correctamente a una porfiria, resultó necesaria la estimulación con FB o alguna droga porfirinogénica para que la porfiria se exprese bioquímicamente, como suele ocurrir con los pacientes portadores de alguna mu-

tación génica sobre la ruta de síntesis del hemo. Esto demuestra que presentar propensión genética de la enfermedad no es suficiente para explicar el desencadenamiento del ataque agudo (Hift et al. 2011).

Si bien se pensó que estos modelos donde se emplean ratones knock out iban a introducir avances en lo que respecta a la evaluación de la porfirinogenicidad de fármacos, se ha considerado que los mismos no pueden brindar mayor información que los modelos por inducción química debido a que la variabilidad inter-especie e inter-individual sigue sin ser explicada en estos modelos.

Las porfirias experimentales generadas en roedores permiten el estudio de los mecanismos, la fisiopatología y rasgos tanto clínicos como bioquímicos de estas enfermedades, permitiendo dilucidar variables metabólicas que puedan alterar el desarrollo de la sintomatología y lograr tratamientos más efectivos para estas patologías.

■ ABREVIATURAS.

Ahr, receptor de hidrocarburos aromáticos; AIA, 2-alil-2-isopropilacetamida; ALA, ácido 5-aminolevulínico; ALA-D 5-aminolevulínico-dehidrasa; ALA-S, ácido 5-aminolevulínico sintasa; ALA-S1, ALA-S N, 5-aminolevulínico sintasa1 (*forma no específica o constitutiva*); ALA-S2, ALA-S E, ácido 5-aminolevulínico sintasa-2 (*forma eritroide*); CH, coproporfirina hereditaria; CN⁻, cianuro; CO, monóxido de carbono; Copro'gen, coproporfirinógeno; CYP, citocromo P450; DDC, 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina; EROS, especies reactivas del oxígeno; FB, fenobarbital; GABA, ácido gamma-amino butírico; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; HCB, hexaclorobenceno; HO, hemo oxigenasa; NO, monóxido de nitrógeno; O₂,

oxígeno molecular; O₂^{•-}, anión superóxido; PAI, porfiria aguda intermitente; PBG, porfobilinógeno; PCE, porfiria congénita eritropoyética; PCT, porfiria cutánea tarda; PE, protoporfirina eritropoyética (PE); PGC-1 α , coactivador transcripcional que interacciona con los receptores activadores del proliferador de peroxisomas; PPARs, receptores activadores del proliferador de peroxisomas; Proto'gen, protoporfirinógeno; PV, porfiria variegata; RE, retículo endoplásmico; TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; TDO, Triptófano 2,3-dioxigenasa; Uro'gen III, uroporfirinógeno III.

■ GLOSARIO

autosómico dominante: uno de los patrones de herencia clásicos o mendelianos que se caracteriza por presentar el fenómeno de dominancia genética para un determinado alelo de un gen cuyo locus se encuentra ubicado en alguno de los cromosomas no determinantes del sexo. Es decir, que por este mecanismo una determinada característica heredable se transmite en una forma que puede ser predicha sin tener en consideración el sexo del descendiente. Además para que esta característica heredable se exprese basta con que el descendiente reciba el gen de uno solo de sus progenitores.

autosómico recesivo: uno de los patrones de herencia clásicos o mendelianos y se caracteriza por no presentar el fenómeno de dominancia genética. En este patrón de herencia el fenotipo que caracteriza al alelo recesivo se encuentra codificado un gen cuyo locus se encuentra ubicado en alguno de los cromosomas no determinantes del sexo. Este alelo recesivo no se manifiesta si se encuentra acompañado por un alelo dominante. Es decir, que por este mecanismo una determinada característica heredable se transmite en

una forma que puede ser predicha sin tener en consideración el sexo del descendiente. Además para que esta característica heredable se exprese es necesario que el descendiente reciba el gen de ambos progenitores.

catalasa: enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua.

citocromo P450: enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas.

coactivador transcripcional que interacciona con los receptores activadores del proliferador de peroxisomas (PGC-1 α): regulador de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo oxidativo. Interacciona con los receptores llamados Activadores del Proliferador de Peroxisomas (PPAR).

cromosoma X: uno de los cromosomas sexuales, del ser humano y otros mamíferos, este cromosoma esta presente tanto en individuos hembras como machos. En los seres humanos está situado en el llamado par 23. Cuando en el par 23 se da XX el sexo del individuo es cromosómicamente llamado hembra. En caso de que sea XY el sexo del individuo será cromosómicamente macho.

endocitosis mediada por receptor: forma de endocitosis, que difiere de la fagocitosis o la pinocitosis en varios aspectos: 1. permite a las células tomar macromoléculas específicas llamadas ligandos, tales como proteínas que ligan la insulina (una

hormona), transferrina (una proteína que se liga al hierro) o portadores de colesterol y lipoproteínas de baja densidad y 2. requiere de receptores de membrana específicos, para reconocer un ligando particular y unirse a él.

enhancer ("potenciador") o amplificador: en genética, corta región del ADN eucariota que puede unirse con proteínas (factores de transcripción) para aumentar los niveles de transcripción de genes en un grupo de genes. Un enhancer no tiene por qué estar localizado cerca de los genes sobre los que actúa, ni siquiera en el mismo cromosoma.

eritropoyetina: hormona que estimula la formación de eritrocitos y es el principal agente estimulador de la eritropoyesis natural. En los seres humanos, es producida principalmente por el riñón en las células intersticiales peritubulares, células mesangiales (del 85 al 90 %), el resto en el hígado y glándulas salivales (del 10 al 15 %).

especies reactivas del oxígeno (EROs o ROS por reactive oxygen species): incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. Esto lleva en una situación conocida como estrés oxidativo.

grupo prostético: componente no aminoacídico que forma parte de

la estructura de algunas proteínas y que se halla fuertemente unido al resto de la molécula.

guanilato ciclasa: (también conocida como guanil ciclasa) cataliza la síntesis de GMPc desde GTP

guanosín monofosfato cíclico, GMPc o GMP cíclico: derivado cíclico del nucleótido trifosfato GTP, generado por mediación de la enzima guanilato ciclasa también conocida como guanil ciclasa e implicado como segundo mensajero en las rutas de transducción de la señal celular.

heterocigosis: condición de heterocigota. Heterocigota es, en genética, un individuo diploide que para un gen dado, tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo en el mismo locus (se expresa, por ej.: Aa), que posee dos formas diferentes de un gen en particular; cada una heredada de cada uno de los progenitores.

homocigosis: condición de homocigota. Homocigota es, en genética un individuo diploide que para un gen dado, tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo en el mismo locus que posee formas iguales de un gen en particular. Para nombrarlos se utilizan letras mayúsculas y minúsculas; así se dice que AA es Homocigota Dominante y aa es Homocigota Recesivo.

hormona esteroide: es un esteroide que actúa como una hormona. Las hormonas esteroides pueden ser agrupadas en cinco grupos según el receptor al que se unen: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos y progestágenos.

isoenzimas o isozimas: son enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos, pero que catalizan la misma reacción química.

mieloperoxidasa: enzima presente en los neutrófilos y monocitos. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de organismos. Cataliza la producción de ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso, y otros intermediarios tóxicos que aumentan poderosamente la actividad microbicida ($\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$).

monooxigenasas: enzimas que incorporan un grupo hidroxilo en sustratos en muchas rutas metabólicas. En esta reacción, dos átomos de oxígeno son reducidos a un grupo hidroxilo y a una molécula H_2O por la oxidación concomitante de la NAD(P)H.

óxido nítrico sintasa: (sigla en inglés NOS): es una oxidoreductasa (ya que tiene un dominio oxidasa y un dominio reductasa) responsable de la síntesis de óxido nítrico (ON, siglas en español, y NO, siglas en inglés) a partir del átomo terminal de nitrógeno de la L-arginina en presencia de NADPH (nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido) y oxígeno molecular (O_2).

peroxidación lipídica o lipoperoxidación: hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares.

ratón knockout o ratón KO: ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados mediante una técnica llamada *gene knockout*.

reacción de Fenton: (llamada así por su descubridor en 1894, H.J.H. Fenton): es la que se produce al catalizar el peróxido de hidrógeno con metales de transición, generalmente hierro, dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos del hidroxilo ($\text{OH}\cdot$).

receptor X de pregnano (PXR): también conocido como NR112 (de sus siglas en inglés “nuclear receptor subfamily 1, group 1, member 2”), factor de transcripción de la familia de los receptores nucleares codificado en humanos, cuya función primaria consiste en detectar la presencia de sustancias tóxicas o extrañas en la célula y, en respuesta, activar la expresión de proteínas encargadas de la detoxificación y eliminación de dichas sustancias.

receptor constitutivo de androstano (CAR): receptor nuclear que parece funcionar como sensor de xenobióticos que activan la expresión de las enzimas del citocromo P450 implicadas en el metabolismo de dichos xenobióticos.

retículo endoplásmico: complejo sistema de membranas dispuestas en forma de sacos aplanados y túbulos que están interconectados entre sí compartiendo el mismo espacio interno.

retroalimentación negativa o regulación por feedback negativo: tipo de regulación enzimática a nivel de cantidad o actividad de la enzima. Esta inhibición se observa cuando el producto final inhibe la enzima del primer paso (u otro paso clave) de esa secuencia.

transferrina: proteína transportadora específica del hierro en el plasma.

UTR (del inglés untranslated region o bien untranslated trailer): regiones no traducidas de los genes. Se habla generalmente de un **5'-UTR** y de un **3'-UTR**, que son las dos partes no traducidas de cada gen, debido a que se encuentran colindando el marco abierto de lectura (u ORF).

Xenobiótico: deriva del griego *xeno* ('extraño') y *bio* ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química

en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio.

■ BIBLIOGRAFÍA.

Balwani M., Desnick R.J. (2012) The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood* 2012 120, 4496-45504.

Bonkovsky H.L., Guo J-Y., Hou W., Li T., Narang T., Thapar M. (2013) Porphyrin and Heme Metabolism and the Porphyrias. *Comprehensive Physiology* 3, 365-401.

Cochón A.C., Mazzetti M.B., San Martín de Viale L.C. (2005) Hexachlorobenzene impacts biochemistry. *Recent studies in several tissues. Trends in Cell and Molecular Biology* 1, 15-34.

De Matteis F. (1978) Drugs and hepatic porphyrias. *Clinics in Hematology* 9, 309-42.

Faut M., Paiz A., San Martín de Viale L.C., Mazzetti M.B. (2013) Alterations of the redox state, pentose pathway and glutathione metabolism in an acute porphyria model. Their impact on heme pathway. *Experimental Biology and Medicine* 258, 133-143.

Hamadeh H.K., Bushel P.R., Jayadev S., Martin K., DiSorbo O., Sieber S., Bennett L., Tennant R., Stoll R., Barrett J.C., Blanchard K., Paules R.S., Afshari C.A. (2002) Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicological Sciences* 67, 219-231.

Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer A-K., Chin S., Wu P-S., Meyer U.A., Spiegelman B.M. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . *Cell* 122, 505-

515.

Herrick A.L., McColl K.E. (2005) Acute intermittent Porphyria. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 19: 235-249.

Hift R.J., Thunell S., Brun A. (2011). Drugs to porphyria: From observation to a modern algorithm-based system for the prediction of porphyrinogenicity. *Pharmacology and Therapeutics* 132, 158-169.

Kappas A., Sassa S., Galbraith R.A., Nordmann Y. (1995) The porphyrias. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wibgaarden JB, Fredrickson DS, editors. *Metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill, 2103-2159.

Lelli S.M., San Martín de Viale L.C., Mazzetti, M.B. (2005) Response of glucose metabolism enzymes to porphyrinogenic drugs that induce an acute porphyria model. Role of reactive oxygen species. *Toxicology* 216, 49-58.

Marks, G.S., McCluskey, S.A., Mackie, J.E., Riddick, D.S., James, C.A., (1988). Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P-450. *The FASEB Journal* 2, 2774-2783.

Matkovic L.B., D'Andrea F., Fornes D., San Martín de Viale L.C., Mazzetti M.B. (2011) How porphyrinogenic drugs modeling acute porphyria impair the hormonal status that regulates glucose metabolism. Their relevance in the onset of this disease. *Toxicology* 290, 22-30.

Mauzerall D.C. (1998) Evolution of Porphyrins. *Clinics in Dermatology* 16, 195-201.

- Mazzetti, M.B., Taira, M.C., Lelli, S.M., Dascal, E., Basabe, J.C., San Martín de Viale, L.C. (2004) Hexachlorobenzene impairs glucose metabolism in a rat model of porphyria cutanea tarda: a mechanistic approach". *Archives of Toxicology* 78, 25-33.
- Nordmann Y., Puy H. (2002) Human hereditary hepatic porphyrias. *Clinica Chimica Acta.* 325, 17-37.
- Podvinec M., Handschin C., Looser R., Meyer U.A. (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 9127- 9132.
- Poh-Fitzpatrick M.B. (1998) Clinical features of the porphyrias *Clinics in Dermatology* 16, 251-264.
- Ponka P. N. (1997) Tissue-Specific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood* 1, 1-25.
- Puy H., Gouya L., Deybach J.C. (2010) Porphyrias. *Lancet* 375, 924-937.
- Ryter S.W., Tyrrel R.M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme Oxygenase has Both Pro- and Antioxidant Properties. *Free Radical Biology & Medicine* 28, 289 -309.
- San Martín de Viale L.C., Ríos de Molina M.C., de Calmanovici R.W., Tomio J.M. (1977) Porphyrins and porphyrinogen carboxylase in hexachlorobenzene-induced porphyria. *Biochemical Journal* 168, 393- 400.
- Sassa S. (2003) Gene-Environmental Interactions: Lessons from Porphyria. *Environmental Health and Preventive Medicine* 7, 254-263.
- Sassa S. (2006) Modern diagnosis and management of the porphyrias. *British Journal of Haematology* 135, 281-292.
- Sassa S., Nagai T. (1996) The role of heme in gene expression. *International Journal of Hematology* 63, 167-178.
- Siegesmund M., van Tuyl A.M., van Serooskerken A.M., Poblete-Gutiérrez P., Frank J. (2010) The acute hepatic porphyrias: Current status and future challenges. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24, 593- 605.
- Smith, A. G., Elder, G. H. (2010). Complex gene-chemical interactions: hepatic uroporphyrin as a paradigm. *Chemical Research in Toxicology* 23, 712-723.
- Thunell S., Pomp E., Brun A. (2007) Guide to drug porphyrinogenicity prediction and drug prescription in the acute porphyrias. *British Journal of Clinical Pharmacology* 64, 668-679.
- Tsiftoglou A.S., Tsamadou, A.I., Papadopoulou L.C. (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 327-345
- Wainstok de Calmanovici R., Ríos de Molina M.C., Taira de Yamamoto C., Tomio M.J., San Martín de Viale, L.C. (1984) Mechanism of hexachlorobenzene-induced porphyria in rats. Effect of phenobarbitone pretreatment. *Biochemical Journal* 218, 753-763.
- Wu L., Wang R. (2005) Carbon Monoxide: Endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews* 57, 585-630.

EL MERCURIO COMO AGENTE INDUCTOR DE DAÑO RENAL

Palabras clave: riñón, mercurio, transportadores de aniones orgánicos.
Key words: kidney, mercury, organic anion transporters.

El mercurio es un conocido contaminante ambiental que causa efectos deletéreos en la salud humana. Las exposiciones que conducen al daño de la salud se originan de muchas fuentes como por ejemplo la exposición ocupacional no intencional, la incorporación al organismo por medio de las amalgamas dentales, la comida y por su presencia como agente preservante de vacunas. A fin de desarrollar mejores estrategias farmacológicas para el tratamiento de individuos intoxicados y expuestos, es importante conocer como las diferentes especies químicas de este metal llegan y afectan los órganos blancos. El mercurio se acumula y ocasiona efectos tóxicos en cerebro, riñón, intestino, hígado y placenta. En los riñones la acumulación de mercurio produce insuficiencia renal aguda. Estudios recientes han demostrado que la actividad de transportadores de membrana, principalmente de los transportadores de aniones orgánicos 1 y 3 (Oat1 y Oat3) y de la proteína de resistencia a multidrogas 2 (Mrp2) determinan los niveles de acumulación del mercurio en riñón. En este artículo se describen también algunos resultados obtenidos en nuestro laboratorio, como por ejemplo los efectos de la exposición del mercurio sobre la expresión y función de Oat1, Oat3 y Mrp2 en el riñón, las posibles implicancias de la modulación de la expresión y función de estos transportadores en la farmacoterapéutica de las intoxicaciones con mercurio y la validación de la excreción urinaria del transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) como biomarcador temprano de la nefrotoxicidad inducida por mercurio.

Adriana Mónica Torres

Directora Académica Área Farmacología-Investigadora Principal CONICET.
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario.
Suipacha 590-S2002LRK Rosario.

admotorres@yahoo.com.ar

Mercury is a prominent environmental contaminant that causes detrimental effects to human health. The exposure leading to health hazards are originated from many sources including: unintentional occupational exposure, body incorporation of Hg as an ingredient in amalgam fillings, food and as a preservative in vaccines. In order to develop better pharmacological strategies for the treatment of intoxicated and exposed people, it is relevant to understand how the diverse chemical species of this metal arrive and affect the target organs. Mercury accumulates in brain, kidney, intestine, liver and placenta producing toxic effects. In the kidneys, mercury accumulation produces acute kidney injury. Recent studies have demonstrated that the activity of membrane transporters, mainly organic anion transporters 1 and 3 (Oat1 and Oat3) and the multidrug resistance protein 2 (Mrp2), determines the accumulation levels of mercury in the kidney. In this article are also described some results obtained in our laboratory, such as the effects of acute mercury exposition on the expression and function of Oat1, Oat3 and Mrp2 in the kidney, the possible implications of the modulation in the expression and function of these transporters in the pharmacotherapeutics of mercuric intoxications and the validation of urinary excretion of the organic anion transporter 5 (Oat5) as an early biomarker of mercury induced nephrotoxicity.

FUENTES Y ESPECIES QUÍMICAS DE MERCURIO.

El mercurio es un metal pesado que ha sido usado con fines médicos y comerciales durante siglos. Este metal causa efectos deletéreos para la salud humana, es ubicuo en el medio ambiente global de donde nunca desaparece asegurando que la contaminación del presente será un problema para las futuras generaciones. Este metal deriva de fuentes

naturales (erupciones volcánicas y erosiones de minerales que contienen mercurio) y de fuentes antropogénicas como los procesos industriales. El mercurio se emplea para la fabricación de lámparas, termómetros, barómetros, amalgamas dentales, baterías, etc. Su uso en pinturas, pesticidas, conservadores de semillas, cosméticos y vacunas ha sido restringido sólo en algunos países. La centrales térmicas de carbón y los pequeños emprendimientos mi-

neros dedicados a la extracción de oro con mercurio en Latinoamérica son también importantes fuentes contaminantes de mercurio (Clarkson y Cols, 2003; Counter y Buchanan, 2004, Zalups, 2000). La extracción de oro con mercurio y posterior calentamiento de la amalgama para eliminar el mercurio es una técnica que aún se usa en algunos países no desarrollados.

En nuestro país se han identifi-

cado diferentes niveles de contaminación con mercurio en compartimientos abióticos (sedimentos de superficie, partículas en suspensión) y biológicos (peces, cangrejos, líquenes y algas), en la laguna de Mar Chiquita, en el estuario de Bahía Blanca, en el estuario del Río de La Plata y en el alto valle del Río Negro (Arribére y Cols, 2003; Marcovecchio, 2004; De Marco y Cols, 2006).

Como consecuencia de que el riesgo de exposición de los seres humanos al mercurio se incrementa, resulta de relevancia para los investigadores conocer como las varias formas químicas de este metal llegan y afectan los tejidos y órganos blancos de manera de que se puedan desarrollar estrategias farmacológicas más eficaces para el tratamiento de

individuos intoxicados o expuestos.

El mercurio (Hg) existe en tres especies: mercurio elemental (mercurio metálico, Hg^0), compuestos de mercurio inorgánico (principalmente cloruro mercúrico, HgCl_2) y compuestos de mercurio orgánico (principalmente metilmercurio, CH_3Hg^+ y etilmercurio, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$).

La contaminación de la población con Hg^0 se produce fundamentalmente por su presencia en termómetros, en amalgamas dentales, en cosméticos, en rituales de algunas sectas religiosas y en conmutadores de mercurio presentes en zapatillas luminosas para niños (Clarkson y Cols, 2003; Counter y Buchanan, 2004) (Ver Figura 1).

Las sales mercúricas tienen aún muy diversas aplicaciones en la industria y la descarga de residuos industriales en ríos ha introducido al mercurio en el entorno de diversas zonas del mundo. El pescado y los mamíferos marinos constituyen la principal fuente de CH_3Hg^+ . El $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ en la forma de timersal ha sido usado como antiséptico tópico y su empleo como agente preservante en vacunas dadas rutinariamente a niños aún se emplea en algunos países (Clarkson y Cols, 2003; Counter y Buchanan, 2004, Zalups, 2000).

■ FARMACOCINÉTICA DEL MERCURIO.

