

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 21 Número 1 (2004)

CUATRIMESTRAL

INDEX

Arbillaga L, Ezpeleta O and López de Cerain A. ¿Is the Ochratoxin A a mutagenic mycotoxine?	1
Alonso J, García MA, Pérez-López M and Melgar MJ. Macrofungi as potential bioremediation agent in compost material contaminated with heavy metals	11
Becerril C, Acevedo, H, Llorente MT and Castaño A. <i>In vivo</i> detection of DNA alterations produced by Benzo(a)pyrene using the RAPD technique	16
Morales AI, Vicente-Sánchez C, Santiago JM^a, Fernández Tagarro M, López-Novoa JM and Pérez-Barriocanal F. Effect of quercetin in cadmium-induced nephrotoxicity	23
Porras D, Bacardí D, Aldana L, Merino N, Amaya R, Suárez J, Vázquez A, Valenzuela C, Rojo G, Milá L, Castillo J, Cosme K and Duarte C. Toxicological evaluation of Interleukin-2 and FPCR ₃ vaccine candidate in Sprague-Dawley rats, combined therapy in AIDS- patients	31
Melo OL, Nogué S, Trullás JC, Aguiló S and Ana Maciel A. Seizures after flumazenil administration in case of combined benzodiazepine and tricyclic antidepressant overdose	38
Melo Trujillo O L, Pérez D A, Cerdeiriña M Z, Nogué Xarau S, Grau Junyent J M and Munné Mas P. Treatment of acute methanol poisoning with fomepizole	41
II Jornada de la Red Española de Métodos Alternativos	44
Jornada AETOX-SESA sobre toxicología ambiental: seguridad química	46
Congresses	48
Constitución del Comité Español de IUTOX	50

ÍNDICE

Arbillaga L, Ezpeleta O y López de Cerain A. ¿Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica?	1
Alonso J, García MA, Pérez-López M y Melgar MJ. Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación	11
Becerril C, Acevedo, H, Llorente MT y Castaño A. Detección " <i>in vivo</i> " mediante RAPD de alteraciones en el ADN producidas por benzo(a)pireno	16
Morales AI, Vicente-Sánchez C, Santiago JM^a, Fernández Tagarro M, López-Novoa JM y Pérez-Barriocanal F. Efecto de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio	23
Porras D, Bacardí D, Aldana L, Merino N, Amaya R, Suárez J, Vázquez A, Valenzuela C, Rojo G, Milá L, Castillo J, Cosme K y Duarte C. Evaluación toxicológica en ratas Sprague-Dawley de Interleuquina-2 y del candidato vacunal FPCR ₃ , terapia combinada en pacientes con SIDA	31
Melo OL, Nogué S, Trullás JC, Aguiló S y Ana Maciel A. Convulsiones secundarias a la administración de flumazenilo en un caso de sobredosis de benzodiazepinas y antidepresivos tricíclicos	38
Melo Trujillo O L, Pérez D A, Cerdeiriña M Z, Nogué Xarau S, Grau Junyent J M y Munné Mas P. Tratamiento con fomepizol de una intoxicación aguda por metanol	41
II Jornada de la Red Española de Métodos Alternativos	44
Jornada AETOX-SESA sobre toxicología ambiental: seguridad química	46
Próximos Congresos	48
Constitución del Comité Español de IUTOX	50

Incluido en IBECs, ICYT, IME, EMBASE/*Excerpta Medica* y *Chemical Abstracts*
Indexed in IBECs, ICYT, IME, EMBASE/*Excerpta Medica* and *Chemical Abstracts*



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 21 (1) 1-50 2004
ISSN 0212-7113

<http://aetox.com>



La **Revista de Toxicología** pretende ofrecer a sus lectores (científicos, docentes, profesionales y estudiosos) información actualizada sobre los avances más recientes en Toxicología. Dedicamos especial atención a los estudios relacionados con los efectos de las sustancias químicas y los mecanismos de toxicidad, mediante ensayos en animales de experimentación, métodos alternativos *in vitro* y estudios en humanos. También incluye estudios sobre nuevas sustancias y técnicas analíticas. Otro aspecto importante de la revista son los artículos de revisión, especialmente en temas de Toxicología Fundamental, Toxicología Clínica, Genotoxicología, Toxicología Ambiental, etc.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Resumen actual de características y normativas

El objetivo fundamental de la Asociación Española de Toxicología es el de propiciar la relación y cooperación entre sus miembros, y coordinar sus esfuerzos a fin de contribuir al desarrollo y difusión de los conocimientos en las diferentes áreas de la toxicología. Su Estatuto fundacional fue aprobado oficialmente el 15 de enero de 1980.

Toda persona interesada en pertenecer a esta Asociación deberá cumplimentar una ficha de inscripción, refrendada por la Junta Directiva. La cuota anual (43 €) se abona por domiciliación bancaria. Esta cuota da derecho a la recepción de la "Revista de Toxicología". Una vez admitidos los nuevos asociados recibirán un título y, periódicamente, las actas de las reuniones y comunicación de actividades con carácter nacional e internacional que pueden ser de interés.

La asociación promueve la celebración, cada dos años, del Congreso Español de Toxicología, cuya organización puede delegar. Además se ha establecido la celebración periódica de seminarios o mesas redondas organizados por grupos de trabajo. Cada reunión de este tipo será monotemática y abierta a personas no pertenecientes a la Asociación, y se desarrollará en diferentes ciudades españolas.

La Asociación organiza también programas de control de calidad en Toxicología Analítica.

Asociación Española de Toxicología

Secretaría de la AET
Universidad Miguel Hernández
Edificio Vinalopó
Avda. Ferrocarril, s/n.
03202 Elche (Alicante)
e-mail: aetox@umh.es

Copyright

El envío de un manuscrito implica: que no ha sido publicado anteriormente (excepto como abstract, o como parte de una conferencia, revisión tesis); que no está considerándose su publicación en otra revista, libro, etc.; que su publicación ha sido aprobada por todos los coautores, si los hay; que, cuando

y si el manuscrito es aceptado para su publicación, los autores están de acuerdo en la cesión automática del Copyright a la editorial y que el manuscrito no será publicado en ninguna otra parte ni en ningún otro idioma sin permiso de la editorial.

Todos los artículos publicados en esta revista están protegidos por Copyright, que cubre los derechos exclusivos de reproducción y distribución del artículo (p. ej. como separatas) y también los derechos de traducción. Ningún contenido de la revista puede ser reproducido, fotocopiado, microfilmado o almacenado en bases de datos electrónicas, videodiscos, etc., sin el permiso escrito de los titulares del Copyright.

El uso de nombres descriptivos, de marcas, marcas registradas, etc., incluso si no se identifican especialmente, no implica que estos nombres no estén protegidos por las leyes y regulaciones correspondientes.

Aunque la información en esta revista se considera exacta y verdadera en la fecha de publicación, ni la editorial, ni el director de la revista, ni los autores pueden aceptar ninguna responsabilidad legal por errores u omisiones que puedan acaecer.

Los trabajos que hayan sido aceptados se enviarán (original, dos copias y disquete) al editor de la Revista de Toxicología:

Dra. Adela López de Cerain Salsamendi
C.I.F.A. Universidad de Navarra
C/ Irunlarrea, s/n. 31008 Pamplona
(Navarra) España
Fax: 948 42 56 53
E-mail: rev.toxicol@unav.es

Información Suscripción

Para los miembros de la Asociación Española de Toxicología la suscripción está incluida en la cuota de socio de 43 €.

Suscripción anual:

España: 54 €. más 1,50 €. gastos de envío.

Extranjero: 54 €. más 8,26 €. gastos de envío.

Pedidos a:

Revista de Toxicología

Secretaria: Celia Goñi
C.I.F.A. Universidad de Navarra
C/ Irunlarrea, s/n. 31008 Pamplona
(Navarra) España
Fax: 948 42 56 52
e-mail: rev.toxicol@unav.es

D.L.: CO-723-83.