El Hg^0 , CH_3Hg^+ y $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ ocasionan toxicidad a nivel de siste-

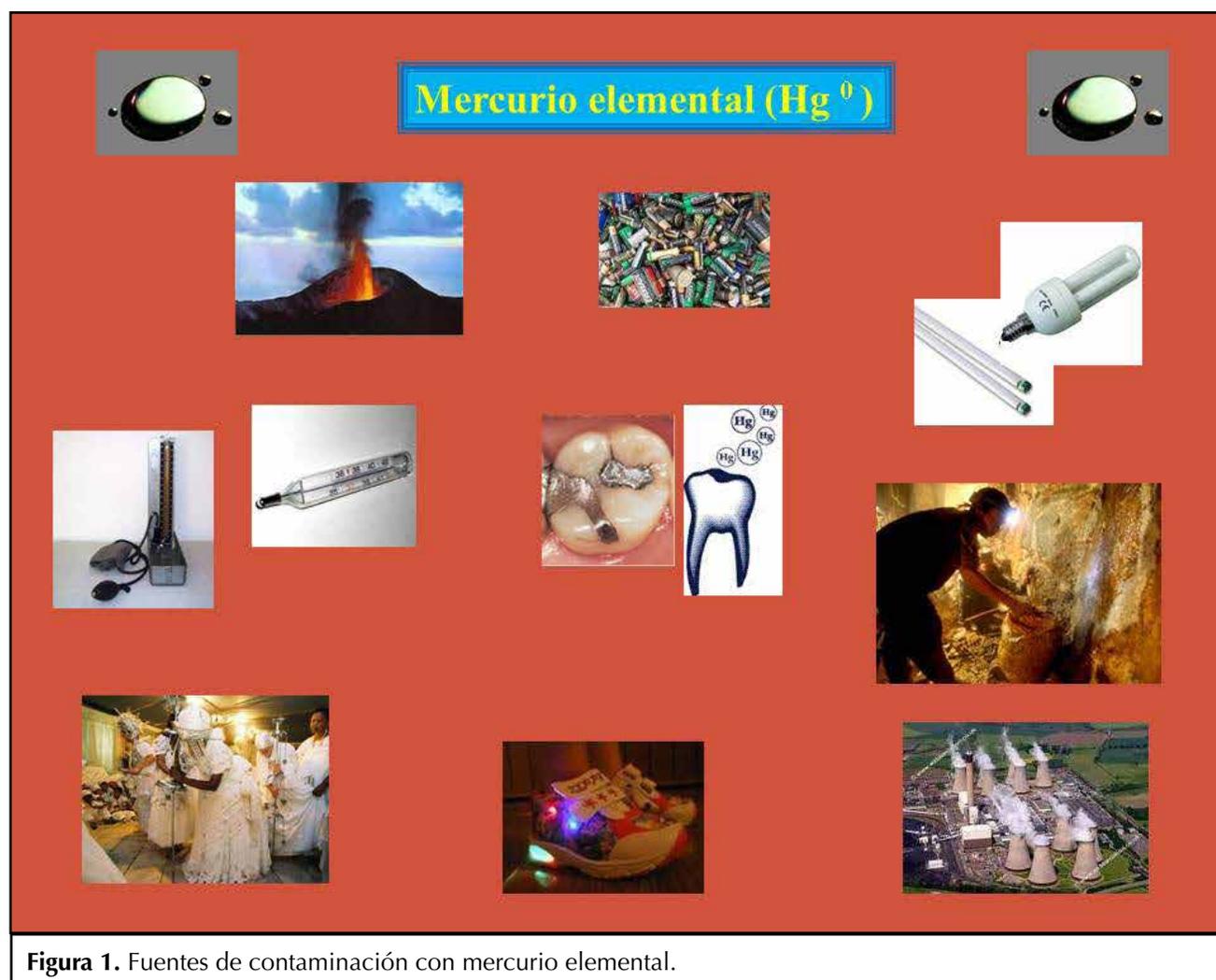


Figura 1. Fuentes de contaminación con mercurio elemental.

ma nervioso central y se convierten en el organismo total o parcialmente a la forma inorgánica la cual es altamente nefrotóxica (Clarkson y Cols, 2003; Counter y Buchanan, 2004, Zalups, 2000).

Los vapores de mercurio (Hg^0) inhalados se absorben casi completamente en los pulmones, donde se oxidan hasta dar catión mercúrico divalente. Una cantidad importante de vapores penetran en el encéfalo antes de oxidarse. Las sales mercúricas inorgánicas solubles llegan a la circulación sanguínea luego de ser ingeridas. La mayor concentración de Hg^{2+} se observa en los riñones, donde se retiene por más tiempo que en otros tejidos. El Hg^{2+} no atraviesa fácilmente ni la placenta ni la barrera hematoencefálica. Se elimina por materia fecal y por orina con un tiempo de vida medio de aproximadamente sesenta días (Counter y Buchanan, 2004, Zalups, 2000, Klassen, 2003). Los compuestos orgánicos de mercurio como CH_3Hg^+ y $CH_3CH_2Hg^+$ presentan una mayor absorción en el tubo digestivo que las sales inorgánicas, cruzan la barrera hematoencefálica y la placenta. El $CH_3CH_2Hg^+$ es velozmente metabolizado a mercurio inorgánico. El CH_3Hg^+ se conjuga principalmente con glutatión en hígado, se secreta por bilis y se excreta en heces, y solamente el 10 % de la dosis se elimina por orina. Una parte del metilmercurio se desmetila a Hg^{2+} . Presenta una vida media que oscila entre cuarenta y ciento cinco días (Counter y Buchanan, 2004, Zalups, 2000, Klassen, 2003).

A consecuencia de que existe una alta afinidad entre los iones mercúricos y los grupos sulfidrilos reducidos, los conjugados mercúricos con albúmina, L-cisteína, homocisteína y glutatión son las formas biológicamente importantes del Hg^{2+} en circulación (Zalups, 2000).

Tanto las formas orgánicas como inorgánicas del mercurio se captan, acumulan y expresan su toxicidad a nivel renal. Se acumulan en la corteza renal y en la zona externa de la médula externa, principalmente a lo largo de los tres segmentos del túbulo proximal (Zalups, 2000).

■ NEFROPATÍAS OCASIONADAS POR AGENTES TÓXICOS.

La alteración funcional o morfológica del riñón ocasionada por un fármaco, una sustancia química o un agente biológico que haya sido ingerido, inyectado, inhalado o absorbido se denomina nefropatía tóxica (Brady y Cols, 1996; Green y Cols, 2000; Walker, 2000).

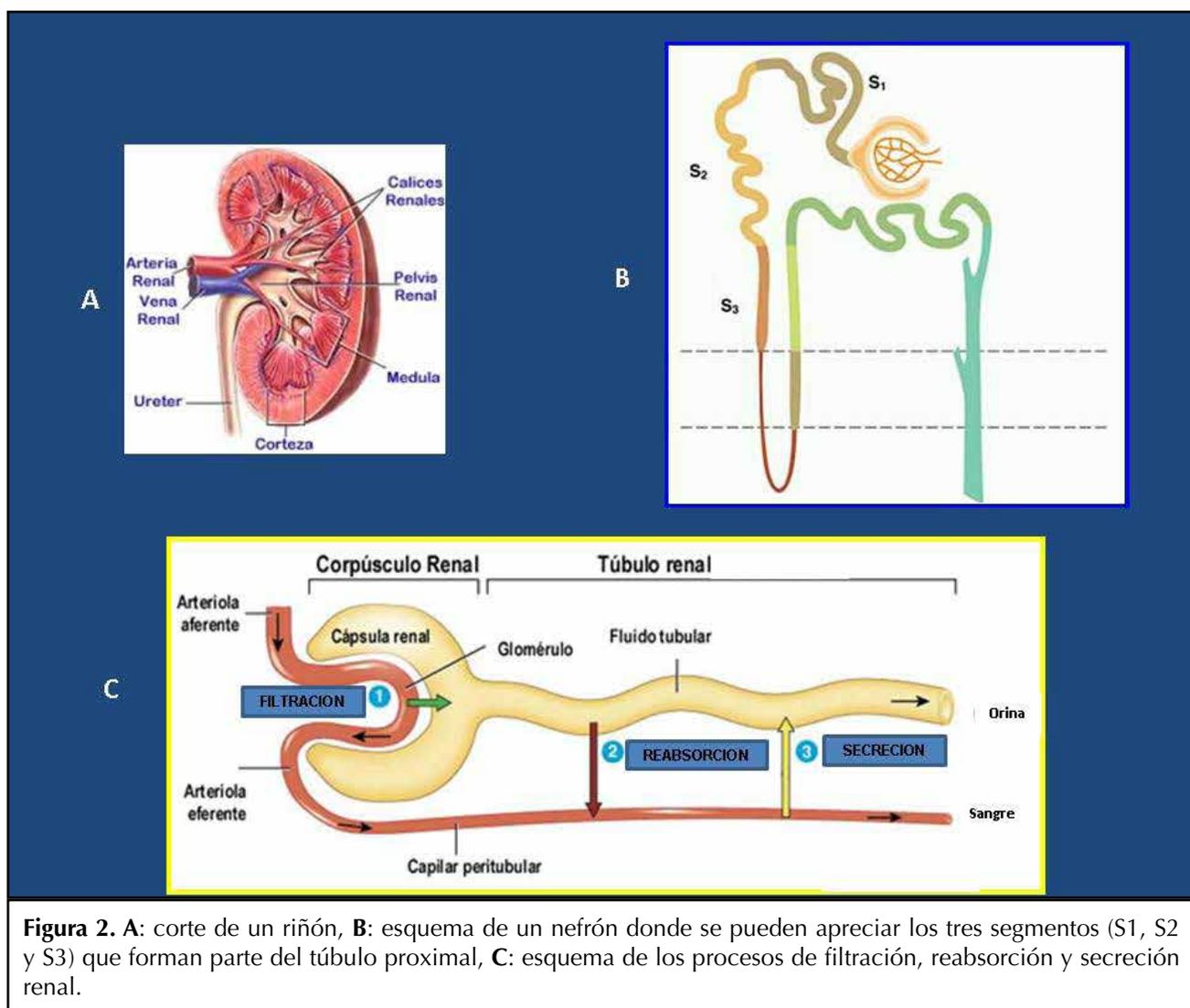
Entre los agentes más comunes que pueden ocasionar nefrotoxicidad se pueden mencionar: metales pesados (**mercurio**, plomo, cadmio, uranio, oro, cobre, arsénico, hierro), fármacos (antibióticos, analgésicos, antivirales, inmunosupresores, antineoplásicos), compuestos usados con fines diagnósticos (yoduro sódico, todos los agentes yodados de contraste), agentes biológicos (aflatoxinas, venenos de serpientes y arañas), herbicidas y pesticidas (paraquat, dioxina, lindano) y disolventes (metanol, dietilenglicol, tetracloruro de carbono).

La concentración de una droga y/o sus metabolitos en el interior de las células renales tiene un rol crítico en el desarrollo de nefrotoxicidad. La heterogeneidad de la función celular renal y del metabolismo son factores importantes en la generación de toxicidad renal. La concentración de una droga y/o sus metabolitos será modificada por la reabsorción y secreción tubular de la misma y también por la distribución renal de enzimas específicas para el metabolismo de drogas y/o sus metabolitos (Brady y Cols, 1996; Green y Cols, 2000; Walker, 2000).

El nefrón es la unidad funcional del parénquima renal. En el ser humano cada riñón contiene alrededor de 1.000.000 a 2.000.000 de nefrones. La estructura del nefrón es compleja, se compone de un corpúsculo renal en comunicación con un túbulo renal. El corpúsculo renal de Malpighi es una estructura esférica, constituida por la cápsula de Bowman y el ovillo capilar contenido en su interior el glomérulo. En la Figura 2 se pueden observar las diferentes partes que forman un nefrón.

El grado de nefrotoxicidad será dependiente de la duración de la exposición a la cantidad de toxina que llegue a un segmento particular del nefrón y de la existencia de mecanismos de captación celular que faciliten la acumulación intracelular de la toxina. Diferentes grados de daño estructural pueden ocurrir. Los cambios pueden ser expresados desproporcionadamente, al menos durante un periodo en organelas específicas (ej. lisosomas durante la toxicidad a gentamicina). Alternativamente, pueden afectar la topología, la complejidad y la polaridad de la superficie epitelial, sin modificar la integridad celular. En situaciones más severas puede ocurrir disrupción estructural irreversible. La evidencia histológica del daño celular puede aparecer sólo si el daño tóxico excede la capacidad de los mecanismos celulares para responder al mismo. La expresión final de la nefrotoxicidad también dependerá de la disponibilidad de importantes mecanismos intracelulares para la reparación celular y para el mantenimiento de la integridad celular.

La concentración de una droga, y/o de sus metabolitos puede variar considerablemente con un patrón de distribución no homogéneo entre los distintos compartimientos intrarenales. A través de la filtración glomerular grandes cantidades de fluido y pequeños solutos incluyendo



drogas llegan a la luz del túbulo renal donde se produce la reabsorción a través de las células epiteliales, las cuales poseen numerosos mecanismos para el transporte de diferentes solutos/drogas. Esto puede generar elevados gradientes de concentración a través de la luz tubular. Por ejemplo, cuando la velocidad de reabsorción de agua excede la velocidad de reabsorción de la droga en el nefrón, se incrementará en el lumen la concentración de la droga. En forma similar la reabsorción o secreción tubular activa en el nefrón modificará la concentración luminal del agente. La concentración inicial en el fluido tubular en el espacio de Bowman es equivalente a la concentración de la droga en plasma que no está unida a proteínas y la concentración final de la droga en

el fluido tubular es equivalente a la concentración en la vejiga, asumiendo que no hay metabolismo por el epitelio de la vejiga o por posibles patógenos urinarios. Entre estos dos puntos, la concentración de la droga puede variar en varios órdenes de magnitud, dependiendo de la solubilidad en lípidos de la droga, su coeficiente de disociación, el pH urinario, la reabsorción y secreción tubular de la droga, el manejo tubular de agua, la velocidad de flujo urinario y la presencia de compuestos análogos que podrían competir por el transporte tubular (Walker, 2000).

El nefrón es muy complejo y heterogéneo desde el punto de vista morfológico, bioquímico y fisiológico. Existe una excelente correlación entre los atributos funcionales

y morfológicos de cada segmento del nefrón y el potencial desarrollo de nefrotoxicidad. Esto se pone en evidencia en el túbulo proximal donde tiene lugar la mayor proporción de daño asociado a drogas. Los dos primeros segmentos (S1 y S2) del túbulo proximal se caracterizan por membranas con ribete en cepillo en el dominio luminal, un sistema fagolisosomal altamente desarrollado, un gran aparato endocítico con numerosas vesículas apicales y mitocondrias asociadas con la membrana basolateral. Funcionalmente esta región se asocia con una elevada reabsorción de fluidos y solutos acoplada a un gradiente osmótico generado por el transporte activo de sodio a través de la membrana basolateral mediante la sodio-potasio ATPasa y con la captación tubular y

el metabolismo de proteínas a través de los sistemas endocíticos y fagolisosomales. El segmento final S3 del túbulo proximal se localiza en la franja más externa de la médula externa. Las células se caracterizan por un sistema fagolisosomal y endocítico menos desarrollado pero contienen una mayor proporción de retículo endoplásmico liso y peroxisomas. Dentro de estas células se localizan predominantemente las oxidasas de función mixta. Estas enzimas pueden tener un rol relevante en la activación metabólica y en la generación de nefrotoxicidad de ciertas drogas (Walker, 2000).

■ EL MERCURIO COMO AGENTE NEFROTÓXICO.

Si bien todas las especies de mercurio ocasionan daño renal, las especies inorgánicas son las que poseen mayor relevancia nefrotóxica. Por el contrario, se necesitan elevadas dosis y múltiples exposiciones de compuestos orgánicos de mercurio para producir insuficiencia renal.

La alteración renal generada por mercurio inorgánico se evidencia por lo general durante las 24 h siguientes a la exposición y es posible reproducirlo en ratas de laboratorio. El segmento S3 del túbulo proximal es la parte del nefrón más sensible a los efectos tóxicos tanto de las especies orgánicas como inorgánicas del mercurio. Los efectos tóxicos del mercurio en el riñón se ponen en evidencia muy rápidamente. Luego de 1 h de exposición a una dosis muy alta de HgCl_2 (100 mg/kg) se han observado cambios degenerativos a lo largo del túbulo proximal. A dosis más bajas de mercurio inorgánico (1-5 mg/kg) no se han descrito cambios patológicos en el microscopio óptico hasta pasadas las 6 h de exposición. A nivel de microscopía electrónica se observan alteraciones luego de 3 h de tratamiento con 4 mg/kg s.c. de HgCl_2 . Se ha descrito

daño mitocondrial, dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y pérdida de ribosomas. A dosis nefrotóxicas la necrosis celular es evidente a lo largo del segmento S3 del túbulo proximal tanto con microscopio óptico como electrónico luego de 12 h de exposición. Si la exposición a dosis nefrotóxicas de mercurio inorgánico no es fatal, el epitelio del túbulo proximal por lo general sufre un proceso de regeneración completa durante las dos semanas posteriores a la inducción de la patología tubular (Zalups, 2000).

La insuficiencia renal aguda producida por exposición a HgCl_2 se caracteriza por marcada vasoconstricción, disminución en la velocidad de filtración glomerular y colapso tubular con importantes modificaciones funcionales y estructurales de los túbulos. Numerosos estudios en animales experimentales tratados con dosis nefrotóxicas de mercurio han descrito modificaciones de la integridad de las membranas plasmáticas (pérdida del ribete en cepillo de las membranas apicales y fragmentación, pérdida de las invaginaciones de las membranas basolaterales) en forma simultánea con la inhibición de proteínas transportadoras, lo que podría explicar las alteraciones en las funciones de reabsorción y secreción del túbulo proximal (Herak-Kramberger y Sabolic, 2001; Aleo y cols, 2005; Pelis y cols, 2007).

La captación de Hg^{2+} por las células epiteliales del túbulo proximal es mediada por proteínas transportadoras presentes en membranas plasmáticas apicales y basolaterales (Zalups, 2000). Algunos estudios han sugerido que las proteínas de membrana involucradas en el transporte de especies mercúricas tendrían un rol regulador en la expresión de los efectos tóxicos del mercurio (Zalups, 2000; Torres y Cols, 2011; Hazelhoff y Cols, 2012).

El mercurio que llega a la luz del túbulo renal proveniente de la filtración glomerular es captado en la membrana luminal por sistemas transportadores de aminoácidos (ASC, LAT, bo) y de péptidos. En la membrana basolateral la captación de las diferentes especies de mercurio es mediada por los transportadores de aniones orgánicos 1 y 3 (Oat1 y Oat3) (Zalups y Cols, 2004; Lash y Cols, 2005; Zalups y Ahmad, 2005a; 2005b). Se ha descrito además que el mercurio conjugado con glutatión dentro de la célula renal puede ser secretado a la luz tubular mediante la intervención de la proteína de resistencia a multidrogas 2 ("multidrug transporter protein 2", Mrp2) (Aleo y Cols, 2005). El mercurio que circula unido a proteínas también puede ingresar a la célula renal mediante un mecanismo de endocitosis. En la Figura 3 se puede observar un esquema con los principales mecanismos de captación y secreción del mercurio en la célula renal.

■ PERSPECTIVAS PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR MERCURIO-ALGUNOS ESTUDIOS REALIZADOS EN NUESTRO LABORATORIO.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios empleando ratas Wistar macho adultas tratadas con una única dosis nefrotóxica de HgCl_2 (5 mg/kg p.c.) 18 h antes de los experimentos. Para la realización de estos estudios se emplearon técnicas de uso corriente en nuestro laboratorio (Villar y Cols, 2005; Brandoni y Cols, 2006^a, 2006^b; Di Giusto y Cols 2009a). Estudios histológicos demostraron que los riñones de estos animales presentaban algunos túbulos con células vacuoladas, con pérdida de membranas apicales, disrupción de membranas basales y necrosis según lo previamente descrito en este modelo experimental (Nava y Cols, 2000; Stacchiotti

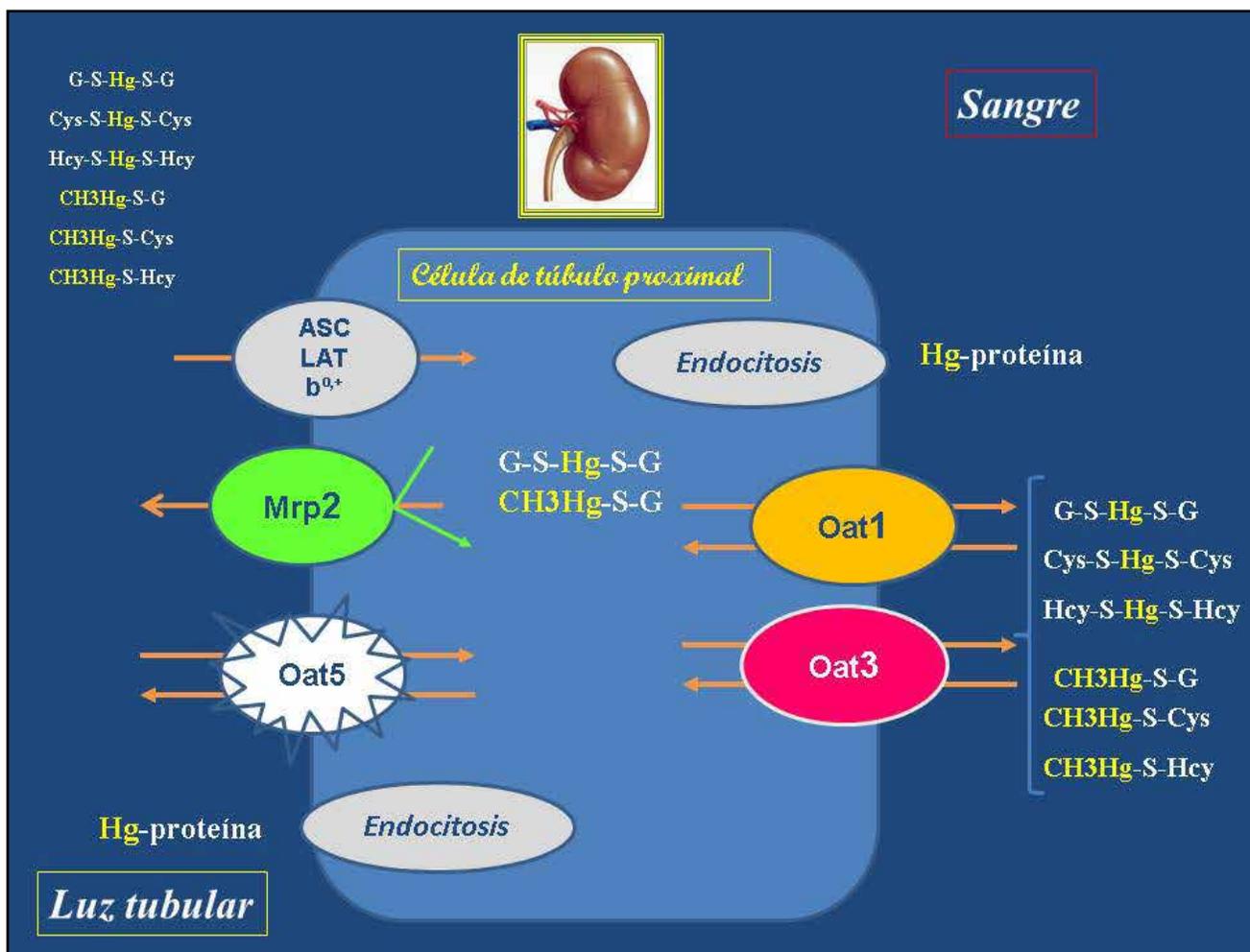


Figura 3. Mecanismos de captación y secreción de diferentes especies de mercurio en la célula del túbulo proximal renal.