S.V.: 91051 R.

ISSN: 0212-7113

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

COMITÉ DE REDACCIÓN

Editor

Dra. ADELA LÓPEZ DE CERAÍN SALSAMENDI
Universidad de Navarra. Pamplona
E-mail: acerain@unav.es

Editor Adjunto

Dr. EDUARDO DE LA PEÑA DE TORRES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. MADRID
E-mail: epena@ccma.csic.es

Comité Editorial

Dra. M^a ISABEL ARUFE MARTÍNEZ
Universidad de Cádiz. CÁDIZ
E-mail: maribel.arufe@uca.es

Dr. CARLOS BARRIOS GUERRA
Universidad de Concepción. CONCEPCIÓN (CHILE)

Dra. ANA MARÍA CAMEAN FERNÁNDEZ
Universidad de Sevilla. SEVILLA
E-mail: camean@us.es

Dra. VICTORIA CARRERA GONZÁLEZ
Universidad Miguel Hernández. ELCHE
E-mail: v.carrera@umh.es y aetox@umh.es

Dr. DARÍO CÓRDOBA PALACIO
MEDELLÍN (COLOMBIA)

Dr. ANTONIO DUEÑAS LAITA
Universidad de Valladolid. VALLADOLID
E-mail: aduenas.laita@fcu.es

Dra. GUILLERMINA FONT PÉREZ
Universidad de Valencia. VALENCIA
E-mail: font@uv.es

Dr. ANTONIO JUAN GARCÍA FERNÁNDEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: ajgf@fcu.um.es

Dr. DIEGO GONZÁLEZ MACHÍN
CEPIS/OPS
LIMA (PERÚ)

Dr. CARLOS GOTELLI
Centro de Investigaciones Toxicológicas
BUENOS AIRES (ARGENTINA)

Dra. PILAR GASCÓ ALBERICH
Instituto Nacional de Toxicología. MADRID
E-mail: p.gasco@mju.es

Dr. ANTONIO PLÁ MARTÍNEZ
Universidad de Granada. GRANADA
E-mail: apla@goliat.ugr.es

Dr. GUILLERMO REPETTO KUHN
Instituto Nacional de Toxicología. SEVILLA
E-mail: repetto@us.es

Dr. JOSÉ RUEFF
Universidad Libre de Lisboa. LISBOA

Dr. MIGUEL ANGEL SOGORB
Universidad Miguel Hernández. ELCHE
E-mail: msogorb@umh.es

Dr. JUAN LUIS VALVERDE VILLARREAL
Instituto Nacional de Toxicología. BARCELONA
E-mail: biblio@bcn.inaltox.es

Dr. ALBERT VINGUT LÓPEZ
Instituto Nacional de Toxicología. BARCELONA
E-mail: quinica@bcn.inaltox.es

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

COMITÉ DE REDACCIÓN

Editor

Dra. ADELA LÓPEZ DE CERAÍN SALSAMENDI
Universidad de Navarra. Pamplona
E-mail: acerain@unav.es

Editor Adjunto

Dr. EDUARDO DE LA PEÑA DE TORRES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. MADRID
E-mail: epena@ccma.csic.es

Comité Editorial

Dra. M^a ISABEL ARUFE MARTÍNEZ
Universidad de Cádiz. CÁDIZ
E-mail: maribel.arufe@uca.es

Dr. CARLOS BARRIOS GUERRA
Universidad de Concepción. CONCEPCIÓN (CHILE)

Dra. ANA MARÍA CAMEAN FERNÁNDEZ
Universidad de Sevilla. SEVILLA
E-mail: camean@us.es

Dra. VICTORIA CARRERA GONZÁLEZ
Universidad Miguel Hernández. ELCHE
E-mail: v.carrera@umh.es y aetox@umh.es

Dr. DARÍO CÓRDOBA PALACIO
MEDELLÍN (COLOMBIA)

Dr. ANTONIO DUEÑAS LAITA
Universidad de Valladolid. VALLADOLID
E-mail: aduenas.laita@fcu.es

Dra. GUILLERMINA FONT PÉREZ
Universidad de Valencia. VALENCIA
E-mail: font@uv.es

Dr. ANTONIO JUAN GARCÍA FERNÁNDEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: ajgf@fcu.um.es

Dr. DIEGO GONZÁLEZ MACHÍN
CEPIS/OPS
LIMA (PERÚ)

Dr. CARLOS GOTELLI
Centro de Investigaciones Toxicológicas
BUENOS AIRES (ARGENTINA)

Dra. PILAR GASCÓ ALBERICH
Instituto Nacional de Toxicología. MADRID
E-mail: p.gasco@mju.es

Dr. ANTONIO PLÁ MARTÍNEZ
Universidad de Granada. GRANADA
E-mail: apla@goliat.ugr.es

Dr. GUILLERMO REPETTO KUHN
Instituto Nacional de Toxicología. SEVILLA
E-mail: repetto@us.es

Dr. JOSÉ RUEFF
Universidad Libre de Lisboa. LISBOA

Dr. MIGUEL ANGEL SOGORB
Universidad Miguel Hernández. ELCHE
E-mail: msogorb@umh.es

Dr. JUAN LUIS VALVERDE VILLARREAL
Instituto Nacional de Toxicología. BARCELONA
E-mail: biblio@bcn.inaltox.es

Dr. ALBERT VINGUT LÓPEZ
Instituto Nacional de Toxicología. BARCELONA
E-mail: quinica@bcn.inaltox.es

¿Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica?

Arbillaga L, Ezpeleta O y López de Cerain A*

Dpto. de Bromatología, Tecnología de alimentos y Toxicología
Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, C/ Irunlarrea 1, 31008 Pamplona

Recibido 12 de Enero de 2004 / Aceptado 9 de Marzo de 2004

Resumen: La ocratoxina A es una micotoxina producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que a través de los alimentos puede pasar al ser humano. Su órgano diana es el riñón pero también es hepatotóxica, inmunotóxica y teratogénica. Ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) como posible carcinógeno humano (clase 2B) pero se desconoce si el mecanismo de acción transcurre a través de fenómenos genéticos o epigenéticos. En este artículo se revisan los datos de genotoxicidad y mutagenicidad de esta micotoxina. Aunque los primeros estudios en ensayos de reversión mutagénica con bacterias resultaron negativos, pronto se comprobó que administrada a animales de experimentación, la ocratoxina A inducía la formación de aductos especialmente en tejidos de riñón y vejiga urinaria de ratón. También se ha comprobado que esta micotoxina produce roturas monocatenarias en el ADN, da lugar a alteraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas e induce la síntesis de ADN fuera del período S, fenómeno indicativo de procesos de reparación. Se considera que la actividad genotóxica es dependiente de activación metabólica, en particular de varias isoformas P450, si bien los metabolitos genotóxicos no han sido aislados. Los últimos estudios realizados con ocratoxina A tritiada bajo diversas condiciones experimentales indican que el principal metabolito es el derivado monohidroxilado 4-(R) – hidroxio-ocratoxina A y que ni la ocratoxina A ni este metabolito forman aductos con el ADN, por lo que su actividad genotóxica estaría más relacionada con procesos de citotoxicidad y peroxidación lipídica, los cuales podrían dar lugar a moléculas reactivas con los ácidos nucleicos.

Palabras clave: ocratoxina A, genotoxicidad, mutagenicidad, aductos, micotoxinas.

Abstract: Is the Ochratoxin A a mutagenic mycotoxine? Ochratoxin A is a mycotoxin that is produced by species of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* which when found in food, can then be passed into humans. Its major target is the kidney but it is also hepatotoxic, immunotoxic and teratogenic. It has been classified as being a possible human carcinogenic agent (Group 2B) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) but it is not known if the mode of action occurs through genetic or epigenetic events. In this article, the genotoxicity and mutagenicity data of this mycotoxin are reviewed. Although the first studies using bacterial mutagenicity tests were negative, it was soon demonstrated that *in vivo*, ochratoxin A induced

adduct formation, particularly in renal tissue and urinary bladder of mice. It is also known that this mycotoxin produces DNA single-strand breaks, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges and also induces synthesis of DNA out of the S period, an indicative event of repair processes. It is considered that the genotoxic activity is dependent on metabolic activation, particularly of some P450 isoforms, although the genotoxic metabolites have not been isolated. The last studies performed with tritiated ochratoxin A under many experimental conditions indicate that the principal metabolite is the 4-(R) – hydroxi – ochratoxin A; neither ochratoxin A nor this metabolite binds covalently to DNA, so its genotoxic activity would be more related with ochratoxin A-mediated cytotoxicity and lipid peroxidation, processes which can originate reactive species with nucleic acids.

Key words: ochratoxin A, genotoxicity, mutagenicity, adducts, mycotoxins.

Introducción

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por hongos filamentosos superiores de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (principalmente *A. ochraceus*, *P. verrucosum* y *A. carbonarium*), que fue descubierta por Van der Merwe en 1965 [1]. La molécula está formada por un anillo de isocumarina unido por medio de su grupo carboxilo a través de un enlace tipo amida, con una molécula de L-β-fenilalanina (Fig. 1). La OTA forma parte de una familia de compuestos con estructura similar, algunos de los cuales son producidos por las mismas especies fúngicas. Estos análogos estructurales de la OTA pueden ser metabolitos naturales o compuestos sintetizados “de novo” para la realización de estudios de estructura-actividad [2].

Especies fúngicas productoras de OTA pueden colonizar una gran variedad de alimentos y ser origen de su contaminación por esta micotoxina. No obstante, el crecimiento fúngico en el alimento no implica necesariamente la presencia de la micotoxina, porque su producción está influenciada por diversos factores como la humedad, la temperatura, el pH y la composición del alimento, entre otros, y estas condiciones influyen además de manera diferente en cada especie productora [3].

Numerosos estudios demuestran la presencia de OTA en una gran variedad de alimentos, como cereales, cerveza, vino, café, cacao, uvas pasas y especias [4-9]. Su presencia en tejidos animales y derivados cárnicos es también importante por lo que representa para el consumo humano. La carne bovina, en princi-

*A quien dirigir la correspondencia.

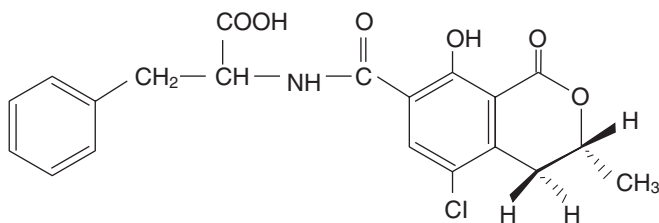


Fig. 1. Estructura química de la Ocratoxina A.

pio, no supone peligro para la salud humana ya que los rumiantes destruyen la OTA por la acción de enzimas bacterianas presentes en su panza, lo que evita que la toxina se acumule en los tejidos. Por el contrario, los alimentos derivados del cerdo, representan una fuente potencial de transmisión de la toxina a la población humana, pues se ha comprobado su presencia en riñón, hígado, tejido muscular, tejido adiposo y sangre [10,11], así como en derivados de hígado de cerdo como por ejemplo en patés [12].

Algunos datos toxicocinéticos y de toxicidad general

Aunque en los animales de granja no son infrecuentes las intoxicaciones graves por ingestión de OTA [13], en el hombre son muy escasos los datos de toxicidad aguda [14]. Lo que preocupa realmente hoy en día son aspectos de su toxicidad crónica, en especial por su potencial mutagénico y cancerígeno.

Una vez ingerida, esta micotoxina se absorbe casi por completo en el tracto gastrointestinal y alcanza rápidamente la circulación general [15]. Aunque la ingesta de OTA a través del consumo de alimentos contaminados no sea elevada, los parámetros toxicocinéticos y la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, contribuyen a la larga vida media de esta micotoxina, aumentando así su potencial tóxico [16-18].

La OTA es principalmente nefrotóxica. En estudios epidemiológicos se ha asociado el consumo crónico de OTA con el desarrollo de ciertas enfermedades endémicas, tanto en animales como en el hombre. En animales de granja el consumo crónico de la OTA se ha identificado como factor determinante en la etiología de la nefropatía porcina y de la nefropatía aviar espontánea [9,19], y en el hombre se le cree responsable de la Nefropatía Endémica de los Balcanes por la similitud entre sus síntomas y los de la nefropatía aviar y porcina, pero esta enfermedad es todavía hoy día un misterio para los epidemiólogos [20,21].

También se han demostrado efectos tóxicos de la OTA sobre el sistema inmune, nervioso y sobre el hígado. Es teratogénica y carcinogénica en animales de experimentación y está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) en el grupo 2B, como posiblemente carcinogénica en humanos [22]. En cuanto a su potencial mutagénico, los datos a veces contradictorios, son objeto de este artículo de revisión.

Aspectos moleculares de la toxicidad de la OTA

Los principales mecanismos de acción implicados en la toxicidad de la OTA son la inhibición de la síntesis de proteínas, inhibición de la respiración mitocondrial, peroxidación lipídica y secuestro del calcio intracelular. Pero estos efectos parecen ser relevantes a las concentraciones de toxina usadas experimental-

mente; mucho más elevadas que las concentraciones de exposición natural, por lo que algunos autores han propuesto que estos efectos posiblemente constituyan mecanismos de acción primarios y no específicos de la OTA [23]. En los últimos años, estudios realizados a bajas concentraciones experimentales de OTA, similares a las encontradas en la exposición natural, indican que ejerce un efecto sobre la señalización y regulación celulares. Estos cambios en la función y en el fenotipo de las células, sin destrucción ni daño celular, serían acciones específicas de la OTA [24-27].

Exposición humana

Los resultados sobre los efectos tóxicos de la OTA ponen de manifiesto la necesidad de evaluar la exposición humana a dicha micotoxina. Varios estudios han analizado OTA en fluidos biológicos para relacionar la exposición humana a esta toxina con los trastornos del sistema urinario, ya que el riñón es el principal órgano diana de su toxicidad. Así, en muchos países se ha detectado la presencia de OTA en plasma humano, lo que indica una exposición muy generalizada a esta micotoxina. En la mayoría de los estudios los niveles referidos son bajos (inferiores a 1 ng/mL) y por ello todavía se cuestiona si la concentración de OTA en plasma es el mejor indicador de exposición humana. A este respecto, un estudio sobre los niveles de OTA en sangre de donantes noruegos y suecos afirma que no hay correlación entre los niveles de OTA en plasma y la ingesta diaria total estimada de OTA, basándose en datos obtenidos de la literatura sobre diferentes alimentos [28].

En algunos estudios se han encontrado valores no muy diferentes entre pacientes sanos y pacientes con diferentes enfermedades renales [29-33]. Sin embargo, en otros en los que únicamente se estudiaron pacientes sometidos a diálisis frente a controles, se observaron valores de OTA significativamente más elevados en los primeros [34,35].

Los datos de exposición humana en diferentes zonas de España indican la presencia de esta micotoxina en el plasma de personas residentes en el norte [34], en el sur [36] y zona centro [37], a una concentración media equiparable a la hallada en otros países europeos como Francia [38], Italia [39,40], Suecia [41] y Dinamarca [42], e inferior a los encontrados en otras zonas geográficas como Checoslovaquia [43], Alemania [44], Polonia [45] y la zona de los Balcanes [46,47]. También está presente en países del norte de África como Túnez [48,33], Argelia [49], Marruecos [50] y Egipto [31].