Oat1: proteína transportadora de aniones orgánicos 1; Oat3: proteína transportadora de aniones orgánicos 3; Oat5: proteína transportadora de aniones orgánicos 5

Mrp2: proteína de resistencia a multidrogas 2

ASC, LAT, b⁰⁺: proteínas transportadoras de aminoácidos

G-S-Hg-S-G, CH₃Hg-S-G: conjugados de mercurio y de metilmercurio con glutatión respectivamente.

Cys-S-Hg-S-Cys, CH₃Hg-S-Cys: conjugados de mercurio y de metilmercurio con cisteína respectivamente.

Hcy-S-Hg-S-Hcy, CH₃Hg-S-Hcy: conjugados de mercurio y de metilmercurio con homocisteína respectivamente.

y Cols, 2006). Mediante análisis de Western blotting y de inmunohistoquímica observamos que las ratas expuestas a HgCl₂ presentaban una disminución en la expresión de los transportadores renales de aniones orgánicos Oat1 y Oat3 a nivel de membrana basolateral renal. La disminución en la expresión de estas proteínas se evidenció también en los estudios de funcionalidad, observándose una disminución en la captación de *p*-aminohipurato (PAH, sustrato de Oat1, Oat3 y Mrp2) en

vesículas de membranas basolaterales y en la depuración sistémica de este anión orgánico (Di Giusto y Cols 2009b).

Se ha descrito que la intoxicación con mercurio dispara en las células del túbulo proximal una serie de mecanismos destinados a favorecer la sobrevivencia de las mismas (Aleo y Cols, 2005; Sabolic, 2006). Entre ellos se puede mencionar: aumento de los niveles intracelulares de tioles protectores (glutatión y me-

talotioneinas) y sobre-expresión de genes que codifican bombas de flujo capaces de remover los conjugados de mercurio con glutatión (por ej. Mrp2). Dado que Oat1 y Oat3 median el ingreso del mercurio a las células del túbulo proximal, la disminución en la expresión de las mismas podría ser otro mecanismo de defensa de las células destinado a protegerlas a sí mismas contra la injuria generada por mercurio.

Además, trabajos recientes nos

han permitido demostrar que Oat1 tiene un rol muy importante en el desarrollo de nefrotoxicidad inducida por mercurio. Por un lado hemos demostrado que ratones "knock out" para Oat1 presentan una amplia protección al daño renal producido por HgCl_2 (Torres y Cols, 2011). Por otro lado, hemos observado que existe una diferencia ligada al sexo en ratas Wistar en lo que respecta al grado de nefrotoxicidad inducida por mercurio. Las ratas hembras son más resistentes a los efectos deletéreos del mercurio a nivel renal probablemente debido a que Oat1 presenta menor expresión en el riñón de ratas hembras en comparación con ratas macho (Cerrutti y Cols, 2002, Hazelhoff y Cols, 2012)

Es habitual emplear quelantes como dimercaprol (en caso de exposiciones de alto nivel o sujetos sintomáticos) o penicilamina (exposiciones de bajo nivel o personas asintomáticas) para tratar la intoxicación con mercurio inorgánico o elemental (Klassen, 2003).

Los mercuriales orgánicos de cadena corta en particular el metilmercurio, son las formas más difíciles de movilizar desde el organismo, tal vez por su escasa reactividad con los quelantes. El dimercaprol está contraindicado en la intoxicación por metilmercurio porque se ha demostrado que aumenta los niveles cerebrales de esta sustancia en animales de experimentación. La penicilamina facilita la eliminación de metilmercurio del organismo, pero no tiene elevada eficacia clínica en el tratamiento de la intoxicación por dicho compuesto (Klassen, 2003).

En los últimos años, se han clonado un elevado número de transportadores y se ha progresado considerablemente en el conocimiento de las características moleculares de los transportadores individuales. Resulta ahora claro que algunas de

estas proteínas son responsables del transporte de fármacos y tóxicos en varios tejidos y que pueden ser determinantes de las características farmacocinéticas de una droga, como la absorción, la distribución tisular y la eliminación (Giacomini y Sugiyama, 2011).

Actualmente se considera relevante al estudio de la expresión, función y regulación de transportadores de drogas en el diseño y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Giacomini y Sugiyama, 2011).

La modulación farmacológica de la expresión y/o función de Oat1, Oat3 y Mrp2 podría ser una estrategia terapéutica eficaz para reducir la nefrotoxicidad del mercurio.

Al respecto se está estudiando en nuestro laboratorio el grado de nefrotoxicidad inducida por una dosis nefrotóxica de HgCl_2 en ratas previamente tratadas con algunas de las siguientes drogas: rifampicina (inductor de la expresión de Mrp2), (Kauffman y Cols, 1998; Nishimura y Cols, 2006), furosemida (inductor de la expresión de Oat1) (Kim y Cols, 2003); MK-571 (inhibidor de la función de Mrp2) (Kala y Cols, 2004) y probenecid (principalmente inhibidor de la función de Oat1) (Tanaka y Cols, 1992).

La modulación de la expresión y/o función de Oat1, Mrp2 y de otros transportadores involucrados en el transporte de mercurio a nivel renal podría tener importancia terapéutica en el tratamiento de la nefrotoxicidad inducida por este metal.

Con respecto a las perspectivas diagnósticas de la insuficiencia renal producida por mercurio, recientemente hemos propuesto a la excreción urinaria del transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) como potencial biomarcador temprano de daño tubular proximal en insuficien-

cia renal aguda de origen isquémico (Di Giusto y Cols, 2009) y de origen nefrotóxico, inducida por cisplatino (Bulacio y Torres, 2013) e inducida por mercurio (Di Giusto y Torres, 2010). Oat5 se expresa exclusivamente en membrana apical de las células del túbulo proximal renal (Ver Figura 3). Esta proteína transporta ocratoxina A, esteroides, dicarboxilatos e interacciona con drogas antiinflamatorias no esteroideas, diuréticos y con algunos antibióticos (Anzai y Cols, 2005). En nuestro laboratorio hemos sido pioneros en la detección de Oat5 en orina (Di Giusto y Cols, 2009a). En el caso de la insuficiencia renal aguda producida por mercurio hemos observado que su excreción urinaria aumenta en forma dosis dependiente con las dosis de HgCl_2 administradas (Di Giusto y Torres, 2010). Los niveles de Oat5 aumentan en orina antes de que se alteren los marcadores tradicionales de daño renal como urea y creatinina plasmática, clearance de creatinina y actividad de fosfatasa alcalina en orina. Adicionales estudios en modelos experimentales de insuficiencia renal aguda y estudios clínicos en pacientes con elevado riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda deberán realizarse a fin de validar el uso de la excreción urinaria de Oat5 como biomarcador temprano de daño tubular renal.

■ GLOSARIO

Farmacocinética: es la parte de la farmacología que estudia los procesos de absorción, distribución, metabolización y excreción de los fármacos.

Western blotting: es una técnica analítica empleada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Las proteínas se separan mediante una electroforesis en gel. Luego se transfieren a una membrana adsorbente, donde se busca la proteína de interés con anticuerpos

específicos para ella. Para finalizar se detecta la unión antígeno-anticuerpo mediante actividad enzimática, fluorescencia, etc.

Inmunohistoquímica: se refiere al proceso en el que se usan anticuerpos para detectar antígenos en un corte o sección de tejido biológico.

Ratones knock out: un ratón knock out es un ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados. El objetivo es comprender la función de un gen que ha sido secuenciado. Inactivando el gen y estudiando las diferencias que presenta el ratón afectado es posible inferir la/s función/es de ese gen.

■ BIBLIOGRAFÍA.

- Aleo M.F., Morandini F., Bettoni F., Giuliani R., Rovetta F., Steimberg N., Apostoli P., Parrinello G., Mazzoleni G. (2005). Endogenous thiols and MRP transporters contribute to Hg²⁺ efflux in HgCl₂-treated tubular MDCK cells. *Toxicology* 205, 137-151.
- Anzai N., Jutabha P., Enomoto A., Yokoyama H., Nonoguchi H., Hirata T., Shiraya K., He X., Cha S.H., Takeda M., Miyazaki H., Sakatada T., Tomita K., Igarashi T., Kanai Y., Endou H. (2005). Functional characterization of rat organic anion transporter 5 (Slc22a19) at the apical membrane of renal proximal tubules. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 534-544.
- Arribére M.A., Ribeiro Guevara S., Sánchez R.S., Gil M.I., Román Ross G., Daurade L.E., Fajon V., Horval M., Alcalde R., Kestelman A.J. (2003). Heavy metals in the vicinity of a chlor-alkali factory in the upper Negro River ecosystem, Northern Patagonia, Argentina. *Sci. Total Environm.* 301, 187-203.
- Brandoni A., Anzai N., Kanai Y., Endou H., Torres A.M. (2006a). Renal elimination of p-aminohippurate (PAH) in response to three days of biliary obstruction in the rat. The role of OAT1 and OAT3. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 673-682.
- Brandoni A., Villar S.R., Picena J.C., Anzai N., Endou H., Torres A.M. (2006b). Expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to acute biliary obstruction. *Hepatology* 43, 1092-1100.
- Brady H.R., Brenner B.M., Lieberthal W. (1996). Acute renal failure, In: *The Kidney*, 5th ed., edited by Brenner B.B., Rector F.C., Philadelphia, WB Saunders, pp 1200-1252.
- Bulacio R.P., Torres A.M. (2013). Organic anion transporter 5 (Oat5) renal expression and urinary excretion in rats treated with cisplatin. A potential biomarker of cisplatin induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 87, 1953-1962.
- Cerrutti J.A., Brandoni A., Quaglia N., Torres A.M. (2002). Sex differences in p-aminohippuric acid transport in rat kidney: Role of membrane fluidity and expression of OAT1. *Mol. Cell. Biochem.* 233, 175-179.
- Clarkson T.W., Magos L., Myers G.J. (2003). The toxicology of mercury-Current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* 349, 1731-1737.
- Counter S.A., Buchanan L.H. (2004). Mercury exposure in children: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 209-230.
- De Marco S.G., Botté S., Marcovecchio J.E. (2006). Mercury distribution in abiotic and biological compartments within several estuarine systems from Argentina: 1980-2005 period. *Chemosphere* 65, 213-223.
- Di Giusto G., Anzai N., Endou H., Torres A.M. (2009a). Oat5 and NaDC1 protein abundances in kidney and urine following renal ischemic reperfusion injury. *J. Histochem.Cytochem.* 57, 17-27.
- Di Giusto G., Anzai N., Ruiz M.L., Endou H., Torres A.M. (2009b). Expression and function of Oat1 and Oat3 in rat kidney exposed to mercuric chloride. *Arch. Toxicol.* 83, 887-897.
- Di Giusto G., Torres A.M. (2010). Organic anion transporter 5 renal expression and urinary excretion in rats exposed to mercuric chloride: a potential biomarker of mercury induced nephropathy. *Arch. Toxicol.* 84, 741-749.
- Giacomini K.M., Sugiyama Y. (2011). Transportadores de membrana y respuesta a fármacos. En: *Goodman & Gilman's Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Brunton LL, Chabner B., Knollman B. (Ed.) 12ed. Editorial McGraw Hill pp.89-121.
- Green J., Abassi Z., Winaver J., Skorecki K.L. (2000). Acute renal failure: clinical and pathophysiological aspects. In: *The Kidney. Physiology and Pathophysiology*, 3rd ed. edited by Seldin DW, Giebisch G, Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, pp 2329-2373.
- Hazelhoff M.H., Bulacio R.P., Torres A.M. (2012) Gender related differences in kidney injury induced by mercury. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 10523-10536.
- Herak-Kramberger C.M., Sabolic I. (2001). The integrity of renal

- cortical brush-border and basolateral membrane vesicles is damaged in vitro by nephrotoxic heavy metals. *Toxicology* 156, 139-147.
- Kala S.V., Kala G., Prater C.I., Sartorelli A.C., Lieberman M.W. (2004). Formation and urinary excretion of arsenic triglutathione and methylarsenic diglutathione. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 243-249.
- Kauffman H-M., Keppler D., Gant T.W., Schrenk D. (1998). Induction of hepatic mrp2 (cmrp/cmoat) gene expression in non-human primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Arch. Toxicol.* 72, 763-768.
- Kim G-H., Na K.Y., Kim S-Y., Joo K.W., Oh Y.K., Chae S-W., Endou H., Han J.S. (2003). Up-regulation of organic anion transporter 1 protein is induced by chronic furosemide or hydrochlorothiazide infusion in rat kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18, 1505-1511.
- Klassen C.D. (2003). Metales pesados, In: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica, 10th ed. Edited by Harman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A, México, Mc Graw-Hill Interamericana, pp 1873-1897.
- Lash L.H., Hueni S.E., Putt D.A., Zalups R.K. (2005). Role of organic anion and amino acid carriers in transport of inorganic mercury in rat renal basolateral membrane vesicles: Influence of compensatory renal growth. *Toxicol. Sci.* 88, 630-644.
- Marcovecchio J.E. (2004). The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as bioindicators of heavy metals pollution in La Plata river estuary, Argentina. *Sci. Total Environ.* 323, 219-226.
- Nava M., Romero F., Quiroz Y., Parrá G., Bonet L., Rodríguez-Iturbe B. (2000). Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Am. J. Physiol.* 279, F910-F918.
- Nishimura M., Koeda A., Suzuki E., Kawano Y., Nakayama M., Satoh T., Narimatsu S., Naito S. (2006). Regulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 297-307.
- Pelis R.M., Dangprapai Y., Wunz T.M., Wright S.H. (2007). Inorganic mercury interacts with cysteine residues (C451 and C474) of hOCT2 to reduce its transport activity. *Am. J. Physiol.* 292, F1583-F1591.
- Sabolic I. (2006). Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals. *Nephron Physiol.* 104, 107-114.
- Stacchiotti A., Ricci F., Rezzani R., Li Volti G., Borsani E., Lavazza A., Bianchi R., Rodella L.F. (2006). Tubular stress proteins and nitric oxide synthase expression in rat kidney exposed to mercuric chloride and melatonin. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 1149-1157.
- Tanaka T., Naganuma A., Imura N. (1992). Routes for renal transport of methylmercury in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 228, 9-14.
- Torres A.M., Dnyanmote A.V., Bush K.T., Wei Wu W., Nigam S. (2011). Detection of multispecific organic anion transporter (OAT1/SLC22A6) protects from mercury-induced nephrotoxicity. *J. Biol. Chem.* 286, 26391-26395.
- Villar S.R., Brandoni A., Anzai N., Endou H., Torres A.M. (2005). Altered expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 68, 2704-2713.
- Walker R.J. (2000). Cellular mechanisms of drug nephrotoxicity In: *The Kidney. Physiology and Pathophysiology*, 3rd ed. edited by Seldin DW, Giebisch G, Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, pp 2835-2859.
- Wright S.H., Dantzer W.H. (2004). Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol. Rev.* 80, 987-1049.
- Zalups R. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 52, 113-143.
- Zalups R.K., Ahmad S. (2005a). Handling of the homocysteine S-conjugate of methylmercury by renal epithelial cells: role of organic anion transporter 1 and amino acid transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 896-904.
- Zalups R.K., Ahmad S. (2005b). Transport of N-acetylcysteine S-conjugates of methylmercury in Madin-Darby canine kidney cells stably transfected with human isoform of organic anion transporter 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1158-1168.
- Zalups R.K., Aslamkhan A.G., Ahmad S. (2004). Human organic anion transporter 1 mediates cellular uptake of cysteine-S conjugates of inorganic mercury. *Kidney Int.* 66, 251-261.



**34 CENTROS DE INVESTIGACIÓN PROPIOS, ASOCIADOS,
VINCULADOS O EN RED**

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

**CARRERA DEL PERSONAL DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO**

PROGRAMA DE BECAS

- Becas de entrenamiento para alumnos universitarios
- Becas de estudio
- Becas de perfeccionamiento

SUBSIDIOS

- Para la Realización de Reuniones Científicas y Tecnológicas y Asistencia a Reuniones
- Para Publicaciones Científicas y Tecnológicas
- Para Proyectos de Investigación de Interés Provincial

**INNOVACIÓN, TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA Y CULTURA
EMPREDEDORA**

PROGRAMA DE MODERNIZACIÓN TECNOLÓGICA

PROGRAMA EMPRECIC

CRÉDITO FISCAL

**PROGRAMA DE FORMACIÓN DE FORMADORES EN
EMPREDEDORISMO**

Ciencia
Tecnología
Innovación

 *comisíondeinvestigaciones.
cientificas*

www.cic.gba.gov.ar

El 98 por ciento de los doctores formados por el CONICET tiene empleo

Según un informe dado a conocer por este organismo científico acerca de la inserción de doctores, sólo un 1 por ciento de estos ex-becarios no tiene trabajo o no poseen ocupación declarada y un 10 por ciento posee remuneraciones inferiores a un estipendio de una beca doctoral.

Asimismo, proyecta que el 89 por ciento de los encuestados tiene una situación favorable en su actividad profesional, pero sobre todo asegura que más del 98 por ciento de los científicos salidos del CONICET consigue trabajo.

Los datos surgidos del estudio "Análisis de la inserción laboral de los ex-becarios Doctorales financiados por CONICET", realizado por la Gerencia de Recursos Humanos del organismo, involucró 934 casos sobre una población de 6.080 ex-becarios entre los años 1998 y el 2011.

Al respecto, en el mismo se considera que del número de ex-becarios consultados, el 52 por ciento (485 casos), continúa en el CONICET en la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico.

De los que no ingresaron en el organismo pero trabajan en el país, sobre 341 casos, el 48 por ciento se encuentra empleado en universidades de gestión pública y un 5 por ciento en privadas; el 18 por ciento en empresas, un 6 por ciento en organismos de Ciencia y Técnica (CyT), un 12 por ciento en la gestión pública y el resto en instituciones y organismos del Estado.

En tanto, en el extranjero, sobre 94 casos, el 90 por ciento trabaja en universidades, el 7 por ciento en empresas y el 2 por ciento es autónomo.

El mismo informe traduce que la demanda del sector privado sobre la

incorporación de doctores no es aún la esperada, pero está creciendo. La inserción en el Estado, si se suma a las universidades nacionales y ministerios, se constituye en el mayor ámbito de actividad.

Frente a ello, a los fines de avanzar en la inserción en el ámbito publico-privado el CONICET realiza actividades políticas de articulación con otros organismos de CyT, es decir, universidades, empresas, a través de la Unión Industrial Argentina (UIA), y en particular con YPF que requiere personal altamente capacitado en diferentes áreas de investigación.

Desde el CONICET se espera que en la medida que la producción argentina requiera más innovación, crecerá la demanda de doctores. Para cuando llegue ese momento el país deberá tener los recursos humanos preparados para dar respuestas. Es por ello se piensa en doctores para el país y no solamente doctores para el CONICET.

Programa +VALOR.DOC

Sumar doctores al desarrollo del país

A través de esta iniciativa nacional, impulsada por el CONICET y organismos del Estado, se amplían las posibilidades de inserción laboral de profesionales con formación doctoral

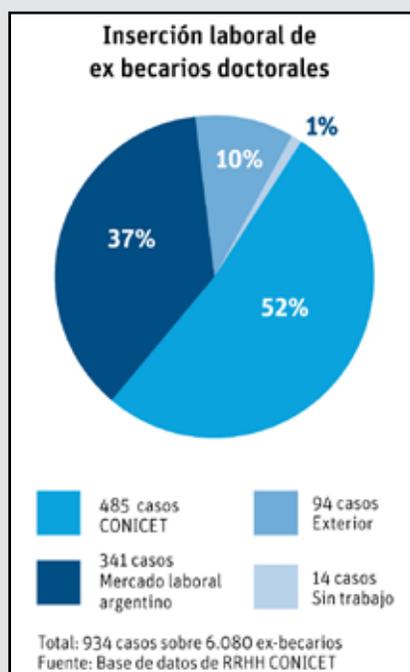
El programa +VALOR.DOC bajo el lema "Sumando Doctores al Desarrollo de la Argentina", busca vincular los recursos humanos con las necesidades y oportunidades de desarrollo del país y fomentar la incorporación de doctores a la estructura productiva, educativa, administrativa y de servicios.