Por otra parte, la exposición a la micotoxina puede representar un riesgo para la salud de los trabajadores, especialmente si no se toman medidas preventivas y de protección adecuadas ya que los niveles de OTA en el aire pueden resultar en un aumento de los niveles de suero [51]. Contradictoriamente, otro estudio reciente afirma que la exposición a la OTA presente en el aire, por parte de trabajadores de granjas, no está relacionado con un aumento de los niveles de OTA séricos y que por lo tanto la exposición inhalatoria de OTA es de menor importancia que la ingesta diaria de la micotoxina con los alimentos [52].

Legislación

En los últimos años, con los datos conocidos sobre la toxicidad de la OTA y de exposición a través de la dieta, varias organiza-

ciones internacionales han establecido valores de ingesta diaria admisible (IDA).

En 1991, la JECFA (Comisión mixta FAO/WHO de expertos sobre aditivos alimentarios) estableció una IDA de 16 ng/kg de pc, que corresponde con un consumo semanal admisible de 112 ng/kg de pc, basando su evaluación en el efecto nefrotóxico observado en cerdos (la especie más sensible) [53]. Este último valor se redondeó a 100 ng/kg de pc por esta misma comisión en la reunión de 1995, lo cual equivale a 14 ng/kg de pc al día [54].

Las autoridades canadienses evaluaron la OTA entre los años 1989 y 1996, y determinaron una IDA de 1,2 - 5,7 ng/kg pc, sobre la base de las propiedades carcinogénicas de esta micotoxina.

Posteriormente en 1998, el Comité Científico de la Comisión Europea sobre alimentación humana valoró los datos científicos sobre el potencial genotóxico de la OTA y sus mecanismos de acción como carcinógeno, y consideró que sería prudente reducir la exposición de OTA tanto como fuera posible, y en cualquier caso siempre inferior a 5 ng/kg de pc al día [55].

Por último la Comisión Europea publicó el reglamento (CE) n° 472/2002, por el que se establecen los límites de OTA en alimentos con el objetivo de no sobrepasar los niveles de IDA establecidos [56]. Los límites fijados son de 5 µg/kg para cereales en grano sin transformar (incluido el arroz sin transformar y el alforfón o trigo negro), de 3 µg/kg para productos derivados de los cereales (incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo) y de 10 µg/kg para uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas). Para café verde y tostado y productos del café, vino, cerveza, zumo de uva, cacao y productos del cacao y especias, cuyos límites debían haber sido establecidos antes del 31 de diciembre de 2003, en el momento de redactar este trabajo permanecen aún sin fijar.

Genotoxicidad y mutagenicidad de la ocratoxina A

Un agente mutagénico es una estructura química capaz de reaccionar directa o indirectamente con los ácidos nucleicos causando cambios no letales y hereditarios en la estructura, número o

reordenación de genes. Cuando un compuesto químico es capaz de reaccionar con el ADN, por ejemplo uniéndose covalentemente a las bases nitrogenadas formando aductos, se dice que es genotóxico. Si además se demuestra que esa interacción se traduce en un cambio estable y hereditario en la estructura del ADN, es decir en una mutación, se puede afirmar que el compuesto es mutagénico.

En la década de los 60 surgió el interés sobre la evaluación del potencial mutagénico de los productos químicos, al comprobarse que muchos de ellos eran capaces de producir alteraciones en el material hereditario, cuya estructura y replicación se habían dilucidado en la década anterior. Muy pronto se desarrollaron procedimientos sencillos de ensayos con bacterias, a los que se añadía un sistema exógeno de activación metabólica, generalmente fracción S9 obtenida de hígado de rata, lo que permitió evaluar los efectos mutagénicos de un gran número de tóxicos ambientales. Los primeros estudios de mutagénesis, realizados mediante el conocido "Test de Ames", sugerían que aproximadamente el 90% de los compuestos carcinogénicos conocidos hasta la fecha eran también mutagénicos [57].

Ensayos de mutación génica

Durante mucho tiempo la OTA fue considerada como un compuesto no mutagénico. Los primeros resultados experimentales obtenidos en ensayos que detectan mutaciones génicas en bacterias o levaduras, así lo evidenciaban [58-60] (Tabla 1). Así mismo, Würigler y col. (1991), obtuvieron resultados negativos en la estirpe de *Salmonella typhimurium* TA 102, capaz de detectar mutaciones debidas a daño oxidativo [61]. Estas primeras observaciones se han visto confirmadas en estudios más recientes, en los que se han tratado con OTA bacterias *Salmonella typhimurium* de las estirpes TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538, TA 102 y TA 104, tanto en presencia como en ausencia de mezcla S9 obtenida de hígado de rata [62,63]. Föllmann y Lucas, (2003) ensayaron también la micotoxina en un test de mutación génica, ensayo de hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HPRT), en células de mamífero V79 (fibroblastos de pulmón de hamster chino) [63]. Con este sistema experimental obtuvieron asimismo resultados negativos tanto si las células se trataban directamente con OTA, como si se

Tabla 1. Ensayos de mutación génica.

Sistema Experimental	[OTA]	Activación metabólica	Resultados	Referencia
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/1537/1538	1-100 µg/placa	S9 hígado rata	-	Kuczuk y col. 1978 [58]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3	50 y 100 µg/placa	S9 hígado rata	-	Kuczuk y col. 1978 [58]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100/1535/1537	0,5-500 µg/placa	S9 hígado rata	-	Wehner y col. 1978 [59]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100/1535/1537/1538	50-600 µg/placa	S9 hígado rata	-	Bendele y col. 1985 [60]
<i>S. typhimurium</i> TA102	37-991 µg/placa	S9 hígado rata	-	Würigler y col. 1991 [61]
<i>S. typhimurium</i> TA100/1535/1538	100 µM ⁽¹⁾		+	Henning y col. 1991 [64]
Células NIH/3T3 transfectadas con distintos CYP humanos	248 µM		+	De Groene y col. 1996 [65]
<i>S. typhimurium</i> TA98/1535/1538	121-1211 µg/placa	S9 riñón ratón	+	Obrecht-Pflumio y col. 1999 [66]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100	0-50 µg/placa	S9 Hep G2	-	Erlich y col. 2002 [62]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100/1535/1538/102/104	0,01-500 mM	S9 hígado rata	-	Föllmann y Lucas, 2003 [63]
Ensayo HPRT en la línea celular V79	0,1-100 µM	S9 hígado rata	-	Föllmann y Lucas, 2003 [63]
Ensayo HPRT en la línea celular V79	0,016-0,8 µM ⁽¹⁾		-	Föllmann y Lucas, 2003 [63]

⁽¹⁾ Concentraciones añadidas a un cultivo de hepatocitos de rata.

añadía un medio de cultivo en el que previamente se habían incubado hepatocitos de rata con la toxina (Tabla 1).

El primer resultado positivo en un test de Ames se obtuvo utilizando como sustancia de ensayo un medio derivado de hepatocitos de rata que habían sido tratados con OTA [64], lo que sugería que serían metabolitos los responsables de su acción mutagénica (Tabla 1). Esta observación fue confirmada posteriormente en un estudio realizado en líneas celulares que expresaban distintos citocromos P450 humanos [65]. Estos autores construyeron una serie de líneas celulares NIH/3T3 que expresaban de manera estable uno de los siguientes citocromos humanos: CYP1A1, CYP1A2, CYP2C10, CYP2D6 y CYP2E1. Además, contenían el gen *lac Z'* que servía como marcador para detectar la frecuencia de mutación inducida por OTA. En el rango de concentraciones ensayado, encontraron un aumento en la frecuencia de mutación en las líneas transfectadas con CYP3A4, CYP2C10, CYP1A2 y, en menor medida, CYP1A1. En las células no transfectadas o que expresaban CYP2D6 o CYP2E1 no observaron ningún incremento en la frecuencia de mutación en el gen *lac Z'*. Por lo tanto, estos datos ponen de manifiesto un efecto mutagénico de la OTA dependiente de la activación metabólica. Además, utilizando inhibidores específicos de CYP2C10 y CYP3A4, estos autores pudieron demostrar que en la mutagenicidad de la OTA en esas líneas celulares intervenía de manera inequívoca citocromo P450.

En resumen, los datos previos obtenidos con el test de Ames utilizando como sistema de activación enzimática microsomas obtenidos a partir de hígado de rata han resultado negativos. Sin embargo, el medio en el que han crecido hepatocitos cultivados con OTA parece contener metabolitos mutagénicos, si bien estos resultados no se han reproducido en el ensayo de mutación génica en células de mamífero [63]. También células transfectadas con citocromos humanos dan lugar a metabolitos mutagénicos. Parece por lo tanto que para que la genotoxicidad de la OTA se ponga de manifiesto no basta con la presencia de enzimas citocromo P450, sino que se requieren células íntegras [65].

Por otra parte, Obrecht-Pflumio y col. 1999, utilizando microsomas obtenidos a partir de riñón de ratón y como cofactores el tradicional sistema generador de NADPH (NADP / glucosa-6-P / glucosa-6-P-deshidrogenasa) o bien ácido araquidónico, obtuvieron resultados positivos en el test de Ames, especialmente si el cofactor era ácido araquidónico [66]. Estos resultados indican

que rutas metabólicas diversas pueden dar lugar a compuestos genotóxicos, algunas de las cuales serían más activas en los órganos diana. Por esta razón, estos autores sugieren la realización del test de Ames utilizando fracciones microsomales de otros órganos además de hígado.

Ensayos que miden reparación de ADN

En diversos estudios se ha evaluado la capacidad genotóxica de la OTA midiendo la síntesis de ADN derivada del proceso de reparación (Tabla 2). El primer estudio referido en la literatura sobre el potencial genotóxico de la OTA fue realizado por Ueno y Kubota en el año 1976 [67]. Evaluaron trece micotoxinas, entre ellas la OTA, y cinco toxinas modificadas genéticamente, mediante un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano propuesto por Kada y col. (1972) [68]. En este ensayo se utiliza un mutante de *Bacillus subtilis* deficiente en el sistema de reparación del ADN por recombinación, lo que le confiere mayor sensibilidad que su cepa de origen a agentes que alteran el ADN. Por esta razón, compuestos potencialmente mutagénicos inhiben el crecimiento de esta cepa mutante. La OTA no produjo inhibición del crecimiento bacteriano, por lo que se dedujo que no era capaz de lesionar el ADN. También en bacterias, otros autores han medido la capacidad de la OTA para inducir los sistemas de reparación mediante el ensayo "SOS chromotest" desarrollado por Malaveille y col. (1989) [69], en *Escherichia coli*. Sakai y col. (1992) [70] obtuvieron resultados negativos, mientras que Malaveille y col. (1994) [71], a concentraciones del orden de 1000 veces más altas, obtuvieron resultados positivos (Tabla 2).

Sin embargo, unos años más tarde, Mori y col. (1984) observaron que la OTA y otras micotoxinas inducían síntesis no programada de ADN en cultivo primario de hepatocitos de rata y ratón a 1 y 10 μM respectivamente [72]. Bendele y col. (1985) en un sistema experimental semejante no encontraron resultados positivos en un rango de dosis inferior; debido a problemas de citotoxicidad, la concentración más alta ensayada por estos autores fue de 0,012 μM [60]. Estos resultados se confirmaron posteriormente también *in vitro* en células diana como son, las epiteliales de vejiga de cerdo (PUBEC) [73] y las uroteliales humanas [74]. Por lo tanto estos resultados indican que como consecuencia del tratamiento de las células con la toxina, se producen lesiones en el ADN que son corregidas por los sistemas celulares de reparación, los cuales sintetizan ADN fuera del período S.

Tabla 2. Ensayos que miden reparación de ADN.

Sistema Experimental	[OTA]	Resultados	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> H17 y M45	20 y 100 $\mu\text{g}/\text{placa}$	-	Ueno y col. 1976 [67]
<i>E. coli</i> cepa PQ 37	20 μM y 60 μM ⁽²⁾	-	Sakai y col. 1992 [70]
<i>E. coli</i> cepa PQ 37	1000, 2000 y 4000 μM	+	Malaveille y col. 1994 [71]
Hepatocitos de rata ⁽¹⁾	1 μM	+	Mori y col. 1986 [72]
Hepatocitos de ratón ⁽¹⁾	10 μM	+	Mori y col. 1986 [72]
Hepatocitos de rata ⁽¹⁾	0,00006-0,012 μM	-	Bendele y col. 1985 [60]
Células PUBEC	0,25-5 μM	+	Dörrenhaus y Föllmann, 1997 [73]
Hepatocitos de rata ⁽¹⁾	0,01-1 mM	+	Dörrenhaus y Föllmann, 1997 [73]
Células uroteliales humanas ⁽¹⁾	0,01-2 mM	+	Dörrenhaus y col. 2000 [74]

⁽¹⁾ Cultivo primario.

⁽²⁾ Activación metabólica: S9 hígado rata.

Tabla 3. Ensayos que miden fragmentación de ADN.

Sistema Experimental	[OTA]	Resultados	Referencia
Rotura de hebras aisladas de ADN			
Células de bazo	25 µM	+	Creppy y col. 1985 [76]
Línea celular CHO y AWRF	124 µM	+	Stetina y Votava, 1986 [75]
Ratón / Hígado, riñón y bazo	2,5 mg/kg p.c.	+	Creppy y col. 1985 [76]
Rata / Hígado y riñón	288,8 µg/kg p.c.	+	Kane y col. 1986 [77]
Ensayo del cometa			
Línea celular Hep G2	0-62 µM	+	Erlich y col. 2002 [62]
Línea celular MDCK	1nm-500 µM ⁽¹⁾	+	Lebrun y Föllmann, 2002 [78]

⁽¹⁾ Activación metabólica: S9 hígado rata.

Tabla 4. Ensayos de alteraciones cromosómicas.

Sistema Experimental	[OTA]	Resultados	Referencia
Aberraciones cromosómicas			
Linfocitos humanos	15 nM ⁽¹⁾	+	Manolova y col. 1990 [79]
Intercambios entre cromátidas hermanas			
Hámster chino / Médula ósea	25-200 mg/kg p.c.	-	Bendele y col. 1985 [60]
Células PUBEC	100 pM-100 nM	+	Föllmann y col. 1995 [80]
Micronúcleo			
Células OSV	12-30 µM (6 h.)	+	Degen y col. 1997 [81]
Células SHE	5-20 µM (3-72 h.)	+	Dopp y col. 1999 [82]
Células Hep G2	12-120 µM (1 y 24 h.)	+	Erlich y col. 2002 [62]

⁽¹⁾ Activación metabólica: S9 riñón rata.

Ensayos que miden fragmentación del ADN

En todos los estudios en los que se ha medido fragmentación de ADN se han obtenido resultados positivos (Tabla 3). Se ha demostrado que la OTA produce roturas monocatenarias del ADN tanto en sistemas *in vitro* [75,76] como *in vivo* en rata [77] y ratón [76].

Más recientemente se han obtenido asimismo resultados positivos con el ensayo del cometa en el que células aisladas y tratadas con una solución de lisis, se someten a electroforesis en un gel de agarosa. En aquellos casos en los que se hayan producido roturas en el ADN, éste se expande desde el núcleo formando una estela en forma de cometa cuyo tamaño es directamente proporcional a la intensidad del daño sufrido. Mediante este ensayo Lebrun y Föllmann (2002) han confirmado en la línea celular MDCK, derivada de células renales de perro, que la OTA produce roturas monocatenarias de manera concentración dependiente y que este efecto aumenta tras la metabolización de la OTA con fracción S9 de hígado de rata [78]. Erlich y col. (2002) también observaron migración del ADN, en la línea celular HepG2, derivada de hepatocarcinoma humano y concluyeron que la OTA puede causar efectos genotóxicos en tejido hepático humano [62].