A partir de una base de datos y herramientas informáticas, se aportan recursos humanos altamente calificados a la industria, los servicios y la gestión pública. Mediante una página Web, los doctores cargan sus curriculum vitae para que puedan contactarlos por perfil de formación y, de esta manera, generarse los vínculos necesarios.

Con el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, este programa tiene como objetivo reforzar las capacidades científico-tecnológicas de las empresas, potenciar la gestión y complementar las acciones de vinculación entre el sector que promueve el conocimiento y el productivo.

+VALOR.DOC es una propuesta interinstitucional que promueve y facilita la inserción laboral de doctores que por sus conocimientos impactan positivamente en la sociedad.

Para conocer más sobre el programa www.masVALORDoc.conicet.gov.ar.



DIETA Y SALUD

Palabras clave: berro de agua, ensayo cometa, prevención.
Key words: watercress, comet assay, prevention.

Diversos estudios epidemiológicos establecen una asociación inversa entre una dieta con alto contenido de crucíferas y el riesgo a padecer cáncer de pulmón o del tracto gastrointestinal. La familia Cruciferae presenta una extensa distribución geográfica a nivel mundial y son vegetales ampliamente consumidos por la población: repollitos, coliflor, repollo, brócoli, rúcula, berro, rabanito, entre otros. Contienen fitoquímicos como vitaminas, minerales, flavonoides, fenoles, carotenos, folatos y son la fuente principal de glucosinolatos (GSLs) de la dieta. El berro de agua (*Nasturtium officinale*, Aiton) es una de las crucíferas que contiene la mayor concentración de GSLs por gramo además de un gran contenido de carotenos. La Genética Toxicológica participa de manera esencial en el asesoramiento de efectos sobre la salud y su interés se centra en identificar y analizar el impacto de agentes químicos, biológicos o físicos sobre los componentes hereditarios de los organismos vivos. En estudios de genotoxicidad las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuyente al material genético en células individuales. Uno de los ensayos que cumple con esta premisa es la electroforesis de una sola célula o ensayo cometa. Considerando el actual interés en aumentar el consumo de alimentos y plantas medicinales con potenciales características benéficas para disminuir o prevenir el impacto negativo de xenobióticos a nivel celular y genético, realizamos el estudio de la variedad local del berro de agua empleando metodologías que posibiliten evidenciar su capacidad como agente promotor de la salud.

**Marcela M. López Nigro*,
Natalia A. Casanova,
Marta A. Carballo.**

CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica)- INFIBIOC (Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica)- Departamento de Bioquímica Clínica- Facultad de Farmacia y Bioquímica- Universidad de Buenos Aires. Junín 956- 1113- Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

mmllopeznigro@gmail.com

Several epidemiological studies have established an inverse association between a diet with high cruciferous vegetables content and the risk of developing lung or gastrointestinal tract cancer. The Cruciferae families has a globally extensive geographical distribution and are widely consumed by the population: sprouts, cauliflower, cabbage, broccoli, arugula, watercress, radish, among others. They contain nutrients like vitamins, minerals, carotenoids, folate, and are the main source of glucosinolates (GSLs) diet. Watercress (*Nasturtium officinale*, Aiton) is a cruciferous containing the highest concentration of GSLs per gram and a high content of carotenoids. Genetic Toxicology participates in an essential way on the advice of health effects and its focus is on identifying and analyzing the impact of chemical, biological or physical agents on the hereditary components of living organisms. Genotoxicity studies selection techniques must be able to detect in genetic material both damage and consequent repair into individual cells. One of the assays that follow this premise is the single cell gel electrophoresis or comet assay. Considering the current interest in increasing the consumption of food and medicinal plants with potential beneficial characteristics to reduce or prevent the negative impact of xenobiotics at the cellular and genetic level, we conducted a study of the local variety of watercress using methodologies that allow demonstrating its capacity as a health promoting agent.

■ CRUCÍFERAS: BERRO DE AGUA (*NASTURTIUM OFFICINALE* - CRUCIFERAE).

La prevención y protección del daño al material genético constituyen estrategias claves en la disminución del riesgo de padecer diversas patologías crónicas, entre ellas el cáncer. Ambos escenarios implican una menor exposición a xenobióticos que puedan interaccionar con el ADN u otros blancos biológicos y la estimulación de los mecanismos propios del organismo diseñados

para reducir el impacto de los agentes deletéreos. En este contexto, la dieta es un componente fundamental dado que es fuente de nutrientes que resguardan la salud y es teóricamente causa potencial y prevenible de distintos tipos de cáncer después del tabaco (Key y col., 2004). Numerosos trabajos realizados en animales y con seres humanos describen que ciertos componentes de la dieta de origen vegetal podrían tener propiedades quimiopreventivas debido a la inducción o inhibición de mecanismos vinculados con el desarro-

llo de patologías crónicas (Boeing y col., 2012). Esta capacidad de protección se basa en la riqueza de nutrientes como vitaminas, minerales, fibras y en la presencia de moléculas bioactivas no nutrientes llamadas fitoquímicos. Dentro de este gran grupo se encuentran los carotenos, polifenoles, alcaloides, compuestos nitrogenados y organosulfurados (Liu, 2004).

Según la Organización Mundial de la Salud, la relación entre el consumo habitual de vegetales y frutas

con el desarrollo de patologías crónicas es aún una asociación probable, es decir, que la evidencia aportada por los estudios epidemiológicos es consistente, pero a su vez no es posible elaborar una conclusión determinante por deficiencias en el diseño experimental o seguimiento de los individuos (2003).

La familia Cruciferae presenta una extensa distribución geográfica a nivel mundial siendo cultivadas desde la antigüedad. Son vegetales ampliamente consumidos por la población: repollitos, coliflor, repollo, brócoli, rúcula, berro, rabanito, entre otros. Al igual que otras plantas, presentan una gran variedad de moléculas antioxidantes y son la fuente principal de glucosinolatos (GSLs) de la dieta. Estos últimos, también llamados tioglicósidos, son aniones orgánicos solubles en agua responsables del sabor y aroma característico de las crucíferas.

Los GSLs son sintetizados y almacenados en la planta en forma

de precursores inactivos. La hidrólisis de los glucosinolatos es realizada por una enzima (mirosina o β -tioglucosidasa) que se encuentra físicamente separada de sus sustratos cuando la planta está intacta. La cosecha, cocción, congelamiento y masticación del vegetal así como el ataque de insectos o microorganismos producen la liberación de la enzima de su compartimiento. La enzima también está presente en el tracto intestinal de los mamíferos produciendo la hidrólisis durante la digestión. Así, por medio de la acción enzimática se forman diversos productos dependiendo de las condiciones de reacción (pH, temperatura, iones) y presencia de proteínas epitioespecíficas; entre los más importantes se encuentran los isotiocianatos (ITCs), tiocianatos, nitrilos e indoles. Estos últimos solo se forman si el glucosinolato es un derivado del aminoácido triptofano, reacción en la cual no se generan isotiocianatos.

Diversos estudios epidemiológi-

cos establecen una asociación inversa entre una dieta con alto contenido de crucíferas y el riesgo a padecer cáncer de pulmón o del tracto gastrointestinal. Así mismo hay evidencia sobre una posible protección en casos de cáncer de mama, próstata, vejiga y páncreas (Higdon y col., 2007; Kim y Park, 2009). Los mecanismos subyacentes a los efectos benéficos de las crucíferas estarían vinculados con los ITCs e indoles. Estos metabolitos serían los responsables de la inducción de genes de respuesta antioxidante y detoxificante, inhibición de las enzimas del citocromo P450, inhibición de la histona desacetilasa, inhibición del crecimiento tumoral y angiogénesis e inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular en células neoplásicas (Higdon y col., 2007; Kim y Park, 2009; Traka y Mithen, 2009). Además se les atribuye actividad antiinflamatoria y antibacteriana, protección cardiovascular, renal y del sistema nervioso central (Dinkova-Kostova y Kostov, 2012).



Figura 1. Fotografías del berro.

El berro de agua (*Nasturtium officinale*, Aiton, Figura 1) es una planta de hábitat acuático que crece en forma silvestre en aguas de lenta corriente, en manantiales, arroyos y terrenos anegados. Su nombre deriva de los vocablos latinos *nasus tortus*, “que hace torcer la nariz”, aludiendo a su sabor picante y amargo. Es ampliamente consumido en Europa donde es reconocido por sus virtudes nutricionales y medicinales.

Es una de las crucíferas que contiene la mayor concentración de GSLs por gramo además de un gran contenido de carotenos. El principal glucosinolato presente en el berro es el gluconasturtiin (GNT) el cual deriva del aminoácido fenilalanina. Mediante la acción enzimática de la mirosinasa, el GNT es hidrolizado a feniletilisotiocianato (PEITC) (Canistro y col., 2004).

Esta crucífera ha sido estudiada principalmente a nivel de sus metabolitos aislados (GNT y PEITC) en sistemas *in vitro* e *in vivo* donde se describen resultados similares a otros GSL/ITC, tales como inhibición del proceso carcinogénico *in vitro* en todas sus etapas, inducción *in vitro* de enzimas de fase II e inhibición de fase I (Rose y col., 2000); disminución de colesterol, triglicéridos, LDL y aumento de HDL; incremento de GSH y actividades de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), así como disminución de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en ratas hipercolesterolémicas (Yazdanparast y col., 2008).

En humanos, la suplementación de la dieta con el vegetal induce mayor resistencia al daño oxidativo exógeno, aumento de la actividad de SOD y GPx en individuos con genotipo GSTM1 sin modificación en la expresión de éstas y otras enzimas de defensa antioxidante (Gill y col.,

2007; Hofmann y col., 2009). Así mismo, ante ejercicio físico excesivo se observa menor daño en el ADN y niveles de peroxidación lipídica, en relación con dietas no suplementadas (Fogarty y col., 2012).

■ GENÉTICA TOXICOLÓGICA – ENSAYO COMETA.

La genética toxicológica es una rama de la genética y una especialidad de la toxicología que participa de manera esencial en el asesoramiento de efectos sobre la salud. Su interés se centra en identificar y analizar el impacto de agentes químicos, biológicos y/o físicos sobre los componentes hereditarios de los organismos vivos y proveer información precisa sobre exposición y asesoramiento de riesgo para una efectiva protección de la salud.

Los estudios en genética toxicológica se orientan con el propósito de implementar métodos para el ensayo y la evaluación del riesgo y, por otro lado, elucidar la relación entre genotoxicidad (lesión inicial inducida sobre el material genético) e iniciación de un proceso neoplásico. De esta manera, es posible definir el impacto de los agentes que se encuentran en el medio ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del patrimonio genético.

Para lograr estos objetivos se diseñan sistemas de ensayo que emplean diversos marcadores mensurables en sistemas biológicos (NRC, 1991; Grandjean, 1992). Estos biomarcadores son elementos intermedios entre la existencia de factores de riesgo y sus posibles efectos. En general son utilizados para detectar exposición y/o susceptibilidad a xenobióticos, determinar efectos biológicos así como estado de salud y enfermedad en un organismo dado. Es decir, constituyen una herramienta valiosa para prevenir, diagnosticar

y tratar enfermedades basadas en anomalías del genoma (Natarajan, 2002; Tucker y Preston, 1996).

Un biomarcador de efecto es un indicador de una alteración bioquímica, fisiológica o genética, resultado de la exposición a un agente tóxico. Se considera que un marcador de efecto biológico temprano representa un evento que puede correlacionarse con el daño a la salud y tiene una posibilidad predictiva (Grandjean, 1995). De este modo, se logra la identificación de una alteración cuando su magnitud es aún menor, es decir una advertencia temprana. Permiten determinar si un grupo de signos o síntomas conducen a un proceso patológico para así intervenir prudente y oportunamente a los fines de evitar la aparición de un daño irreversible (Grandjean, 1992).

En estudios de genotoxicidad las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuente al material genético en células individuales. Uno de los ensayos que cumple con esta premisa es la electroforesis de una sola célula o ensayo cometa.

Östling y Johanson (1984) desarrollaron el ensayo cometa o electroforesis en gel de una sola célula a pH neutro mediante el cual se detectaba daño al material genético. Sin embargo, el único tipo de daño observado eran las roturas de doble hélice dado que las uniones entre las bases nucleotídicas no se alteran a dicho pH. En 1988, Singh y colaboradores modificaron el protocolo original utilizando pH alcalino (pH>13) lo cual permitió detectar rupturas de simple y doble cadena así como también sitios álcali lábiles, sitios de reparación y enlaces cruzados ADN – ADN y ADN – proteína (cross link) aumentando así la sensibilidad del ensayo.

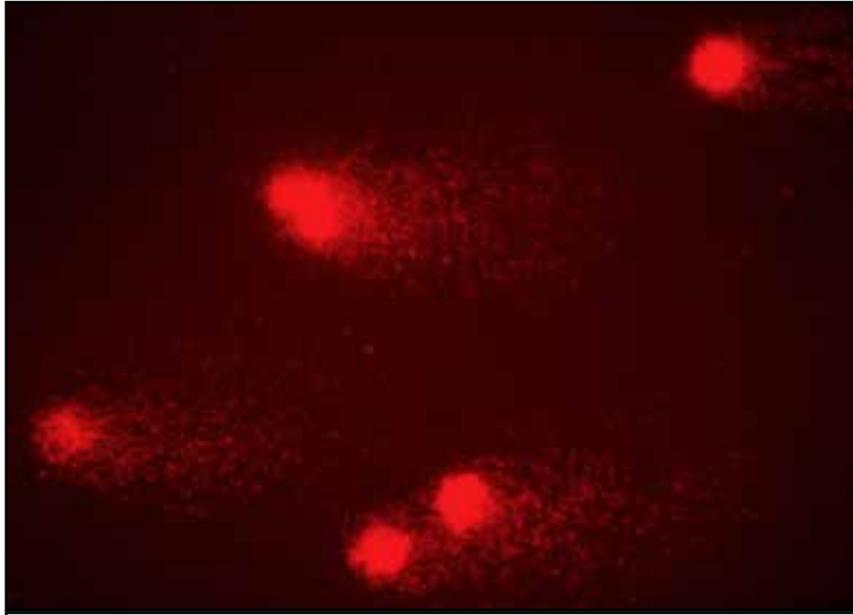


Figura 2. Imágenes de cometas obtenidas a partir de leucocitos de sangre periférica.

La metodología se basa en el estudio de células embebidas en agarosa y colocadas sobre un portaobjeto que luego son lisadas con una solución de alta concentración de sales y detergente. Las membranas y componentes solubles de las células son removidos dejando al ADN superenrollado y unido a la matriz nuclear. Los bucles de ADN que presentan cortes se relajan durante la incubación a pH alcalino; los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico bajo las mismas condiciones poniéndose en evidencia las roturas de ADN. Las imágenes observadas al microscopio de fluorescencia con un fluorocromo afín al ADN tienen la apariencia de un cometa siendo la fluorescencia relativa de material en la cola función de la frecuencia de las roturas.

Entre las ventajas de esta técnica podemos citar que, a diferencia de los otros biomarcadores descriptivos, este ensayo puede aplicarse a diversos tipos celulares sin la necesidad de trabajar con células en

proliferación (Collins, 2004; Speit y Hartmann, 2005). Las células más frecuentemente utilizadas son los leucocitos y linfocitos de sangre periférica ya que, aun no siendo el tejido blanco de ataque del agente, están en contacto directo con el sistema afectado por lo que su metabolismo y sus características nucleares y celulares pueden modificarse y así reflejar la exposición total del cuerpo. Además es una metodología simple y sensible que requiere poca

cantidad de muestra y permite obtener resultados a corto plazo. Sin embargo, una de las desventajas es su limitación para detectar agentes aneunógenos y rupturas de hebra de rápida reparación. Debe tenerse en cuenta que la muerte celular, ya sea inducida o espontánea, produce fragmentación del ADN lo cual puede interferir en el ensayo generando un falso positivo.

Si bien todavía no se encuentra validado, este ensayo es ampliamente utilizado en el área de la toxicología genética en modelos *in vitro* e *in vivo* para análisis de genotoxicidad, estudios de mecanismos de acción de xenobióticos y biomonitoreo de poblaciones expuestas a tóxicos medioambientales o del ámbito laboral.

La electroforesis de una sola célula, al igual que otros ECP, puede ser adaptada para investigar los efectos benéficos de un xenobiótico dado. La característica o acción de una sustancia para disminuir, evitar o reparar el daño en el material genético y celular se denomina antígenotoxicidad. La diferencia entre un escenario y otro dependerá del orden temporal en que sucedan el daño y la exposición al agente a evaluar.

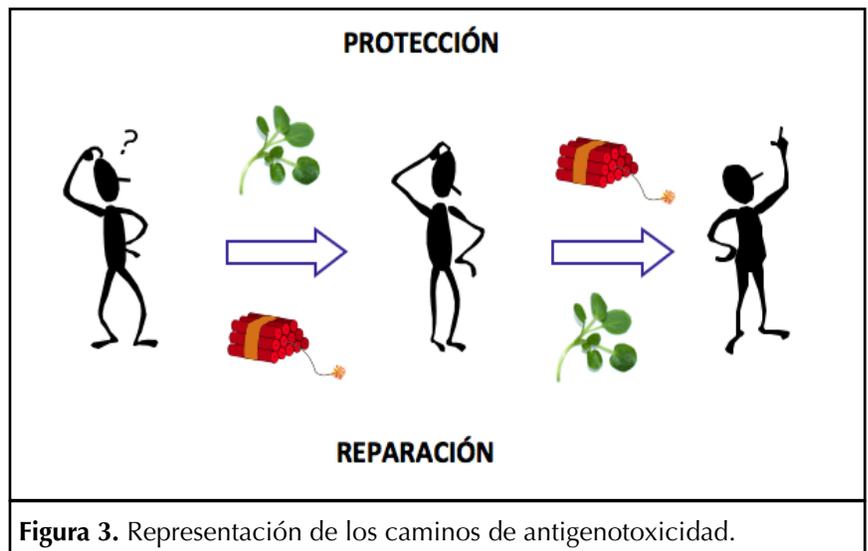


Figura 3. Representación de los caminos de antígenotoxicidad.

■ EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL POTENCIAL EFECTO PROTECTOR DEL BERRO DE AGUA.

Diversos productos naturales y sus derivados han sido estudiados en diferentes sistemas en relación a sus propiedades antioxidantes, antígenotóxicas y anticarcinogénicas (Kale y col., 2008; Prior, 2003; Surh, 2003; Thompson y col., 1999). Debido a la evidencia obtenida en muchos casos, los extractos y/o los fitoquímicos aislados se han convertido en potenciales herramientas para el área terapéutica.

Considerando el actual interés en aumentar el consumo de alimentos y plantas medicinales con potenciales características benéficas para disminuir o prevenir el impacto negativo de xenobióticos a nivel celular y genético (antigenotoxicidad), en nuestro laboratorio se realizó el estudio de la variedad local del berro de agua empleando metodologías que posibiliten evidenciar su capacidad como agente promotor de la salud.

En un principio se realizó una evaluación *in vitro* y posteriormente *in vivo* para estudiar la potencial capacidad de protección frente al daño inducido utilizando el Ensayo Cometa. Los agentes inductores de daño fueron: peróxido de hidrógeno para el estudio *in vitro* y ciclofosfomida para el *in vivo*.

El vegetal se adquirió en una huerta orgánica (Luján). Una vez lavado, secado y pesado se trituró utilizando una juguera. El producto obtenido fue centrifugado y el sobrenadante fue clarificado y esterilizado por filtración. Todos los procedimientos descriptos fueron realizados en oscuridad para preservar el material. Las concentraciones ensayadas representarían la ingesta promedio del vegetal en humanos (75-125g) correspondiente a una

concentración final de 13,2 mg/ml (A) y 26,4 mg/ml (B). El desarrollo experimental se realizó en cultivo de linfocitos de dadores sanos utilizando como control positivo H_2O_2 (50 μM) siguiendo la metodología propuesta por Singh y colaboradores (1988) con modificaciones (Casanova y Carballo, 2012).

Con el fin de establecer el beneficio potencial del consumo de este elemento de la dieta en humanos, es importante caracterizarlo en un modelo experimental como el de ratones. Para ello se utilizaron ratones Swiss machos y hembras de 7-8 semanas de edad, a los que fue administrado el jugo de berro por la misma vía de ingestión que se utiliza en humanos, o sea en forma oral. Este jugo se administró durante 15 días y también se utilizaron controles negativos y positivos, con el objeto de poder visualizar el efecto beneficioso de su consumo. (Casanova y col., 2013).

La antigenotoxicidad refiere a todo mecanismo que logre prevenir o reparar el daño ocasionado al material genético o celular por factores físicos, químicos y/o biológicos. El daño oxidativo al material genético ejerce un rol fundamental en el desarrollo de enfermedades crónicas, otras relacionadas con el envejecimiento y es considerado un probable factor carcinogénico (Moller y Loft, 2006).

El impacto de este tipo de injuria puede ser atenuado o prevenido por la ingesta de productos naturales a través de la inclusión de antioxidantes y/o por inducción de mecanismos de defensa. En el presente trabajo se evaluó las potenciales propiedades del jugo de berro como agente protector del daño inducido empleando el ensayo cometa.