Alteraciones cromosómicas

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de fragmentación de ADN, sería previsible que esta micotoxina fuera capaz de producir alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Sin embargo, son relativamente escasos los estu-

dios en los que se ha comprobado dicho potencial (Tabla 4). Manolova y col. (1990) realizaron análisis citogenéticos a partir de cultivos de linfocitos humanos tratados con OTA en presencia y en ausencia de activación metabólica (fracción S9 de riñón de rata). Observaron aberraciones cromosómicas, particularmente trisomía-X, en aquellos cultivos tratados únicamente con la micotoxina, mientras que el nivel de estas alteraciones cromosómicas disminuía con la adición de S9 [79].

Entre los ensayos citogenéticos de genotoxicidad se incluye el de intercambio entre cromátidas hermanas si bien el mecanismo molecular por el que se producen dichos intercambios no está dilucidado. No obstante, se considera que el intercambio entre cromátidas hermanas es una manifestación citológica de que hay roturas en el ADN y consecuentemente, un intercambio entre dos cromátidas de un mismo cromosoma. El intercambio ocurre durante la replicación, y puede ser inducido por compuestos que forman aductos con el ADN o por compuestos que interfieren en la reparación de ADN. Bendele y col (1985), en hamster chino a los que se les administró OTA por vía oral no obtienen diferencias significativas en células de médula ósea [60]. Sin embargo *in vitro*, Föllmann y col. (1995) obtienen resultados positivos en células epiteliales del sistema urinario (PUBEC) tratadas con distintas concentraciones de la micotoxina (Tabla 4). También se observó que el metabolito de la OTA, OTα, presuntamente no tóxico, es genotóxico en este ensayo a concentraciones superiores (10 nm-10 µM) [80].

Más recientemente, se ha estudiado la actividad mutagénica de la OTA mediante el test del micronúcleo (MN), capaz de detectar alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructu-

rales, pero de una manera indirecta. Los micronúcleos son pequeñas partículas que contienen fragmentos acéntricos de cromosoma, es decir sin centrómero, o cromosomas enteros, que quedan rezagados en la disyunción anafásica de los cromosomas mitóticos, razón por la cual no quedan incluidos en ninguno de los dos núcleos de las células hijas y forman un micronúcleo independiente en el citoplasma. Por lo tanto, teóricamente, mediante este ensayo se pueden detectar dos tipos de efectos: a) clastogénicos, producidos por aquellos compuestos que producen roturas cromosómicas y dan lugar a alteraciones estructurales, b) aneugénicos, producidos por aquellos compuestos que alteran el proceso normal de migración cromosómica durante la anafase mitótica y dan lugar a alteraciones numéricas. La distinción entre uno y otro tipo requiere el análisis del contenido de los micronúcleos mediante técnicas de hibridación *in situ*.

En células de la vesícula seminal ovina (OSV), que carecen de actividad monooxigenasa pero expresan una elevada actividad prostaglandina H sintetasa (PGHS), se demostró que la OTA induce MN de forma dosis-dependiente y con un efecto principalmente clastogénico [81] (Tabla 4). No obstante, en contra de lo esperado, la presencia de indometacina, inhibidor de PGHS, no hizo disminuir la frecuencia de MN inducidos por OTA, lo que sugiere que la genotoxicidad de la OTA en esas células es independiente de esa vía metabólica. También en células SHE (embrión de hamster sirio) la OTA induce MN de manera dosis y tiempo dependiente [82] (Tabla 4). El número de MN inducido por la micotoxina fue estadísticamente significativo al cabo de 3 h de tratamiento a la concentración de 10 μM , alcanzando un máximo a las 36 h y 15 μM . Los resultados indican un efecto predominantemente clastogénico y un efecto directo sobre los filamentos de actina. Entre los estudios más recientes se encuentra el de Erlich y col. (2002) que encuentran asimismo resultados positivos en la línea celular Hep G2 a concentraciones entre 12 y 120 μM , con un máximo de MN tras 24 h de tratamiento y 61 μM [62].

Formación de aductos con el ADN

Los aductos son lesiones premutagénicas que se producen por la unión covalente entre ciertos compuestos químicos de naturaleza electrofílica y los átomos de N y O de las bases nitrogenadas del ADN. *In vivo* se han obtenido resultados positivos en diversos tejidos de rata y ratón [83-86], así como en sistemas *in vitro* [87,88] (Tabla 5). Sin embargo, en estudios recientes tanto *in vivo* como *in vitro* en cultivo primario de hepatocitos humanos y de rata, los resultados obtenidos han sido negativos [89,90]. En estos últimos experimentos se ha utilizado la micotoxina marcada radiactivamente con ^3H y se han determinado tanto los metabolitos como los aductos específicos generados por la micotoxina y sus metabolitos. Las conclusiones derivadas de estos trabajos se comentan en el siguiente apartado.

Genotoxicidad y metabolismo

Como se ha podido comprobar por la información aportada en esta revisión los datos sobre la genotoxicidad de la OTA son inconsistentes y aparentemente contradictorios. Varias hechos parecen ciertos:

1) El tratamiento de animales de experimentación con la micotoxina da lugar a la *formación de aductos* en el ADN de diversos tejidos, especialmente riñón y vejiga urinaria de ratón, y

también produce *roturas monocatenarias* en dichos tejidos [76-77, 83-86].

2) Como consecuencia del tratamiento de células en cultivo con ocratoxina A se producen *roturas en el ADN* que, bajo las condiciones apropiadas, se ponen de manifiesto por las formas de *cometa*, por los *intercambios entre cromátidas hermanas*, por las *alteraciones cromosómicas* directas o bien por los *micronúcleos* [62,78-82].

3) En los ensayos de mutación génica en bacterias y células de mamífero en cultivo el tratamiento directo con la micotoxina, incluso en presencia de un sistema exógeno de activación metabólica, da resultados negativos, por lo que parece que la toxina no es capaz de revertir una mutación preexistente [58-63]. Solamente dos excepciones a esta regla: el medio de cultivo en el que han crecido hepatocitos tratados con OTA ha dado resultados positivos en el test de Ames [64]; la mezcla S9 de riñón de ratón ha dado lugar a resultados positivos en el test de Ames de manera preferente si como cofactor se utiliza ácido araquidónico en lugar de NADPH [66].

4) En cultivo primario de hepatocitos y otras células diana el tratamiento con OTA induce el proceso de *reparación de ADN*, ya que se produce síntesis de ADN fuera del período S [71-74].

5) En células transfectadas con citocromos humanos y portadoras del gen *lac Z'* el tratamiento con OTA produjo mutaciones en dicho gen consistentes principalmente en grandes deleciones [65].

Por lo tanto, salvo las excepciones citadas en el punto 3, el efecto genotóxico de la OTA se ha puesto de manifiesto o bien en ensayos que miden interacción con el ADN (aductos, reparación) o bien en ensayos que detectan fragmentación (alteraciones cromosómicas, micronúcleos, cometas), no propiamente en ensayos específicos de mutación reversa. Este efecto genotóxico se considera dependiente de activación metabólica, si bien los metabolitos genotóxicos no han sido identificados por el momento.

Dos son los vías metabólicas implicadas: citocromo P450 y prostaglandina H sintetasa (PGHS). En los experimentos de De Groene y col. (1996) los citocromos humanos implicados son CYP3A4, CYP2C10, CYP1A2 y, en menor medida, CYP1A1 [65]; Ed Adlouni y col. (2000) encuentran un aumento en la formación de aductos, detectados mediante la técnica de post-marcaje con ^{32}P , en un sistema experimental con DNA aislado tratado con OTA y microsomas de levadura que expresan el citocromo humano CYP 2C9 [91]. Además, cuando la OTA se incubaba con microsomas obtenidos de riñón de conejo pretratado con fenobarbital se producía asimismo un incremento en el número de aductos [91].