Las especies reactivas del oxí-

geno, entre ellas el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) así, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), son moléculas altamente reactivas. Los efectos que producen dependerán del tipo celular, la concentración y la duración de la exposición a dichas especies. Principalmente, las acciones deletéreas se manifiestan en daño al ADN, proteínas y lípidos. Respecto al ADN, cabe destacar que ni el $O_2^{\bullet-}$ ni el H_2O_2 pueden atacar directamente a la doble hélice sino que el daño es ejercido por el OH^{\bullet} . Las lesiones incluyen rupturas de simple y doble hebra, oxidación de bases, enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteínas (Halliwell y Aruoma, 1991).

En los primeros estudios pudimos poner en evidencia que cuando el jugo de berro está presente en el cultivo de linfocitos, se observa que el jugo previene el daño inducido por el oxidante que nosotros habíamos agregado desde los primeros tiempos de exposición. Es de hacer notar que aunque trabajamos con dos concentraciones diferentes, ambas presentaron el mismo comportamiento, de forma tal que se pone en evidencia que el jugo de berro protege del daño inducido, demostrando su acción antigenotóxica potencial.

Nuestros resultados son congruentes con aquellos reportados por otros grupos; Zhu y Loft demostraron que un extracto de repollitos de Bruselas, miembro de la familia Cruciferae, disminuía el daño inducido por el mismo agente (2001). De igual manera, Gill y colaboradores postularon que la suplementación de la dieta con una porción diaria de berro estaría asociada a mayor resistencia al daño oxidativo (2007).

Teniendo en cuenta estos resultados decidimos entonces estudiar el potencial protector del jugo de berro

en roedores frente a un agente mutagénico utilizando el test del cometa en sangre periférica de ratón

En este caso, otra vez teníamos que usar una droga que fuera capaz de provocar un daño en el material genético de los animales, de forma tal que luego de la administración a los ratones del jugo de berro, pudiéramos comprobar si ese daño disminuía.

Para ello elegimos la ciclofosfamida (CF), que es un agente alquilante bifuncional perteneciente a la familia de las mostazas nitrogenadas y actúa como mutágeno indirecto, es decir, es imprescindible que la molécula sea metabolizada para generar sus efectos tóxicos. La prodroga se convierte en productos con actividad citotóxica alquilante mediante el sistema de oxidasas mixtas P450 dependientes. Se transforma en 4-hidroxíciclofosfamida y aldofosfamida la cual genera acroleína y fosfaramida, entre otros (Florez y col., 1998). Al interactuar con el ADN, estas moléculas forman monoaductos y enlaces cruzados entre las hebras que interfieren en la síntesis del mismo y provocan fallas en los mecanismos de reparación aumentando el riesgo de ocurrencia de retardos anafásicos (Gilani y Chatzinoff, 1983; Enns y col., 1999). Así mismo, inducen estrés oxidativo y muerte celular.

Luego de administrar durante 15 días el jugo de berro a los ratones pudimos observar que la suplementación de la dieta disminuyó el daño producido por la ciclofosfamida en el material genético.

Otra vez, como los estudios que habíamos hecho en el cultivo de linfocitos, encontramos que las dos concentraciones estudiadas del jugo de berro, producen un efecto similar y en este caso es aún más importan-

te, ya que dentro de las dosis que estudiamos se encuentra la máxima permitida en ensayos de genotoxicidad de productos de consumo para humanos (OECD, 1997; Hartmann y col., 2003). Por el contrario, las concentraciones ensayadas en el cultivo de linfocitos representan la ingesta promedio del vegetal para un adulto promedio. Estas últimas son muy superiores a las primeras lo cual pone en evidencia la gran capacidad de la planta como agente quimiopreventivo.

La evaluación del berro *in vivo* avaló los resultados obtenidos en los modelos *in vitro*; es decir, se puso de manifiesto la capacidad de este alimento de prevenir la injuria inducida, en este caso por la ciclofosfamida en células de sangre periférica de ratón.

El análisis de la composición de la planta o de los productos derivados de la misma constituye una herramienta importante al momento de diseñar protocolos y/o formular una conclusión. En nuestro caso, el estudio del berro se realizó en forma colaborativa con distintos grupos de investigación. La concentración total de glucosinolatos fue 15 $\mu\text{M/g}$ de peso seco de los cuales el 89% corresponde a gluconasturtiin, el 8% a tres tipos de glucosinolatos indólicos y el porcentaje restante a tres metilsulfinaquilo glucosinolatos. De acuerdo a estas investigaciones las concentraciones ensayadas *in vitro* corresponderían a 1,15 μM y 0,577 μM de PEITC, respectivamente.

Para completar el análisis se efectuaron determinaciones de fitoquímicos que son comunes a todas las plantas como fenoles, taninos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales. Por gramo de material fresco se obtuvieron $285 \pm 20 \mu\text{g}$ de fenoles, $42 \pm 14 \mu\text{g}$ de taninos, $146 \pm 3,5 \mu\text{g}$ de flavonoides y $100 \pm 6,8$

μg de ácidos hidroxicinámicos.

El mecanismo de antigenotoxicidad podría estar relacionado con cambios en el estado oxidativo celular. Esta hipótesis se basa en la gran variedad de fitoquímicos del berro que pueden interactuar con las vías o moléculas vinculadas con el balance redox. Sin embargo, la situación más factible es la combinación de diferentes blancos y mecanismos.

La concentración de glucosinolatos y de otros fitoquímicos permite inferir los mecanismos subyacentes de los hallazgos presentados en este trabajo. Los mismos avalan al berro como elemento de la dieta que presenta características promisorias para ser utilizado como agente promotor o protector de la salud.

■ AGRADECIMIENTOS.

Los autores expresan su agradecimiento al Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por su colaboración en el desarrollo del diseño experimental. El trabajo realizado empleando sangre humana fue realizado con el consentimiento informado. Ambos estudios fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Este trabajo fue realizado en el marco del subsidio UBACYT 20020100100123 2011-2014 de la Universidad de Buenos Aires.

■ BIBLIOGRAFÍA.

Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, Leschik-Bonnet E, Müller M, Oberritter H, Schulze M, Stehle P, Watzl B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition* 51: 637–663.

Canistro D, Della Croce C, Iori R, Barillari J, Bronzetti G, Poi G,

- Cini M, Caltavuturo L, Perocco P, Paolini M. (2004). Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from cruciferae. *Mutation Research* 545: 23–35.
- Casanova N, Carballo MA. (2012). Antigenotoxic activity of Watercress extract in an in vitro mammalian system using comet assay. *Phytotherapy Research* 25: 1743-1746.
- Casanova NA, Ariagno JI, López Nigro MM, Mendeluk GR, Gette MA, Petenatti E, Palaoro LA, Carballo MA (2013) In vivo antigenotoxic activity of watercress juice (*Nasturtium officinale* L.) against induced DNA damage. *Journal of Applied Toxicology* 33: 880-885.
- Collins A. (2004). Review: The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26:249–60.
- Dinkova-Kostova A, Kostov R. (2012). Review: Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 18: 337-347.
- Enns G, Roeder E, Chan R, Ali-Khan Catts Z, Cox C, Golabi M. (1999). Apparent cyclophosphamide (cytoxan) embryopathy: a distinct phenotype? *American Journal of Medical Genetics* 86: 237-241.
- Florez J, Armijo J, Mediavilla Á. (1998). *Farmacología humana*. 3º edición. Editado por Masson, Barcelona, España.
- Fogarty M, Hughes C, Burke G, Brown J, Davison G. (2012) Acute and chronic watercress supplementation attenuates exercise-induced peripheral mononuclear cell DNA damage and lipid peroxidation. *British Journal of Nutrition* 109: 293-301.
- Gilani S, Chatzinoff M. (1983). Embryopathic effects of cyclophosphamide. *Environmental Research* 31: 296-301.
- Gill C, Haldar S, Boyd L, Bennett R, Whiteford J, Butler M, Pearson J, Bradbury I, Rowland I. (2007). Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 85: 504-510.
- Grandjean P. (1992). Individual susceptibility to toxicity. *Toxicology Letter* 64/65: 43-51.
- Grandjean P. (1995). Biomarkers in epidemiology. *Clinical Chemistry* 41: 1800-1803.
- Halliwell B, Aruoma O. (1991). Review letter: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letter* 281: 9-19.
- Hartmann A, Aguerri E, Beepers C, Brender-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18: 45-51.
- Higdon J, Delage B, Williams D, Dashwood R. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacology Research* 55: 224-236.
- Hofmann T, Kuhnert A, Schubert A, Gill C, Rowland I, Pool-Zobel B, Gleis M. (2009). Modulation of detoxification enzymes by watercress: in vitro and in vivo investigations in human peripheral blood cells. *European Journal of Nutrition* 48: 483–491.
- Kale A, Gawande S, Kotwal S. (2008). Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research* 22: 567–577.
- Key T, Schatzkin A, Willet W, Allen N, Spencer E, Travis R. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutrition* 7:187-200.
- Kim M, Park J. (2009). Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. *Proceedings of the Nutrition Society* 68: 103–110
- Liu R. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 15-16: 3479-3485.
- Møller P, Loft S. (2006). Review article: Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biology and Medicine* 41: 388–415.
- Natarajan A, Obe G, van Zeeland A, Palitti F, Meijers M, Verdegaal-Immerzeel E. (1980). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations II. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutation Research* 69: 293-305.
- National Research Council. (1991). *Environmental epidemiology public health and hazardous wastes, VII biologic markers in studies of hazardous-waste sites*. National Academic Press 219-255.

- Organization for Economic Co-operation and Development. (1997). OECD Guideline for the testing of chemicals Nº 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Disponible en: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948442.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Consulta mixta OMS/FAO de expertos en régimen alimentario, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916_spa.pdf
- Östling O, Johanson K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* 123: 291-298.
- Prior R. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 570S-578S
- Rose P, Faulkner K, Williamson G, Mithen R. (2000). 7-methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinylloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* 21: 1983-1988.
- Singh N, McCoy M, Schneider E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
- Speit G, Hartmann A. (2005). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods of Molecular Biology* 291: 85-95.
- Surh Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 3: 768-780.
- Thompson H, Heimendinger J, Haegele A, Sedlacek S, Gillette C, O'Neill C, Wolfe P, Conry C. (1999). Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 20: 2261-2266.
- Traka M, Mithen R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Review* 8: 269-282.
- Tucker J, Preston R. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research* 365: 147-159.
- Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardastani A. (2008). Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chemico-Biological Interactions* 172:176-184.
- Zhu C, Loft S. (2001). Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 39: 1191-7.
- cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.
- Ciclofosfamida:** es un fármaco antineoplásico que también tiene propiedades inmunosupresoras y pertenece a la familia de los agentes alquilantes.
- Ensayo cometa:** También conocido como ensayo de electroforesis en gel de una sola célula, es una metodología sencilla y sensible para la detección de daño de simple y/o doble cadena en el ADN en células eucariotas. Tiene amplia aceptación como un método estándar para evaluar daño y reparación en el ADN y biomonitorio de poblaciones expuestas.
- Especies reactivas del oxígeno:** son moléculas muy pequeñas altamente reactivas. Se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno, tienen un rol importante en la señalización celular y su aumento puede llevar a daños significativos que resultan en estrés oxidativo.
- Fitoquímicos:** Los fitoquímicos son sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida pero tienen efectos positivos en la salud. Se encuentran naturalmente en frutas, vegetales, legumbres, granos enteros, semillas, hierbas y especias.
- Genotóxico:** agente cuya acción utiliza como blanco de ataque el material genético.
- Glucosinolatos:** metabolitos secundarios de las plantas. Son los precursores de los isotiocianatos.
- Glutation (GSH):** es un tripéptido no proteínico que deriva de los aminoácidos. Es un antioxidante y ayuda a

■ GLOSARIO

Antigenotóxico: se denomina a cualquier agente capaz de evitar o revertir el efecto de un agente genotóxico. Se puede manifestar como procesos de protección y/o reparación de un xenobiótico.

Catalasa (CAT): es una enzima que

proteger a las células de especies reactivas de oxígeno, como radicales libres y peróxidos.

Glutation peroxidasa: es una de las enzimas que participan en las transformaciones de especies reactivas del oxígeno, catalizando la reducción del peróxido o lipoperóxido, para lo cual utiliza como agente reductor al glutatión reducido. Esta enzima desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos.

Glutation reductasa: es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido. Esta enzima juega un importante papel en la defensa antioxidante y debido a su presencia en los diferentes tejidos y órganos está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades.

Isotiocianatos: son fitoquímicos presentes en las crucíferas (coliflor, repollitos, brócoli, entre otros). Participan en la eliminación de toxinas y refuerzan las defensas antioxidantes de las células. Son los responsables

del sabor y olor característico de las crucíferas

Peroxidación lipídica: la lipoperoxidación está relacionada a la degradación oxidativa de los lípidos y en la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poli-insaturados.

Superóxido dismutasa (SOD): es una enzima que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y debido a ello es una importante defensa antioxidante en las células expuestas al oxígeno.

EFECTOS TÓXICOS DE LOS FÁRMACOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Un problema frecuente en la quimioterapia de las enfermedades tropicales

Palabras clave: tripanosomiasis americana; Benznidazol; enfermedad de Chagas; quimioterapia; Nifurtimox.
Key words: American trypanosomiasis; Benznidazole; Chagas' disease; chemotherapy; Nifurtimox.

Dos fármacos están disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox y Benznidazol. Nifurtimox es un nitrofurano y Benznidazol es un compuesto nitroimidazólico. El uso de estas drogas para tratar la fase aguda de la enfermedad está ampliamente aceptado. Sin embargo, su uso en el tratamiento de la fase crónica es controvertido. Los efectos colaterales indeseables de ambas drogas son un inconveniente mayor en su uso que frecuentemente fuerza a los médicos a detener el tratamiento. Las reacciones adversas más frecuentes observadas en el uso del Nifurtimox son: anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad, insomnio, manifestaciones digestivas tales como náusea o vómitos y ocasionalmente cólico intestinal y diarrea. En el caso del Benznidazol, las manifestaciones cutáneas son las más notorias (es decir, hipersensibilidad, dermatitis con erupciones cutáneas, edema generalizado, fiebre, linfo-adenopatía, dolor articular y muscular), siendo las manifestaciones más severas depresión de la médula ósea, púrpura trombocitopénica y agranulocitosis. Los estudios de toxicidad experimentales con Nifurtimox evidenciaron neurotoxicidad, daño testicular, toxicidad ovárica y efectos deletéreos en corazón, tejido mamario, adrenal, colon y esófago. En el caso del Benznidazol, se observaron efectos deletéreos en adrenales, colon y esófago. Este compuesto también inhibe el metabolismo de varios xenobióticos transformados por el sistema del citocromo P450 y sus metabolitos reactivos reaccionan con los componentes fetales in vivo. Ambas drogas exhibieron efectos mutagénicos significativos y se demostró en algunos estudios que eran carcinogénicas o tumorigénicas. Los efectos tóxicos de ambos derivados nitroheterocíclicos requieren la reducción enzimática de su grupo nitro. Aquellos procesos son mediados fundamentalmente por la reductasa del citocromo P450 y por el mismo citocromo P450. Otras enzimas tales como la xantina oxidoreductasa o la aldehído oxidasa pueden estar involucradas también.

Two drugs are available for the etiological treatment of Chagas disease, Benznidazole and Nifurtimox. Nifurtimox is a nitrofuran and Benznidazole is a nitroimidazole compound. The use of these drugs for treating the acute phase of the disease is now widely accepted. However, its use in the treatment of chronic phase is controversial. The undesirable side effects of both drugs are a major drawback in their use, which often force physicians to stop treatment. The most common adverse reactions observed in the use of Nifurtimox are anorexia, weight loss, psychic disorders, excitability, insomnia, digestive symptoms such as nausea or vomiting and occasionally diarrhea and intestinal colic. In the case of Benznidazole cutaneous manifestations are the most notorious (ie. hypersensitivity, dermatitis, rash, generalized edema, fever, lymphadenopathy, joint and muscle pain), the most severe manifestations depression of bone marrow, thrombocytopenic purpura and agranulocytosis. For Nifurtimox experimental studies showed neurotoxicity, testicular damage, ovarian toxicity and deleterious effects in heart, breast tissue, adrenals, colon and esophagus. In the case of Benznidazole, deleterious effects were observed in adrenal, colon and esophagus. This compound also inhibits the metabolism of various xenobiotics transformed by cytochrome P450 and its reactive metabolites react with fetal components in vivo. Both drugs exhibited significant mutagenic effects, demonstrating in some studies that were carcinogenic or tumorigenic. Toxic effects of both drugs require enzymatic reduction of the nitro group. Those metabolic processes are primarily mediated by cytochrome P450 reductase and by the same cytochrome P450. Other enzymes such as xanthine oxidoreductase or aldehyde oxidase may also be involved.

José A. Castro

Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX-UNIDEF). CITEDEF.
Juan B. de La Salle 4397, B1603ALO Villa Martelli, provincia de Buenos Aires.
jcastro@citedef.gob.ar

Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de General San Martín (31A-UNSAM). Av. 25 de Mayo y Francia, 1650 San Martín, provincia de Buenos Aires.

jcastro@unsam.edu.ar

■ LA ENFERMEDAD Y SU RELEVANCIA SOCIAL Y ECONÓMICA.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es una enfermedad parasitaria que es endémica en algunas áreas de América Central, América del Sur y México, donde una cantidad estimada en más de siete millones de personas se hallan infectadas con el *Trypanosoma cruzi*. Más allá de esto, decenas de millones viven en riesgo de infección (Moncayo y Silveira, 2009; World Health Organization, 1991). Esta enfermedad fue descrita por Carlos Chagas en 1909 y fue denominada en su honor. En 1993 el Banco Mundial consideró a la enfermedad de Chagas como la enfermedad parasitaria que tenía más impacto socioeconómico significativo, medido como "años de vida ajustados en incapacidad" (DALY), que todas las otras enfermedades infecciosas parasitarias actualmente presentes en la región (Pinto Dias, 2000, 2003; World Bank, 1993).

Usualmente, la infección es debida a insectos vectores que transportan al *T. cruzi* en sus intestinos. Estos insectos pertenecen a la subfamilia *Triatominae*, los cuales poseen hábitos hematófagos y generalmente defecan inmediatamente después de morder a una víctima dormida durante la noche (frecuentemente niños pequeños debido a que ellos están indefensos). Luego de despertarse, la víctima comúnmente se rasca la mordida que pica y, como resultado, las heces infectadas del triatomino encuentran su camino dentro de la corriente sanguínea del huésped a través de una herida de mordida en la piel o a través de la membrana mucosa intacta o la conjuntiva (Allison, 1993; Aufderheide y cols., 2004; Barret y cols., 2003; Pinto Dias, 2000, 2003; Rassi y cols., 2000; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; World Bank, 1993). Las for-

mas infectivas del parásito alcanzan diferentes células en los tejidos, donde se transforman en la forma amastigota intracelular. Esta forma se multiplica y finalmente causa una explosión de la célula huésped, seguida por la liberación de parásitos a la circulación. Allí, se diferencian a la forma tripomastigota flagelada, la cual está lista para invadir nuevas células, repitiendo así el ciclo. De estos ciclos alternantes de infección resultan varias lesiones tisulares.

Además del modo de infección por transporte mediante el vector, que explica cerca del 80-90% de la transmisión de la enfermedad, hay otras posibilidades tales como la transfusión de sangre o la transmisión congénita. Se piensa que estas formas explican el 5-20% y el 0,5-8% de los casos, respectivamente. Hay otras formas menos comunes de infección tales como la oral (a partir de comidas o bebidas infectadas) o el trasplante de órganos infectados (Allison, 1993; Aufderheide y cols., 2004; Barret y cols., 2003; Pinto Dias, 2000, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; World Bank, 1993).

La migración de latinoamericanos infectados desde sus áreas rurales endémicas originales hacia áreas urbanas, dentro de sus propios países o a países europeos o a EE.UU. buscando un progreso socioeconómico, ha traído como consecuencia dos problemas: la posible transmisión de la enfermedad a través de la transfusión de sangre o el trasplante de órganos (Pinto Dias y cols., 2002; Moraes-Souza, 1999; Rassi y cols., 2000). Se ha reportado la transmisión de la infección por el *T. cruzi* a través de trasplantes de órganos en América Latina (Carvalho y cols., 1997) y en un país no endémico como EE.UU., donde se mencionó la aparición de varios casos (Chin-Hong y cols., 2011).

La transmisión congénita de la infección por *T. cruzi* podría ser relevante por muchos años tanto en áreas endémicas como en no endémicas por igual. En algunos países, como Uruguay, Paraguay y Argentina, se han implementado programas a nivel nacional en los cuales cada mujer embarazada es investigada serológicamente para la infección por *T. cruzi*, proveyendo una guía diagnóstica en el nacimiento para un tratamiento rápido (Aufderheide y cols., 2004; Pinto Dias, 2000, 2003; Pinto Dias y cols., 2002; Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

La transmisión oral de la infección por el *T. cruzi* causada por ingestión de tripomastigotas no es común pero es posible. Se ha podido demostrar en animales experimentales y accidentes de laboratorio (Aufderheide y cols., 2004). En resumen, hay múltiples maneras de adquirir la infección por *T. cruzi*, cada una de las cuales posee una probabilidad diferente de ocurrencia de acuerdo con las diferentes situaciones.

La fase aguda de la enfermedad comienza inmediatamente luego de la infección, con independencia del modo específico de infección. Podría durar de semanas a meses y es típicamente asintomática o está asociada con fiebre y otras manifestaciones moderadas, no específicas. Sin embargo, pueden ocurrir miocarditis o meningo-encefalitis con serio riesgo para la vida durante esta fase, particularmente en niños y personas inmunocomprometidas. La tasa de defunción causada por estos síntomas severos es del 10% (Aufderheide y cols., 2004; Pinto Dias, 2000, 2003; Pinto Dias y cols., 2002; Rassi y cols., 2000; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; World Health Organization, 1991).

Después de años o décadas de infección subclínica, entre un 10 y

un 50% de los sobrevivientes (dependiendo del área endémica y del modo de infección) del estado agudo desarrollan enfermedad de Chagas crónica, la que se caracteriza por una cardiopatía potencialmente letal o megasíndromes (es decir, megasófago o megacolon) (Aufderheide y cols., 2004; Pinto Dias, 2000, 2003; Pinto Dias y cols., 2002; Rassi y cols., 2000; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; World Health Organization, 1991). Es importante enfatizar que incluso las personas que permanecen asintomáticas pueden ser infecciosas de por vida, con bajos niveles de parásitos en sangre y en otros tejidos (Aufderheide y cols., 2004; Pinto Dias, 2000, 2003; Pinto Dias y cols., 2002; Rassi y cols., 2000; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; World Health Organization, 1991).

Desde el punto de vista del análisis de la fase crónica, es importante tener en cuenta cuanto tiempo ha pasado desde que se ha adquirido la infección. Se considera una "fase crónica reciente" cuando la infección ocurrió en los últimos diez años o si las víctimas son niños menores de 12 años (Rodrigues Coura y de Castro, 2002). Los pacientes con más de diez años de infección se consideran "casos crónicos tardíos". Para disminuir el riesgo de morbilidad y mortalidad, las per-

sonas infectadas deberían ser tratadas lo más tempranamente posible en el curso de la infección con las drogas disponibles aprobadas. Una respuesta favorable a ellas depende críticamente del estadio de desarrollo de la enfermedad cuando se hace el tratamiento.

■ TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Desde los últimos años de la década del sesenta dos drogas nitroheterocíclicas han estado disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas: un nitrofurano, el Nifurtimox (3-metil-4-(nitrofurfurilidenamina)-tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) y un nitroimidazol, el Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) (ver fórmulas en Figuras 1). El uso de estos fármacos para tratar la fase aguda de la enfermedad es ampliamente aceptado. Con independencia del mecanismo de la infección, el paciente debe ser tratado, ya que cerca del 60% de ellos pueden ser curados en esta fase (Pinto Dias, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; Urbina y Docampo, 2003). Sin embargo, el uso de estas drogas en la fase crónica de la enfermedad permanece como un tema controvertido.

Una razón para la controversia reside en el tiempo en que se realiza el tratamiento en relación con el tiempo al cual ocurrió la infección. El tratamiento etiológico de los pacientes en la "fase crónica reciente" de la enfermedad ofrece una prognosis mejor que el de aquellos en los cuales el tratamiento se hace en la "fase crónica tardía" (Pinto Dias, 2003; Muñoz y cols., 2013; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; Sosa-Estani y cols., 2009; Urbina y Docampo, 2003). La efectividad de estas drogas nitroheterocíclicas es mejor para las formas infectadas extracelulares del *T. cruzi* presentes en la fase aguda que para las formas intracelulares que causan la enfermedad crónica (Castro, 2000; Pinto Dias, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002; Steverding y Tyler, 2005; Urbina y Docampo, 2003).

Una cuestión importante en el tratamiento con estas dos drogas es que su eficiencia quimioterápica varía en los pacientes que provienen de diferentes áreas geográficas. Este comportamiento se debe probablemente a la infección con cepas de *T. cruzi* que poseen diferentes respuestas a las drogas (Rodrigues Coura y de Castro, 2002; Urbina y Docampo, 2003). Respecto a esto es relevante también tener en cuenta que las cepas de *T. cruzi* resistentes a una de las dos drogas son también resis-

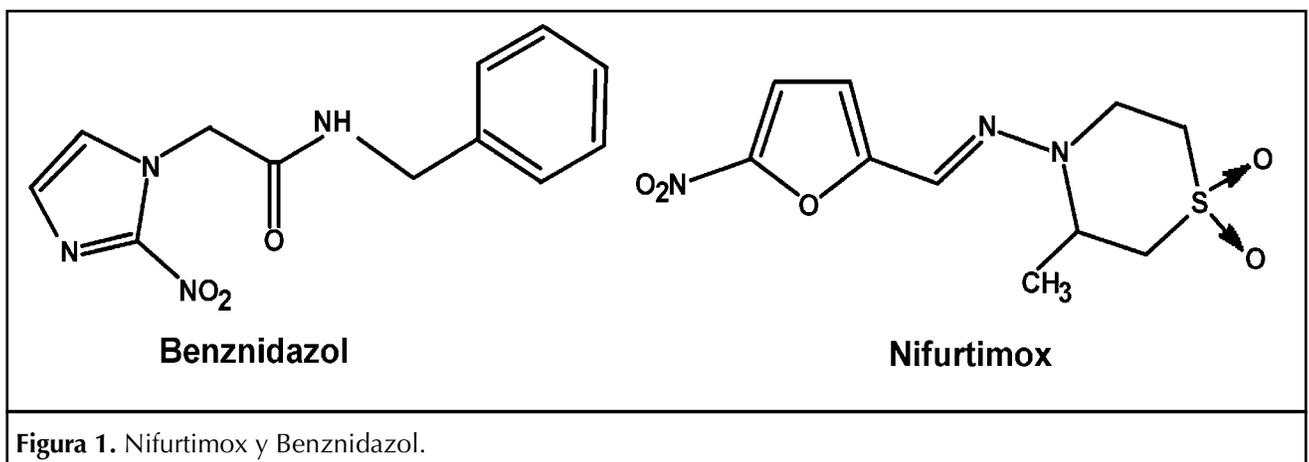


Figura 1. Nifurtimox y Benznidazol.

tentes a la otra (Pinto Dias, 2003). La resistencia del *T. cruzi* al Benznidazol se correlaciona con la depleción de las copias del gen de la “enzima amarilla vieja” (una NADPH flavina oxido-reductasa) (Murta y cols., 2006).

La selección de uno u otro fármaco para el tratamiento de un paciente no debería determinarse por la respuesta diferente del parásito sino por la mejor tolerancia hacia una de las drogas (Pinto Dias, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002). Los efectos indeseables de estos fármacos son un inconveniente mayor en su uso, lo cual frecuentemente fuerza al médico a suspender el tratamiento (Castro, 2000; Pinto Dias, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

El Benznidazol hoy es considerado por la Organización Mundial de la Salud como un “medicamento esencial”. La Organización Mundial de la Salud define a los medicamentos esenciales como “aquellos que satisfacen las necesidades de la mayor parte de la población y que por lo tanto deben estar disponibles en todo momento, en cantidades adecuadas, en formas de dosificación apropiadas y a un precio que esté al alcance del individuo y de la comunidad” (World Health Organization, 2013).

Ahora, todos los países de América pueden acceder al principal tratamiento para la enfermedad de Chagas a través del fondo estratégico de la Organización Panamericana de la Salud.

La producción del Benznidazol, que se había discontinuado a nivel mundial en 2011, actualmente está garantizada por el consorcio argentino que en marzo del año pasado resolvió esta crisis de stock. Se comenzó a producir en el país en mar-

zo de 2012 por una iniciativa público privada que reúne al Ministerio de Salud de la Nación, una fundación, una empresa química de síntesis y un laboratorio farmacéutico, responsable de la formulación, inscripción y distribución.

■ EFECTOS LATERALES TÓXICOS DEL NIFURTIMOX Y EL BENZNIDAZOL OBSERVADOS CLÍNICAMENTE.

Médicos y pacientes han reportado efectos colaterales indeseables serios del Nifurtimox y Benznidazol durante su uso clínico. Los efectos observados más frecuentemente fueron anorexia y pérdida de peso, náuseas y vómitos, excitación nerviosa, insomnio, depresiones psíquicas, convulsiones, desequilibrio con vértigo, desorientación, olvidos, parestesias, adinamia, fenómenos acústicos e intolerancia al alcohol. Todos se han descrito en detalle en las revisiones disponibles en la literatura (Castro, 2000; Pinto Dias, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

Rodrigues Coura y de Castro señalaron que los efectos adversos más frecuentes del tratamiento con Nifurtimox fueron: anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad o insomnio, manifestaciones digestivas tales como náuseas y vómitos y, ocasionalmente, cólico intestinal y diarrea (Rodrigues Coura y de Castro, 2002). De acuerdo con los autores, la frecuencia y seriedad de los efectos tóxicos observados clínicamente con el Benznidazol eran diferentes en intensidad y tipo. En este caso, eran más notorias las manifestaciones dérmicas (hipersensibilidad, dermatitis con erupciones cutáneas) además de edema generalizado, fiebre, linfadenopatía, y dolor articular y muscular (Rodrigues Coura y de Castro, 2002). La depresión de la médula ósea, la púrpura trombocitopénica y la agra-

nulocitosis eran las manifestaciones más severas. También se reportaron polineuropatías, parestesias y polineuritis. De acuerdo con Rodrigues Coura y de Castro, las dos complicaciones más serias inducidas por el Benznidazol son la agranulocitosis, iniciada por neutropenia, dolor de garganta, fiebre y septicemia y la púrpura trombocitopénica caracterizada por reducción de las plaquetas, petequias, ampollas hemorrágicas e incluso sangrado en mucosas (Rodrigues Coura y de Castro, 2002). En general, las manifestaciones de toxicidad en piel y médula ósea son más intensas para el Benznidazol, mientras que aquellas en el sistema nervioso (es decir, anorexia, cefalea, excitación psíquica, pérdida de peso, polineuropatía, vómitos, insomnio) son más intensas con el Nifurtimox (Castro, 2000; Pinto Dias, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

■ TOXICIDAD DEL NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL EN SISTEMAS EXPERIMENTALES.

Para el tiempo en que estas dos drogas fueron introducidas al uso clínico regular, las exhaustivas y detalladas investigaciones toxicológicas preclínicas realizadas por Bayer con el Nifurtimox estaban disponibles en la literatura (Hoffmann, 1972; Lorke, 1972; Steinhoff y Grundmann, 1972).

Incluían la toxicidad aguda en diferentes especies; la toxicidad subcrónica en la rata por encima de las 26 y 13 semanas; estudios subcrónicos de neurotoxicidad en gallinas; toxicidad crónica en el perro luego de administración oral por 52 semanas; y estudios de la influencia del Nifurtimox sobre la espermatogénesis en el ratón (Hoffmann, 1972). Fueron reportados más estudios relacionados con investigaciones sobre embriotoxicidad y teratogenici-

dad en el ratón, además de fertilidad y comportamiento reproductivo general en la rata (Lorke, 1972).

El material publicado disponible para el Nifurtimox también incluye los resultados de una prueba de carcinogenicidad luego de su administración oral y subcutánea en ratas (Steinhoff y Grundmann, 1972), parámetros farmacocinéticos relevantes (Duhm y cols., 1972; Medenwald y cols., 1972) y, más importante, los resultados de ensayos clínicos en pacientes infectados agudos y crónicos (Wegner y Rohwedder, 1972).

En el resumen de los resultados de las investigaciones toxicológicas, los autores reportaron que la DL50 del Nifurtimox estaba entre 3000 y 4000 mg (oral) para ratas y ratones (Hoffmann, 1972). Interesante es notar que las ratas tratadas con 1000 mg/kg (oral) tuvieron que ser discontinuadas luego de sólo una semana debido a la aparición de síntomas severos de toxicidad del SNC. En los estudios toxicológicos subcrónicos, la dosis más alta, de 400 mg/kg, resultó en síntomas neurológicos severos que causaron la muerte de 6 de las 25 ratas hembra en sólo la tercera semana de tratamiento (Hoffmann, 1972). Los estudios histopatológicos hechos en estos animales revelaron cambios degenerativos, especialmente en los núcleos del cerebro (Hoffmann, 1972). La cesación del tratamiento fue seguida por restitución. Diez semanas después del fin del tratamiento hubo evidencias de una cura defectuosa: espongirosis, proliferación de células de la glía, disminución en el número de células nerviosas y dilatación de los capilares cerebrales (Hoffmann, 1972).

En aquellos estudios tempranos de toxicidad del Nifurtimox en ratones se observó inhibición de la espermatogénesis. En los túbulos

seminíferos había espermatogonias mostrando núcleos picnóticos pero no había células espermáticas maduras. Sin embargo, los efectos fueron descritos como reversibles a las nueve semanas luego del tratamiento (Hoffmann, 1972). Estudios de nuestro laboratorio evidenciaron que el Nifurtimox produce efectos deletéreos intensos en las células de Sertoli a nivel ultraestructural en el retículo endoplásmico y las mitocondrias, al igual que en la membrana perinuclear, pero también alteraciones en forma y configuración de las espermátides y los espermatozoides maduros. Las alteraciones inducidas por Benznidazol eran similares en naturaleza pero bastante menos intensas y frecuentes (Bernacchi y cols., 1986).

Se realizaron experimentos adicionales con respecto a la embriotoxicidad del Nifurtimox en ratas y ratones al igual que estudios sobre los efectos en la fertilidad y el comportamiento reproductivo en general (Lorke, 1972). Se encontró que todas las dosis orales desde 20 a 125 mg/kg perjudicaban a las ratas preñadas. A pesar del perjuicio, sin embargo, no se inducían malformaciones (Lorke, 1972). Las dosis mayores (50 y 125 mg/kg) resultaron en una reducción dependiente de la dosis en el peso corporal de los fetos de las ratas. Para evaluar el efecto del Nifurtimox sobre el comportamiento reproductivo general de las ratas jóvenes de ambos sexos, distintos regímenes de dosis de la droga se administraron en el alimento por varias semanas. Las dosis por encima de 300 ppm no dañaron a las ratas hembra o macho y no perjudicaron su habilidad para reproducirse (Lorke, 1972). Sin embargo, a 600 ppm las ratas macho se tornaron incapaces de reproducirse. Después de suspender el tratamiento, este efecto no fue reversible, incluso después de largos períodos (Lorke, 1972). No hay disponible en

la literatura información equivalente para el caso del Benznidazol.

Nuestro laboratorio, sin embargo, realizó algunos experimentos que podrían ser relevantes para evaluar la toxicidad reproductiva de estas dos drogas. En efecto, reportamos que la administración tanto de Nifurtimox como de Benznidazol a ratas hembra producía efectos degenerativos ultraestructurales en los diferentes tipos de células del ovario. Alteraciones específicas tales como hinchazón, disrupción, desorganización y pérdida de los componentes de la matriz fueron observadas en las mitocondrias ováricas (de Castro y cols., 1989).

En estudios adicionales pudimos observar que cuando se administra Benznidazol marcado con radioactividad ($[^{14}\text{C}]$ -Benznidazol) oralmente a ratas en el día 20 de la preñez, la droga era absorbida rápidamente, cruzaba la barrera placentaria y llegaba a los fetos. Encontramos también que bajo aquellas circunstancias los metabolitos reactivos del Benznidazol se unían no sólo a las proteínas maternas sino también a las fetales (de Toranzo y cols., 1984). Esto sugiere un riesgo potencial para la ocurrencia de alteraciones en los fetos. Deberían preverse problemas toxicológicos para los recién nacidos lactantes si las madres alimentan a pecho a sus crías cuando están siendo tratadas con una de estas drogas, ya que tanto el Benznidazol como el Nifurtimox llegan al tejido mamario para pasar a través de la leche al recién nacido alimentado a pecho (Aguilar y cols., 1990; Duhm y cols., 1972).

Basándose en pruebas de laboratorio, hallazgos histológicos y macroscópicos se estableció una dosis oral sin efecto de 25 mg/kg durante tres semanas de Nifurtimox en aquellos estudios tempranos (Hoffmann,

1972). Esto es de interés considerando el hecho de que se encontraron concentraciones locales mayores de Nifurtimox en los riñones y el hígado al igual que en la piel, pulmones, glándulas suprarrenales, glándula tiroideas, pared de la aorta y glándula de Cowper (sin tomar en cuenta el tracto gastrointestinal, donde la excreción tuvo lugar luego de una dosis única de Nifurtimox) (Duhm y cols., 1972). Nuestro laboratorio realizó algunos estudios de distribución para el Benznidazol. Luego de una dosis oral única de esta droga, el hígado, el estómago y los riñones poseían las concentraciones más altas a una hora. Todos los otros órganos mostraron concentraciones bastante similares a las halladas en sangre (Díaz de Toranzo y cols., 1986).

Luego de aquellos estudios tempranos de toxicidad en órganos blanco hechos para el Nifurtimox por su fabricante y sabiendo que no había estudios equivalentes para el Benznidazol en la literatura en el momento que fue introducido en el mercado, nuestro laboratorio inició una serie de estudios ultraestructurales sobre los efectos potenciales del Nifurtimox y del Benznidazol sobre diferentes órganos. Por ejemplo, se demostró que la administración de Benznidazol a ratas macho causa alteraciones significativas en la corteza suprarrenal involucrando las zonas *fasciculata* y *reticularis* pero no la glomerular. Los animales tratados con Benznidazol revelaron la presencia de células en las zonas *fasciculata* y *reticularis* con acumulación marcada de lípidos y alteraciones en los núcleos, retículo endoplásmico y mitocondrias (de Castro y cols., 1992).

Para el caso del Nifurtimox, los efectos deletéreos involucraban las mismas zonas suprarrenales que aquellas alteradas por el Benznidazol, pero los efectos en ellas eran

diferentes. No se observaba acumulación lipídica. Sin embargo, las alteraciones observadas involucraban las mitocondrias, núcleos, aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, pero eran más intensas en las mitocondrias (de Castro y cols., 1990).

En esta línea de investigación nuestro laboratorio también estudió los efectos de la administración de Nifurtimox sobre la mucosa colónica de la rata. Los resultados mostraron alteraciones intensas en las células epiteliales que consistían en dilatación moderada del retículo endoplásmico pero una dilatación intensa del aparato de Golgi (de Mecca y cols., 2001). Los últimos efectos sugieren la ocurrencia potencial de alteraciones serias en la síntesis y almacenamiento de productos secretorios de la mucosa colónica provocados por la administración de Nifurtimox. El Benznidazol también posee un efecto deletéreo sobre el colon. En efecto, la mucosa colónica de las ratas tratadas con Benznidazol mostró alteraciones ultraestructurales intensas, abundante secreción mucosa a nivel de las células Goblet y dilatación del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en las células epiteliales (Díaz y cols., 2000).

Resultados de nuestro laboratorio también mostraron la ocurrencia de alteraciones evidentes en la ultraestructura del tejido esofágico de ratas que recibieron Benznidazol por vía intragástrica. Las alteraciones no eran obvias aunque no muy intensas. Incluían la separación y aglomeración de poliribosomas; la reducción en la presencia de desmosomas y en la cantidad de bacterias en su superficie (de Castro y cols., 2003). El significado potencial de estas alteraciones en el tejido tanto colónico como esofágico no está completamente claro hasta el presente. Sin embargo, debería ser

digno de considerarse a la luz de la tendencia actual de utilizar estas dos drogas en la "fase indeterminada" de la enfermedad de Chagas. Cualquier efecto deletéreo de los fármacos en este estadio sería aditivo o sinérgico con aquellos inducidos por la evolución de la enfermedad, por ejemplo hacia un megaesófago.

Los primeros estudios toxicológicos hechos por el productor de Nifurtimox incluyeron la prueba para carcinogenicidad cuando la droga se administraba en forma tanto oral como subcutánea (Steinhoff y Grundmann, 1972). Los resultados fueron diferentes en hembras que en machos. En las hembras la administración po de Nifurtimox disminuyó significativamente el porcentaje de tumores malignos (carcinosarcoma de la glándula mamaria, adenocarcinoma de ovario) que ocurrían espontáneamente en ellas (de 36 a 12%) pero aumentó significativamente el porcentaje de ratas con tumores (fibroadenoma de glándula mamaria, fibroma de mama, hemangioma suprarrenal) (de 36 a 64%). En la rata macho el porcentaje de tumores malignos (adenocarcinoma de la vesícula biliar, carcinoma de vejiga) observado luego de la administración oral de Nifurtimox fue significativamente mayor que en el grupo control (16 contra 28%). También, el porcentaje de tumores benignos (adenoma adrenal, hemangioma adrenal, adenoma mamario) fue significativamente mayor (4 contra 24%) (Steinhoff y Grundmann, 1972). La localización de tumores modulados por la administración po de Nifurtimox a ratas hembra fue la misma que la de los que ya ocurrían espontáneamente (Steinhoff y Grundmann, 1972). Sin embargo, en el caso de los cánceres o tumores inducidos por Nifurtimox en las ratas macho fueron observados involucrando localizaciones que no ocurrían en los controles (adenocar-

cinoma de la vesícula biliar, heman-gioma adrenal, adenoma adrenal, fibroma mamario, simpatogonioma de la glándula suprarrenal) (Steinhoff y Grundmann, 1972).

En estudios posteriores con ambas drogas administradas a ratones hembra se evidenciaron diferencias significativas en la incidencia de linfomas (Teixeira y cols., 1994). El riesgo aumentado tumoro/carcinogénico causado por estas dos drogas nitroheterocíclicas puede no ser una sorpresa, considerando los diversos estudios disponibles al día de hoy evidenciando sus propiedades genotóxicas. La mayoría de los estudios realizados respecto a esta materia en el pasado han sido previamente revisados y no se considerarán aquí de nuevo (Castro, 2000). Sin embargo, la consideración de algunos resultados utilizando pruebas más familiares para los toxicólogos generales merece mencionarse aquí. Por ejemplo, la actividad mutagénica del Nifurtimox fue ensayada en diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* en el ensayo de mutagenicidad de Ames y en una versión simplificada del mismo conocida como Simultest (Melo y Ferreira, 1990; Moraga y Graft, 1989; Nagel, 1987). El Nifurtimox no evidenció toxicidad (reversión His⁺) en el sistema TA100 en diferentes estudios y en el Simultest (Melo y Ferreira, 1990; Moraga y Graft, 1989; Nagel, 1987). La mutagenicidad del Nifurtimox fue también probada en la cepa isogénica uvrB⁺ UTH8414 y llevó a resultados negativos (Nagel, 1987). Estos resultados podrían indicar que las enzimas de reparación de la escisión están involucradas en la reparación de lesiones inducidas por el Nifurtimox. Se observaron resultados similares con el Benznidazol (Nagel, 1987). Lo que es más, los efectos genotóxicos del Nifurtimox y el Benznidazol sobre los mutantes resistentes a la nitrofurazona (cuyos

fenotipos resistentes se considera que son atribuibles a su pérdida de actividad nitroreductiva) fueron negativos (Nagel, 1987). Esos hallazgos evidenciaron que la mutagenicidad observada en los sistemas de ensayo bacterianos está relacionada más probablemente con su actividad nitroreductiva.