Por otra parte, la PGHS se ha implicado en la bioactivación de la OTA *in vivo* sobre la base de que la co-administración de OTA junto con indometacina o aspirina, ambos conocidos inhibidores de PGHS, disminuía la formación de aductos en ratón [86]. Esta hipótesis se ha visto apoyada posteriormente en un ensayo con estirpes de *Salmonella typhimurium*, en el que la mezcla S9 de hígado de ratón resultaba más eficaz como sistema de bioactivación de la micotoxina cuando se utilizaba como cofactor ácido araquidónico en lugar de NADPH [66]. Sin embargo, en células

Tabla 5. Formación de aductos con el ADN.

Sistema Experimental	[OTA]	Activación metabólica	Resultados	Referencia
Ratón / Hígado, riñón y bazo	0,6-2,5 mg/kg p.c.		+	Pfohl-Leszkowicz y col. 1991 [83]
Ratón / Hígado, riñón y bazo	2,5 mg/kg p.c.		+	Pfohl-Leszkowicz y col. 1993a [84]
Ratón / Testículos y riñón	0,2-2,5 mg/kg p.c.		+	Pfohl-Leszkowicz y col. 1993b [85]
Ratón / Vejiga urinaria y riñón	2 mg/kg p.c.		+	Obrecht-Pflumio y col. 1996 [86]
Línea celular Vero	10-100 μ M		+	Grosse y col. 1995 [87]
DNA de salmón	250 μ M	Microsomas de hígado y riñón conejo y ratón ⁽¹⁾	+	Obrecht-Pflumio y Dirheimer, 2000 [88]
DNA de salmón	250 μ M	Peroxidasa HRP	+	Obrecht-Pflumio y Dirheimer 2001 [92]
DNA de salmón	100 μ M	Varios	+/-	Ed Adlouni y col. 2000 [91]
DNA de timo de ternera	100 μ M ⁽³⁾	Varios	-	Gautier y col. 2001 [89]
Rata / Riñón	1 mg/kg p.c.		-	Gautier y col. 2001 [89]
Hepatocitos humanos ⁽²⁾	0,1-10 μ M ⁽³⁾		-	Gross-Steinmeyer y col. 2002 [90]
Hepatocitos de rata ⁽²⁾	0,1-10 μ M ⁽³⁾		-	Gross-Steinmeyer y col. 2002 [90]

⁽¹⁾ Cofactores: NADPH o ácido araquidónico.

⁽²⁾ Cultivo primario.

⁽³⁾ OTA marcada radiactivamente con ³H. Determinación de aductos por conteo de centelleo.

de vesícula seminal ovina, que expresan gran cantidad de PGHS, la indometacina no inhibía la formación de micronúcleos [81]. Por lo tanto el papel que juega esta vía de transformación metabólica en la genotoxicidad de la OTA está pendiente de confirmar. Por último, Ed Adlouni y col. (2000) deducen que el enzima glutation-S-transferasa estaría también implicada en la genotoxicidad de la OTA al encontrar que la inhibición de dicho enzima reducía la formación de aductos [91].

A este respecto, consideramos muy esclarecedor el estudio de Gautier y col (2001) [89] que utilizando OTA tritiada comprobaron, bajo diversas condiciones experimentales, la formación de metabolitos, que determinan mediante HPLC, así como la capacidad genotóxica de la micotoxina y sus metabolitos, que determinan mediante la detección de aductos específicos de OTA por conteo de centelleo. Estos autores llegan a interesantes conclusiones que pasamos a resumir: a) En microsomas de hígado, tanto de rata como humano, el único metabolito que se forma es el derivado hidroxilado 4 - (R) - OH -OTA. No encuentran diferencias entre sexos y comprueban que este metabolito no es genotóxico. b) En microsomas de riñón de rata, ratón o humano no encuentran metabolitos de la OTA y tampoco detectan unión covalente al ADN. c) En sistemas experimentales con PGHS y peroxidasa (HRP) no encuentran evidencia de formación de aductos. En todos los experimentos incluyen controles positivos de compuestos que o bien son metabolizados por los sistemas enzimáticos utilizados o bien dan lugar a aductos, por lo que se excluye la posibilidad de falsos negativos bajo las condiciones experimentales utilizadas en ese estudio.

Por lo tanto, concluyen que la OTA no da lugar a metabolitos que reaccionen directamente con el ADN. Posiblemente la actividad genotóxica de la OTA sea secundaria a procesos de citotoxicidad y peroxidación lipídica que generarían radicales libres responsables de las lesiones producidas en el ADN.

En los estudios anteriores los aductos se habían medido mediante la técnica de post-marcaje con ³²P que no es específica, por lo que no se puede asegurar que en los aductos detectados por ese procedimiento esté presente una molécula de ocratoxina o meta-

bolito [83-88,92]. Por el contrario, la técnica de centelleo utilizada por estos autores detecta exclusivamente aductos de OTA o derivados al disponer de la toxina marcada radiactivamente [89,90]. El límite de detección del conteo de centelleo en las condiciones de ese estudio es de 2,7 aductos / 10⁹ bases y el límite de detección de la técnica de post-marcaje es entre 3 y 20 veces aproximadamente más alto. Por lo tanto, todos los aductos detectados por la técnica de post-marcaje deberían ser detectados mediante centelleo. Puesto que no ocurre así se puede deducir que la mayor parte de los aductos atribuidos anteriormente a la toxina no contendrían un residuo OTA, sino que las lesiones serían consecuencia de la citotoxicidad de la OTA [89].

Tampoco Gross-Steinmeyer y col (2002) en cultivo primario de hepatocitos de rata y humanos tratados con OTA tritiada encuentran aductos en el ADN [90]. Identifican tres metabolitos, uno de los cuales es el derivado hidroxilado 4 - (R) - OH -OTA, y otros dos unidos a pentosa y hexosa, respectivamente. Su límite de detección es de 2 aductos / 10⁹ bases, por lo que concluyen también que la OTA no da lugar a metabolitos que reaccionen con el ADN. Sus resultados, por tanto, apoyan la hipótesis de Gautier y col. (2001) [89], reforzada por el hecho de que en hepatocitos humanos y de rata metabólicamente activos, después del tratamiento con OTA se produce una disminución de la relación GSH/GSSG [90].

Conclusión

En resumen, a la vista de todos estos datos, aunque el efecto genotóxico de la OTA está fuera de toda duda, el mecanismo de acción está todavía sin esclarecer y cobra fuerza la hipótesis de una acción indirecta derivada de la citotoxicidad de la micotoxina y no tanto de su capacidad intrínseca de reacción con el ADN.

Bibliografía

1. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott B, Theron JJ (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. Nature 4976: 1112-3.