El efecto genotóxico potencial de ambos, Nifurtimox y Benznidazol, fue evaluado también en los sistemas de los mamíferos (Gorla, 1987; Gorla y Castro, 1985; Gorla y cols., 1988, 1989; Navarro y cols., 1984). Navarro et al. reportaron el efecto del Nifurtimox y Benznidazol sobre la inducción de eritrocitos micronucleados en ratones y sobre la inducción de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos en ensayos *in vitro* (Gorla y cols., 1986). Los resultados de ambas pruebas, el análisis microsomal y las aberraciones cromosómicas, fueron claramente indicadores de los efectos clastogénicos del Nifurtimox y Benznidazol, en roedores *in vivo* y en células humanas *in vitro*. Gorla y Castro reportaron un aumento no significativo en la formación de micronúcleos en la médula ósea o los linfocitos esplénicos de ratones tratados con Benznidazol administrada oralmente por encima de 2000 mg/kg (Gorla y Castro, 1985). En contraste, el Nifurtimox causó un aumento estadísticamente significativo con la mayor dosis usada (2000 mg/kg) en la formación de micronúcleos en la médula ósea del ratón (Gorla, 1987). En estudios sobre la frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas en los linfocitos esplénicos de ratones luego de exposición al Nifurtimox o al Benznidazol a dosis por encima de 2000mg/kg, Gorla demostró que el Nifurtimox pero no el Benznidazol lleva a una frecuencia aumentada de intercambio de cromátidas hermanas (Gorla, 1987). Más relevante, Gorla y colaborado-

res reportaron un incremento de 13 veces en las aberraciones cromosómicas analizadas de cultivos de linfocitos periféricos de dos grupos de niños con Chagas antes y después del tratamiento con Nifurtimox (Gorla y cols., 1989). Los estudios en dos grupos de niños con Chagas antes y después del tratamiento de Benznidazol demostraron niveles pequeños pero estadísticamente significativos de linfocitos interfase con micronúcleos y aberraciones cromosómicas (Gorla y cols., 1988).

En el curso de estudios bioquímicos, Gorla y colaboradores reportaron que los metabolitos reactivos del Benznidazol se unían covalentemente tanto al ADN como a las proteínas nucleares cuando el fármaco se incubaba en un medio anaerobio en presencia o ausencia de NADPH (Gorla y cols., 1986). La unión covalente a las proteínas nucleares comprende proteínas ácidas no histonas. En esos estudios no fue posible ninguna identificación ni de la estructura del metabolito reactivo formado ni de los productos formados entre ellos y las bases o aminoácidos de ADN (Gorla y cols., 1986).

La evidencia disponible indica también que tanto el Nifurtimox como el Benznidazol modifican significativamente la respuesta inmune del huésped. El efecto depende tanto de la droga como del huésped. Por ejemplo, en estudios sobre las reacciones dérmicas positivas al PPD en cobayos inmunizados se reportó que la administración de Nifurtimox impactó en la respuesta inmune específica mediada por células al PPD tanto *in vivo* como *in vitro* (Lelchuk y cols., 1977). En otros estudios, el tratamiento con Nifurtimox llevó a una pérdida de la resistencia a la re-infección con *T. cruzi*, asociada probablemente con respuestas inmunes anti-*T. cruzi* mediadas humoralmente y por células respectivamente

(Cabeza y cols., 1988). En el caso de Benznidazol, algunos trabajadores reportaron una inmunosupresión severa mediada por células en conejos infectados con *T. cruzi* e inmunizados con BCG (Teixeira y cols., 1990). Sin embargo, en otros estudios se reportó que la activación del sistema inmune por el parásito y el interferón-gamma endógeno juega un papel principal en la eficacia del Benznidazol contra la infección con el *T. cruzi*.

■ METABOLISMO DEL NIFURTIMOX Y EL BENZNIDAZOL Y SU RELACIÓN CON SUS EFECTOS COLATERALES TÓXICOS Y SUS PROPIEDADES QUIMIOTERÁPICAS.

Existe consenso general acerca de los efectos tóxicos de los compuestos nitrados y de que el Nifurtimox o el Benznidazol en particular requieren la reducción enzimática de su grupo nitro. La nitroreducción del Nifurtimox y del Benznidazol resulta en activación más que en detoxificación. Durante este proceso de bioactivación, se forman metabolitos reactivos químicamente. Los metabolitos reactivos producidos son considerados radicales libres en su naturaleza. La evidencia disponible sugiere que los radicales libres

generados durante la nitroreducción del Nifurtimox o del Benznidazol son un radical nitroanión ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$) y el radical libre hidronitróxido (RNHO^{\cdot}), respectivamente. El proceso nitroreductor general de ambos nitroheterociclos se representa en la Figura 2.

Las reacciones de transferencia del tipo de la abstracción de hidrógeno y las reacciones de adición son comunes para los radicales libres y a menudo compiten y poseen constantes de velocidad similares. La reacción del $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ con el oxígeno puede llevar por ciclo redox a la formación del anión superóxido. Esta reacción podría ser de relevancia bajo condiciones aeróbicas y probó estar involucrada en el caso del Nifurtimox pero no en el del Benznidazol (Castro, 2000). En el caso del Benznidazol, el proceso reductor es capaz de proceder incluso *in vivo*, al correspondiente derivado amino y durante esta biotransformación se forma un metabolito reactivo (presumiblemente el RNHO^{\cdot}).

Se cree que la toxicidad del Benznidazol aparece debido a la interacción de sus metabolitos reactivos con el ADN; proteínas y lípidos u otros componentes celulares relevantes (Castro, 2000; de Toranzo

y cols., 1984, Gorla y cols., 1986; Masana y cols., 1984a, 1985). Estos mecanismos estarían involucrados no solamente en los efectos de toxicidad en mamíferos sino también en las acciones deletéreas sobre el *T. cruzi*, las cuales son responsables de su acción quimioterápica (Díaz de Toranzo y cols., 1988).

En el caso del Nifurtimox, investigadores en este campo consideran que la formación de especies reactivas de oxígeno podría ser el proceso clave involucrado en los efectos tóxicos y quimioterapéuticos del Nifurtimox (Castro, 2000). También se observaron reacciones del Nifurtimox con moléculas críticas que contienen sulfhidrilos con generación de nitrito pero el rol de estas reacciones en los efectos del Nifurtimox no es conocido (Díaz y cols., 2004; Montalto de Mecca y cols., 2002). Los resultados disponibles muestran que la peroxidación lipídica ocurre en el hígado pero sólo después que los niveles de glutatión disminuyeron significativamente (Castro y Castro, 1985; Castro y cols., 1988).

Respecto a la naturaleza de las enzimas involucradas en la nitroreducción del Benznidazol o el Nifurtimox la información disponi-

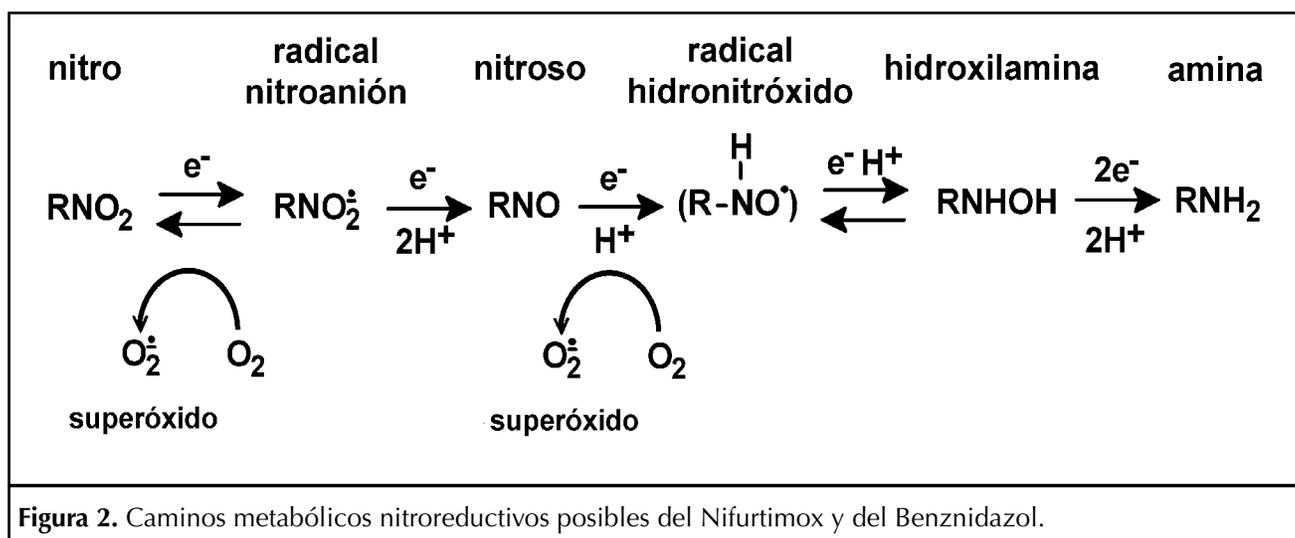


Figura 2. Caminos metabólicos nitroreductivos posibles del Nifurtimox y del Benznidazol.

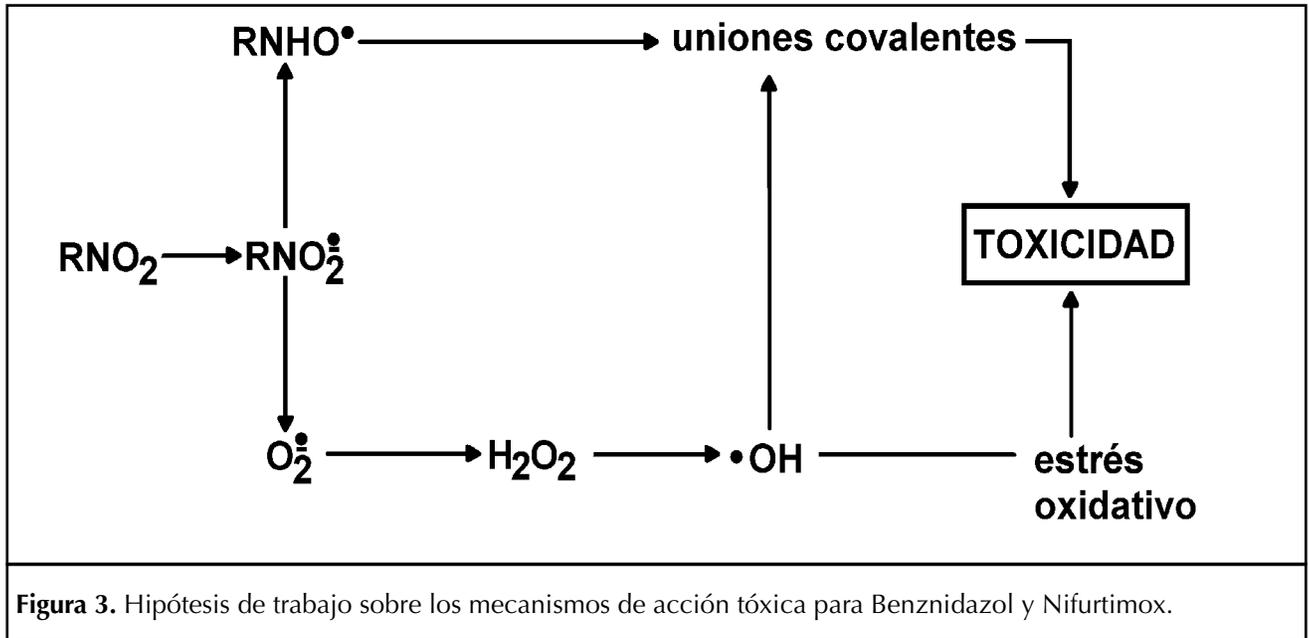


Figura 3. Hipótesis de trabajo sobre los mecanismos de acción tóxica para Benznidazol y Nifurtimox.

ble indica que la citocromo P450 reductasa y el citocromo P450 son las más relevantes en el metabolismo nitroreductivo hepático de ambas drogas (Aguilar y cols., 1985, 1987a, 1987b; Castro, 2000; Montalto de Mecca y cols., 2002; de Toranzo y cols., 1983, 1997; Díaz y cols., 2004; Masana y cols., 1984a, 1984b, 1985). Las fracciones más pequeñas de la capacidad nitroreductiva hepática fueron atribuidas a la xantina oxidoreductasa y a la aldehído oxidasa (Aguilar y cols., 1985, 1987a, 1987b; Díaz y cols., 2004; Masana y cols., 1984b).

Resultó también de interés investigar si el metabolismo hepático de ambos fármacos era susceptible a la influencia de inductores conocidos de las biotransformaciones de la fase I. Pudo observarse que en animales expuestos crónicamente al alcohol, la nitroreducción hepática de los dos fármacos se incrementaba en los animales macho, no así en las hembras (de Mecca y cols., 2013).

En otras localizaciones distintas al hígado (testículos, ovarios, suprarrenales, colon, esófago) la intensidad de los procesos enzimáticos

relativos puede variar hasta cierto punto (Bernacchi y cols., 1986; de Castro y cols., 1989, 1990, 1992, 2003; Díaz y cols., 2000). Un caso interesante respecto a esto es el del tejido mamario, que es una de las fuentes más ricas de xantina oxidoreductasa en todo el cuerpo, donde esta enzima posee correspondientemente un papel relevante en el proceso nitroreductivo total (Bartel y cols., 2009, 2010; de Mecca y cols., 2007).

En los órganos donde el P450 esta presente no sólo en los micro-

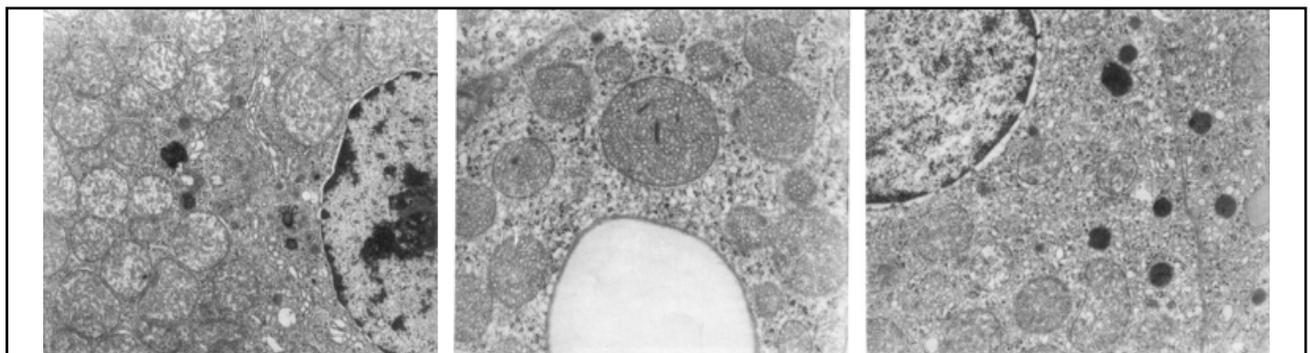


Figura 4. Ultraestructura de la glándula adrenal de ratona macho (control). En las dos primeras fotos (x 14.000) observamos la zona fasciculata, mostrando núcleos redondos, abundantes mitocondrias esféricas con crestas vesiculares, un aparato de Golgi bien desarrollado, numerosos ribosomas libres y polisomas, y abundante retículo endoplasmático liso tubular. También observamos gotas grasas rodeadas por una membrana. En la tercera foto (x 8800) podemos observar un detalle de la zona reticularis. Observamos un retículo endoplasmático liso abundante con una dilatación moderada y la presencia de gránulos de lipofucsina en el citoplasma. Referencia: Exp Mol Pathol 52: 98-108 (1990).

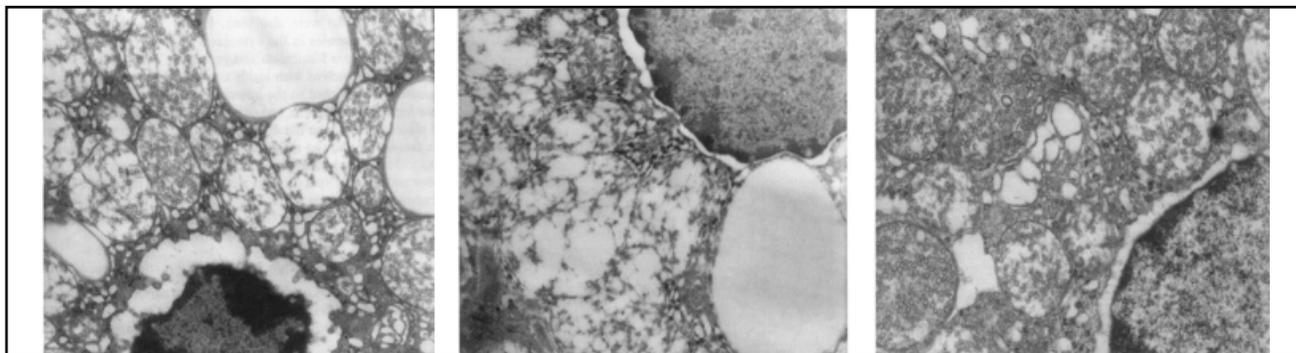


Figura 5. Ultraestructura de la glándula adrenal de rata macho (tratadas con una sola dosis de Nifurtimox, 100 mg/kg p.o. y sacrificadas 24 hs después). En las dos primeras fotos podemos observar las alteraciones producidas en la zona fasciculata: la membrana perinuclear exhibe una marcada dilatación. Las mitocondrias aparecen severamente dañadas, con pérdida parcial o completa de sus crestas y doble membrana. También hay vesiculización en el retículo endoplásmico liso. En la tercera foto observamos el daño producido en la zona reticularis: las membranas del retículo, del Golgi y perinuclear aparecen dilatadas. Las mitocondrias presentan un swelling moderado. Todas las fotos tienen un aumento de 14.000. Referencia: Exp Mol Pathol 52: 98-108 (1990).

somas sino también en las mitocondrias (órganos esteroideogénicos) la localización subcelular de la capacidad nitroreductiva fue demostrada en ambas organelas y la localización subcelular de la injuria celular cambió en consecuencia (Bartel y cols., 2010; Bernacchi y cols., 1986; de Castro y cols., 1989, 1990, 1992, 2003; Díaz y cols., 2000).

Las implicaciones prácticas de estos hallazgos probaron ser significativas. Por ejemplo, la observación de que el feto es capaz de bioactivar al Benznidazol (y probablemente al Nifurtimox) forzó la prohibición de su uso en mujeres embarazadas

(de Toranzo y cols., 1984). Algunos médicos en los tiempos muy precoces del uso de ambas drogas fueron tentados de prevenir la transmisión congénita de la enfermedad. Alternativamente, la capacidad nitroreductiva metabólica baja para bioactivar el Nifurtimox o el Benznidazol del recién nacido ofreció una alternativa racional para tratar al recién nacido infectado (Aguilar y cols., 1987a; Bulffer y cols., 2011). A esa edad la bioactivación nitroreductiva, que es responsable de la toxicidad, es baja, mientras que la susceptibilidad del *T. cruzi* a las drogas es la misma (de Toranzo y cols., 1988). Estos hallazgos llevan a bases ra-

cionales para concluir que los niños pequeños deberían ser tratados tan pronto como sea posible luego de la infección (Pinto Dias, 2000, 2003; Rodrigues Coura y de Castro, 2002). Las expectativas de éxito son óptimas en este punto.

En lo que concierne a la toxicidad cardíaca también ha sido relevante poder demostrar un comportamiento completamente diferente entre ambos fármacos, con una significativa menor toxicidad a favor del Benznidazol (Bartel y cols., 2007; Mecca y cols., 2008). Hay que tener en cuenta que en los pacientes chagásicos frecuentemente ya existe

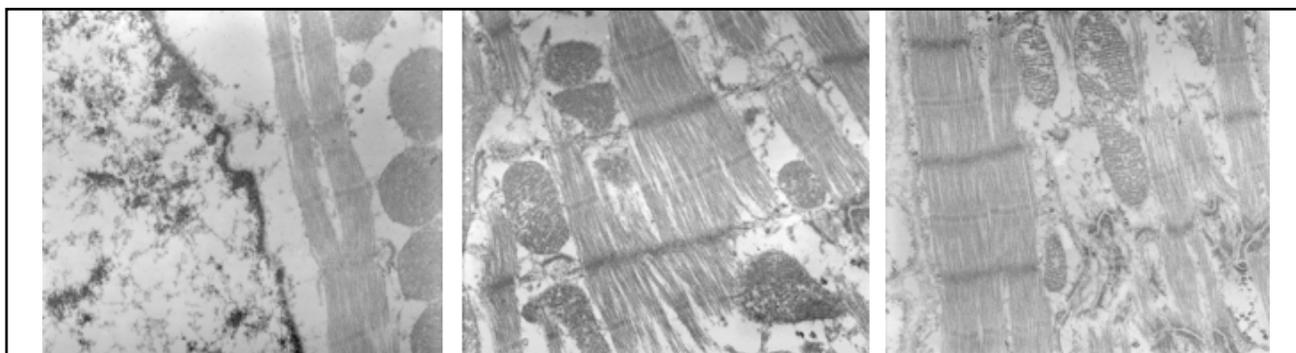


Figura 6. Microfotografías electrónicas de transmisión de tejido cardíaco de ratas expuestas a una dosis única de Nifurtimox (100 mg/kg po). Puede observarse la vacuolización del citoplasma, la separación y pérdida de las microfibrillas, dilatación mitocondrial y condensación de la cromatina perinuclear. X 17.600. Referencia: Human Exp Toxicol 26: 781-788 (2007).

una cardiopatía vinculada con la enfermedad por lo que un eventual tratamiento no debería incrementar el riesgo sobre la función cardíaca. Los resultados sugieren que el Nifurtimox podría agravar las condiciones cardíacas adversas preexistentes por la enfermedad misma.

■ PROBLEMAS Y NECESIDADES FUTURAS.

El problema de la enfermedad de Chagas involucra algunos factores relacionados que incluyen la salud pública, factores científicos, económicos, educacionales, políticos y otros. Sin embargo, la necesidad más urgente es encontrar nuevas drogas para el tratamiento de esta enfermedad. Las dos drogas disponibles no son completamente efectivas y han mostrado importantes efectos tóxicos colaterales. El desafío permanece en la comunidad científica (incluyendo a los toxicólogos). Las compañías farmacéuticas han reducido drásticamente su inversión en el desarrollo de drogas para las enfermedades tropicales. La razón principal de esto es económica. El desarrollo de una nueva droga requiere usualmente de decenas de millones de dólares para un producto exitoso y la perspectiva de un retorno económico razonable es pobre (Aufderheide y cols., 2004; Steverding y Tyler, 2005; World Bank, 1993; World Health Organization, 1991).

Actualmente existen esfuerzos intensos de la comunidad científica para establecer nuevos tratamientos o drogas (Steverding y Tyler, 2005; Urbina y Docampo, 2003). Sin embargo, tanto el Benznidazol como el Nifurtimox serán todavía las únicas drogas disponibles por algún tiempo. Esta revisión pretende solamente asegurarse de que los médicos que prescriben tengan a mano un resumen de los efectos adversos de las

drogas para permitirles tomar decisiones riesgo-beneficio apropiadas.

■ BIBLIOGRAFIA

Aguilar EG, de Arranz CK, de Toranzo EGD, Castro JA (1987a). Liver microsomal Benznidazole and Nifurtimox nitroreductase activity in male rats of different age. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 289: 11-17.

Aguilar EG, de Arranz CK, de Toranzo EG, Castro JA (1985). Benznidazole and Nifurtimox nitroreductase activity in liver microsomes from male rats pre-induced with phenobarbital or 3-methylcholanthrene. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 50: 443-446.

Aguilar EG, Koldobsky C, de Toranzo EG, Castro JA (1987b). Species and sex differences in the liver microsomal nitroreductive biotransformation of Nifurtimox and Benznidazole. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 287: 181-187.

Aguilar G, de Toranzo EGD, Castro JA (1990). Pasaje del antichagásico Benznidazol vía leche materna a ratas lactantes. Efectos sobre el metabolismo de xenobioticos. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 24: 371-374.

Allison M.J (1993). En: *The Cambridge World Story of Human Disease*; ed. Kiple, K. F. (Cambridge University Press: Cambridge, UK); pp. 636-638.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M (2004). A 9000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2034-2039.

Barret MP, Burdimore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzullo JJ (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* 362: 1469-1480.

Bartel LC, Montalto de Mecca M, Castro JA (2009). Nitroreductive metabolic activation of some carcinogenic nitro heterocyclic food contaminants in rat mammary tissue cellular fractions. *Food Chem Toxicol* 47: 140-144.

Bartel LC, Montalto de Mecca M, de Castro CR, Bietto FM, Castro JA (2010). Metabolization of nifurtimox and benznidazole in cellular fractions of rat mammary tissue. *Hum Exp Toxicol* 29: 813-822.

Bartel LC, Montalto de Mecca M, Fanelli SL, Rodriguez de Castro C, Diaz EG, Castro JA (2007). Early Nifurtimox induced biochemical and ultrastructural alterations in rat heart. *Human Exp Toxicol* 26: 781-788.

Bernacchi AS, de Castro CR, de Toranzo EG, Castro JA (1986). Effects of Nifurtimox or Benznidazole administration on rat testes: ultrastructural observation and biochemical studies. *Exp Mol Pathol* 45: 245-256.

Bulffer RF, Castro JA, Fanelli SL (2011). Benznidazole levels in blood vary with age in rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 374-377.

Cabeza Meckert P, Chambo JG, Laguens RP (1988). Differences in resistance to reinfection with low and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in chagasic mice treated with nifurtimox and relation to immune response. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 241-245.

Carvahlo MFC, de Franco MF, Soares VA (1997). Amastigotes forms of

- Trypanosoma cruzi detected in a renal allograft. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 39: 223-226.
- Castro GD, Castro JA (1985). Studies on pentane evolution by rats treated with Nifurtimox or Benznidazole. *Toxicology* 35: 319-326.
- Castro GD, Lopez AJ, Castro JA (1988). Evidence for hydroxyl free radical formation during paraquat but not for Nifurtimox liver microsomal biotransformation. A dimethyl-sulfoxide scavenging study. *Arch Toxicol* 62: 355-358.
- Castro JA (2000). Contribution of Toxicology to the problem of Chagas' disease (American Trypanosomiasis). A year 2000 update. *Biomed Environ Sci* 13: 271-279.
- Chin-Hong PV, Schwartz BS, Bern C, Montgomery SP, Kontak S, Kubak B, Morris MI, Nowicki M, Wright C, Ison MG (2011). Screening and treatment of Chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the Chagas in transplant working group. *Am J Transplant* 11: 672-680.
- de Castro CR, de Mecca MM, Fanelli SL, de Ferreyra EC, Díaz EG, Castro JA (2003). Benznidazole-induced ultrastructural and biochemical alterations in rat esophagus. *Toxicology* 191: 189-198.
- de Castro CR, de Toranzo EG, Bernacchi AS, Carbone M, Castro JA (1989). Ultrastructural alterations in ovaries from Nifurtimox or Benznidazole-treated rats. Their relation to ovarian nitroreductive biotransformation of both drugs. *Exp Mol Pathol* 50: 385-397.
- de Castro CR, de Toranzo EG, Carbone M, Castro JA (1990). Ultrastructural effects of Nifurtimox on rat adrenal cortex related to reductive biotransformation. *Exp Mol Pathol* 52: 98-108.
- de Castro CR, Díaz de Toranzo EG, Castro JA (1992). Benznidazole-induced ultrastructural alterations in rat adrenal cortex. Mechanistic studies. *Toxicology* 74: 223-232.
- de Mecca MM, Bartel LC, Castro JA (2013). Effect of chronic alcohol drinking on rat liver microsomal nitroreductive metabolism of nifurtimox and benznidazole. *Hum Exp Toxicol* 32: 1305-1310.
- de Mecca MM, de Castro CR, Díaz EG, Castro JA (2001). Alteraciones ultraestructurales en la mucosa del colon de ratas tratadas con Nifurtimox. *Medicina (Buenos Aires)* 61: 67-72.
- de Mecca MM, Fanelli SL, Bartel LC, de Castro CR, Díaz EG, Castro JA (2007). Nifurtimox nitroreductase activity in different cellular fractions from male rat pancreas. Biochemical and ultrastructural alterations. *Life Sci* 81: 144-152.
- de Toranzo EG, Herrera DM, Castro JA (1997). Rat liver nuclear Nifurtimox nitroreductase activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 98: 249-254.
- de Toranzo EG, Masana M, Castro JA (1983). Nitroreduction of Benznidazole and Nifurtimox by rat and human feces. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 41: 341-344.
- de Toranzo EG, Masana M, Castro JA (1984). Administration of Benznidazole, a chemotherapeutic agent against Chagas' disease to pregnant rats. Covalent binding of reactive metabolites to fetal and maternal proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 272: 17-23.
- Díaz de Toranzo EG, Castro JA, de Cazzulo BM, Cazzulo JJ (1988). Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA; proteins and lipids from Trypanosoma cruzi. *Experientia* 44: 880-881.
- Díaz de Toranzo EG, Masana M, Castro JA (1986). Distribución del Benznidazol administrado oralmente en los diferentes tejidos de ratas macho. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 20: 61-64.
- Díaz EG, de Mecca MM, Castro JA (2004). Reactions of Nifurtimox with critical thiol-containing biomolecules. Their potential toxicological relevance. *J Applied Toxicol* 24: 189-195.
- Díaz EG, Rodríguez de Castro C, Montalto de Mecca M, Castro JA (2000). Benznidazole-induced ultrastructural and biochemical alterations in the rat colon. *Acta Pharmacol Sin* 21: 961-966.
- Duhm B, Maul W, Medenwald H, Patzsche K, Wegner LA (1972). Investigations in the pharmacokinetics of Nifurtimox. ³⁵S in the rat and dog. *Arzneimittelforschung* 22: 1617-1624.
- Gorla N, Diaz Gomez MI, Castro JA (1986). Interaction of Benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 280: 22-31.
- Gorla NB (1987). Sister-chromatid exchange in splenic lymphocytes of mice after exposure to Nifurtimox or Benznidazole. *Mutat Res* 188: 129-133.
- Gorla NB, Castro JA (1985). Micro-

- nucleus formation in bone marrow of mice treated with Nifurtimox or Benznidazole. *Toxicol Lett* 25: 259-263.
- Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri GP, Larripa IB (1988). Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutat Res* 206: 217-220
- Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri GP, Larripa IB (1989). Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutat Res* 224: 263-267.
- Hoffmann K (1972). Toxicological investigations on the tolerability of Nifurtimox. *Arzneimittel-Forschung - Drug Res* 22: 1590-1603.
- Lelchuk R, Cardoni RL, Levis S (1977). Nifurtimox -induced alterations in the cell-mediated immune response to PPD in guinea-pigs. *Clin Exp Immunol* 30: 469-473.
- Lorke D (1972). Embryotoxicity studies of Nifurtimox in rats and mice and study of fertility and general reproductive performance. *Arzneimittelforschung* 22: 1603-1607.
- Masana M, de Toranzo EG, Castro JA (1984a). Reductive metabolism and activation of Benznidazole. *Biochem Pharmacol* 33: 1041-1045.
- Masana M, de Toranzo EG, Castro JA (1984b). Studies on Nifurtimox nitroreductase activity in liver and other rat tissues. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 270: 4-10.
- Masana M, de Toranzo EG, Rubio M, Castro JA (1985). Effect of Benznidazole on the mixed-function oxygenase system from rat liver microsomes. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 276: 4-11.
- Mecca MM, Bartel LC, Castro CR, Castro JA (2008). Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 549-553.
- Medenwald H, Brandau K, Schlossmann K (1972). Quantitative determination of Nifurtimox in body fluids of rats, dog and man. *Arzneimittelforschung* 22: 1613-1617.
- Melo ME, Ferreira LC (1990). Screening the mutagenic activities of commonly used antiparasite drugs by the Simultest, a simplified Salmonella microsome plate incorporation assay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 32: 269-274.
- Moncayo A, Silveira AC (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 17-30.
- Montalto de Mecca M, Díaz EG, Castro JA (2002). Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. *Toxicol Lett* 136: 1-8.
- Moraes-Souza H (1999). Chagas infection transmission control. Situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 419-423.
- Moraga AA, Graft U (1989). Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis* 4: 105-110
- Muñoz C, Zulantay I, Apt W, Ortiz S, Schijman AG, Bisio M, Ferrada V, Herrera C, Martínez G, Solari A (2013). Evaluation of nifurtimox treatment of chronic Chagas disease by means of several parasitological methods. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 4518-4523.
- Murta SMF, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FFM, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdi P, Romero OB, Goldenberg S, Romanhna AJ (2006). Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 146: 151-162.
- Nagel, R (1987). Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutat Res* 191:17-20.
- Navarro ML, Dain L., Miglionni AM, Nagel R (1984). Clastogenic activity of two antichagasic drugs. *Comunicaciones Biológicas* 3: 25-28.
- Pinto Dias JC (2000). Epidemiología. En: Z. Brener; Z. Andrade; Barral Neto eds, *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 48-74.
- Pinto Dias JC (2003). XII Reunión Intergubernamental INCOSUR/Chagas, Santiago de Chile; 129-134.
- Pinto Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ (2002). The impact of Chagas

- disease control in Latin America. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Rassi A Jr, Rassi A, Little WC (2000). Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23: 883-889.
- Rodrigues Coura J, de Castro SL (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
- Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL (2009). Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(Suppl. I): 167-180.
- Steinhoff D, Grundmann E (1972). Test for carcinogenicity of Nifurtimox on oral and subcutaneous administration to rats. *Arzneimittelforschung* 22: 1607-1612.
- Steverding D, Tyler KM (2005). Novel antitrypanosomal agents. *Exp Opin Invest Drug* 14: 939-955.
- Teixeira AR, Calixto MA, Teixeira ML (1994). Chagas' disease. carcinogenic activity of the anti trypanosomal nitroarenes in mice. *Mutat Res* 305: 189-196.
- Teixeira AR, Cordoba JC, Souto Maior I, Solorzano E (1990). Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with Benznidazole. *Am J Tropical Med Hyg* 43: 146-158.
- Urbina JA, Docampo R (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501.
- Wegner DHG, Rohwedder RW (1972). The effect of Nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung* 22: 1624-1635.
- World Bank. World Development Report (1993). Investing in Health. Oxford University Press; N.Y., pp. 1-329.
- World Health Organization (1991). Control of Chagas disease: report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (2013). 18th WHO Model List of Essential Medicines. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1
- GLOSARIO.**
- Adinamia:** Es la ausencia de movimiento o reacción, lo que puede llevar a un estado de postración. Las causas pueden ser físicas o psicológicas. Se manifiesta por falta de fuerza, debilidad, o la ausencia de iniciativa física y emocional como consecuencia de un estado patológico.
- Agranulocitosis:** Es una insuficiencia de la médula ósea para producir suficientes glóbulos blancos (neutrófilos). La médula ósea es el tejido blando dentro de los huesos que ayuda a formar células sanguíneas.
- Amastigota:** Una de las formas celulares del *T. cruzi*, esférica u ovalada. Es la forma reproductiva en el interior de las células mamíferas (principalmente en células musculares y nerviosas).
- Clastogénico:** Los agentes clastogénicos son agentes físicos o químicos capaces de inducir roturas en los cromosomas que no se reparan o se reparan mal. Los procesos clastogénicos pueden llevar a cambios estructurales de los cromosomas fácilmente observables en la metafase del ciclo celular, como las aberraciones cromosómicas.
- Desmosomas:** Son estructuras celulares que mantienen adheridas a células vecinas. Los desmosomas permiten además que exista cierto movimiento en común entre las células adyacentes que están unidas mediante ellos.
- Glándulas de Cowper:** Estas pequeñas glándulas se encuentran debajo de la próstata y su función es secretar un líquido alcalino que lubrica y neutraliza la acidez de la uretra antes del paso del semen en la eyaculación.
- Hemangioma:** Es una neoplasia, generalmente benigna, de los vasos sanguíneos caracterizada por la aparición de un gran número de vasos normales y anormales sobre la piel u otros órganos internos.
- Linfadenopatía:** Es un aumento del tamaño de los folículos linfáticos. Estos folículos contienen glóbulos blancos normales llamados linfocitos. El cuerpo produce más linfocitos para ayudar a impedir el ingreso de bacterias, virus u otros tipos de microbios al torrente sanguíneo.
- Megaesófago y megacolon:** Patologías que llevan a la dilatación de los órganos del aparato digestivo con compromiso del tránsito normal. Las condiciones de los "megas" digestivos resultan de la destrucción masiva de neuronas en el plexo mientérico durante la infección aguda y la incapacidad de las neuronas de regenerarse. Los órganos megas se observan durante la vida adulta, cuando se presume que la pérdida fisiológica de neuronas en un plexo ya dañado, alcanza niveles críticos apareciendo severa disperistalsis y una mayor dilatación de los órganos.

El megaesófago es la patología más frecuente siguiéndole el megacolon en orden de detección; sin embargo existen formas leves de disfunción digestiva en gran porcentaje de los pacientes que no muestran patología manifiesta en los estudios habituales del aparato digestivo.

Meningoencefalitis: es una enfermedad que combina ambas meningitis: por un lado, una infección o una inflamación de las meninges, y la encefalitis, que es una infección o una inflamación del cerebro. Hay muchos organismos causantes, tanto patógenos virales como bacteriales y también parásitos.

Miocarditis: La miocarditis es un trastorno poco común, generalmen-

te causado por infecciones virales, bacterianas o micóticas que afectan el corazón.

Neutropenia: También conocida como granulocitopenia, es la disminución aguda o crónica de granulocitos de la sangre. Es una condición anormal de la sangre que puede predisponer al cuerpo humano a contraer infecciones.

Parestesia: Se define como la sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general. Se traduce por una sensación de hormigueo, adormecimiento, acorchamiento, etc., producida por una patología en cualquier sector de las estructuras del sistema nervioso central o periférico.

Polirribosoma: Es un conjunto de ribosomas asociados a una molécula de mARN (ARN mensajero) para realizar la traducción simultánea de una misma proteína.

Púrpura trombocitopénica: Es un trastorno hemorrágico en el cual el sistema inmunitario destruye las plaquetas que son necesarias para la coagulación normal de la sangre. Las personas con la enfermedad tienen muy pocas plaquetas en la sangre.

Simpatogonioma: Tumor que constituye una variedad de otro, el neuroblastoma, y que está compuesto de células muy inmaduras similares a linfocitos pero de menor tamaño.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Revista CIENCIA E INVESTIGACION

Ciencia e Investigación, órgano de difusión de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC), es una revista de divulgación científica y tecnológica destinada a educadores, estudiantes universitarios, profesionales y público en general. La temática abarcada por sus artículos es amplia y va desde temas básicos hasta bibliográficos: actividades desarrolladas por científicos y tecnólogos, entrevistas, historia de las ciencias, crónicas de actualidad, biografías, obituarios y comentarios bibliográficos. Desde el año 2009 la revista tiene difusión en versión on line (www.aargentinapciencias.org)

PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO

El artículo podrá presentarse vía correo electrónico, como documento adjunto, escrito con procesador de texto word (extensión «doc») en castellano, en hoja tamaño A4, a doble espacio, con márgenes de por lo menos 2,5 cm en cada lado, letra Time New Roman tamaño 12. Las páginas deben numerarse (arriba a la derecha) en forma corrida, incluyendo el texto, glosario, bibliografía y las leyendas de las figuras. Colocar las ilustraciones (figuras y tablas) al final en página sin numerar. Por tratarse de artículos de divulgación científica aconsejamos acompañar el trabajo con un glosario de los términos que puedan resultar desconocidos para los lectores no especialistas en el tema.

La primera página deberá contener: Título del trabajo, nombre de los autores, institución a la que pertenecen y lugar de trabajo, correo electrónico de uno solo de los autores (con asterisco en el nombre del autor a quién pertenece), al menos 3 palabras claves en castellano y su correspondiente traducción en inglés. La segunda página incluirá un resumen o referencia sobre el trabajo, en castellano y en inglés, con un máximo de 250 palabras para cada idioma. El texto del trabajo comenzará en la tercera página y finalizará con el posible glosario, la bibliografía y las leyendas de las figuras. La extensión de los artículos que traten temas básicos no excederá las 10.000 palabras, (incluyendo título, autores, resumen, glosario, bibliografía y leyendas). Otros artículos relacionados con actividades científicas, bibliografías, historia de la ciencia, crónicas o notas de actualidad, etc. no deberán excederse de 6.000 palabras.

El material gráfico se presentará como: a) figuras (dibujos e imágenes en formato JPG) y se numerarán correlativamente (Ej. Figura 1) y b) tablas numeradas en forma correlativa independiente de las figuras (Ej. Tabla 1). En el caso de las ilustraciones que no sean originales, éstas deberán citarse en la leyenda correspondiente (cita bibliográfica o de página web). En el texto del trabajo se indicará el lugar donde el autor ubica cada figura y cada tabla (poniendo en la parte media de un renglón Figura... o Tabla..., en negrita y tamaño de letra 14). Es importante que las figuras y cualquier tipo de ilustración sean de buena calidad. La lista de trabajos citados en el texto o lecturas recomendadas, deberá ordenarse alfabéticamente de acuerdo con el apellido del primer autor, seguido por las iniciales de los nombres, año de publicación entre paréntesis, título completo de la misma, título completo de la revista o libro donde fue publicado, volumen y página. Ej. Benin L.W., Hurste J.A., Eigenel P. (2008) The non Lineal Hypercycle. Nature 277, 108 – 115.

Se deberá acompañar con una carta dirigida al Director del Comité Editorial de la revista Ciencia e Investigación solicitando su posible publicación (conteniendo correo electrónico y teléfono) y remitirse a cualquiera de los siguientes miembros del Colegiado Directivo de la AAPC: abaladi@dna.uba.ar - nidiabasso@yahoo.com - miguelblesa@yahoo.es – xammar@argentina.com - sarce@cnea.gov.ar y con copia a secretaria@aargentinapciencias.org

Quienes recepcionen el trabajo acusarán recibo del mismo y lo elevarán al Comité Editorial. Todos los artículos serán arbitrados. Una vez aprobados para su publicación, la versión corregida (con las críticas y sugerencias de los árbitros) deberá ser nuevamente enviada por los autores.