2. Xiao H, Madhyastha S, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich AA, Kemppainen BW (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analoges: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* 137: 182-92.
3. Moss MO (1996). Mycotoxins. *Mycol Res* 100: 513-23.
4. European Commission (1995). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population in EU member states. 3^o informe SCOOP. (Working document in support of a SCF risk assessment of ochratoxin A). Coordinador: Dinamarca. Noviembre.
5. Legarda TM y Burdaspal PA (1998). Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países Europeos. *Alimentaria*, abril: 115-22.
6. Studer-Rohr I, Dietrich DR, Schlatter J, Schlatter C (1995). The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem Toxicol* 33: 341-55.
7. Zimmerli B y Dick R (1996). Ochratoxin A in table wine and grape- juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit Contam* 13: 655-68.
8. Burdaspal PA y Legarda TM (1999) Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, enero-febrero: 107-13.
9. Krogh P (1987). Ochratoxicosis in food. En: *Mycotoxins in food*. Krogh P, editor. Food science and technology, series monographs. Academic Press.
10. Josefsson EBG y Möller TE (1980). Heat stability of ochratoxin A in pig products. *J Sci Food Agr* 31: 1313-5.
11. Jorgensen K (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit Contam* 15: 550-4.
12. Jiménez AM, López de Cerain A, González-Peñas E, Bello J (2001). Determination of OTA in pig liver derived pâtés by high-performance liquid chromatography. *Food Addit Contam* 18: 559-63.
13. Kuiper-Goodman y Scott PM (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Review. *Biomedical and Environmental sciences* 2: 179-248.
14. Di Paolo N, Guarnieri A, Garosi G, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M (1994). Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 9 Suppl 4: 116-20.
15. Kumagai S y Aibara K (1982). Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 64: 94-102.
16. Chu FS (1971). Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 147: 359-66.
17. Chu FS (1974). A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin. *Biochem Pharmacol* 23: 1105-13.
18. Schlatter CH, Studer-Rohr J, Rásonyi TH (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 13: 43-4.
19. Hamilton PB, Huff WE, Harris JR, Wyatt RD (1982). Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poult Sci* 61: 2172-4
20. Bozic Z, Duancic V, BeliczkaM, Kraus O, Skljarov I (1995). Balkan endemic nephropathy: still a mysterious disease. *Eur J Epidemiol* 11: 235-8.
21. Plestina R (1996). Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 13 Suppl: 49-50.
22. IARC (1993). Ochratoxin A. En: *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon. Vol. 56: 489-521.
23. Gekle M, Gabner B, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S, Pfaller W Schramek H (1998). Characterization of an ochratoxin A dedifferentiated and cloned renal epithelial cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 152: 282-91.
24. Schramek H, Wilflingseder D, Pollack V, Freudinger R, Mildenerger S, Gekle M (1997). Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1460-7.
25. Benesic A, Mildenerger S, Gekle M (2000). Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflug Arch* 439: 278-87.
26. Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Wilflingseder D, Pollack V, Dander M y Schramek H (2000). Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 837-44.
27. Horvath A, Upham BL, Ganey V, Trosko JE (2002). Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. *Toxicol* 40: 273-82.
28. Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen S, Jahrl S, Widenfalk A, Bosnes V, Alexander J, Hult K y Olsen M (2001). Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem Toxicol* 39: 1145-51.
29. Frohlich AA, Marquardt RR, Ominski KH (1991). Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: a Canadian perspective. En: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon 115: pp. 139-43.
30. Tápai K, Téren J, Mesterházy A (1997). Ochratoxin in the sera of blood donors and ill persons. *Proceedings of the fifth European Fusarium seminar, Szeged Hungría*. pp. 307-8.
31. Wafa EW, Yahya RS, Sobh MA, Eraky I, El Baz M, El Gayar HA, Betbeder AM, Creppy EE (1998). Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human Exp Toxicol* 17: 124-9.
32. Gilbert J, Brereton P, MacDonalds S (2001). Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Addit Contam* 18(12): 1088-93.
33. Grosso F, Saïd S, Mabrouk I, Freymy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food Chem Toxicol* 41: 1133-40.
34. Jiménez AM, López de Cerain A, González-Peñas E, Bello J, Betbeder AM, Creppy EE (1998). Exposure to ochratoxin A in Europe: comparison with a region of northern Spain. *J Toxicol Toxin Rev* 17: 479-91.
35. Malir F, Roubal T, Brndiar M, Osterreicher J, Severa J, Knizek J, Kacerovsky J, Tmejova M, Betbeder AM, Braudimont I, Creppy EE (2001). Ochratoxin A in the Czech republic. *J Toxicol Toxin Rev* 20 (3-4): 261-74.
36. Pérez de Obanos A, López de Cerain A, Jiménez AM, González-Peñas E, Bello J (2001). Ocratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España. *Rev Toxicol* 18: 19-23.
37. Burdaspal PA y Legarda TM (1998). Datos sobre presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria*, mayo: 103-9.
38. Creppy EE, Betbeder AM, Charbi A, Counord J, Castegnaro M, Bartsch H, Moncharmont P, Fouillet B, Chambon P, Dirheimer G (1991). En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Human ochratoxicosis in France. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon: pp. 145-51.
39. Breiholtz-Emanuelsson A, Minervini F, Hult K, Visconti A (1994). Ochratoxin A in human serum samples collected in

- southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Natural Toxins* 2: 366-70.
40. Palli D, Miraglia M, Saieva C, Masala G, Cava E, Colatosti M, Corsi AM; Russo A, Brera C (1999). Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 8: 265-9.
 41. Breiholtz-Emanuelsson A, Olsen M, Dahlbäck A, Hult K (1991). Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Addit Contam* 8(2): 183-92.
 42. Hald B (1991). Ochratoxin A in human blood in European countries. En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC scientific publications, Lyon: pp. 159-64.
 43. Ruprich J y Ostry V (1993). Study of human exposure to ochratoxin A and assessment of possible sources. *Central Eur J Publ Health* 1: 46-8.
 44. Bauer J y Gareis M (1987). Ochratoxin A in the food chain. *Zentral-Veterinarmed-B* 34(8): 613-27.
 45. Golinsky P, Grabarkiewicz-Szcesna J, Chelkowski J, Hult K, Kostecki M (1991). Possible sources of ochratoxin A in human blood in Poland. En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon: pp. 153-8.
 46. Krogh P (1976). Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nordisk Veterinaermedicin* 28: 452-8.
 47. Fuchs R, Radic B, Ceovic S, Sostaric B, Hult K (1991). Human exposure to ochratoxin A. En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon: pp. 131-5.
 48. Bacha H, Maaroufi K, Achour A, Hamammi M, Ellouz F, Creppy EE (1993). Ochratoxines et ochratoxicoses humaines en Tunisie. En: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G. Ed. *Human ochratoxicosis and its pathologies*, INSERM, John Libbey Eurotext LTD, Paris 231: pp. 111-21.
 49. Khalef A, Zidane C, Charef A, Gharbi A, Tadjerouna M, Betbeder AM, Creppy EE (1993). Ochratoxicoses humaines en Algérie. En: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, Ed. *Human ochratoxicosis and its pathologies*, INSERM, John Libbey Eurotext LTD, Paris 231: pp. 123-7.
 50. Filali A, Betbeder AM, Baudrimont I, Benayad A, Soulaymani R, Creppy EE (2002). Ochratoxin A in human plasma in Morocco. A preliminary survey. *Human Exp Toxicol* 21(5): 241-5.
 51. Iavicoli I, Brera C, Carelli G, Caputi R, Marinaccio A, Miraglia M (2002). External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *Int Arch Occup Environ Health* 75(6): 381-6.
 52. Skaug MA (2003). Levels of ochratoxin A and IgG against conidia of *Penicillium verrucosum* in blood samples from healthy farm workers. *Ann Agric Environ Med* 10(1): 73-7.
 53. JECFA (1991). Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-seventh report. WHO Technical Report Series N° 806, p. 29-31.
 54. JECFA (1995). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-fourth report. WHO Technical Report Series N° 806, p 35-6.
 55. Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A (expressed on 17 September 1998) Consumer Policy and Consumer Health Protection.
 56. Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 472/2002 de la Comisión de 12 marzo de 2002 que modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 2002; L 75/18-20.
 57. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(12): 5135-9.
 58. Kuczuk MH, Benson PM, Heath H, Hayes AW (1978). Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 53: 11-20.
 59. Wehner FC, Thiel PG, Van Reusburg SJ, Demasius PC (1978). Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. *Mutat Res* 58: 193-203.
 60. Bendele AM, Neal SB, Oberly TJ, Thompson CZ, Bewsey B, Hill LE, Rexroat MA, Carlton WW, Probst GS (1985). Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assay. *Food Chem Toxicol* 23: 911-8.
 61. Würzler FE, Friederich U, Schlatter J (1991). Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* 261: 209-16.
 62. Ehrlich V, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Gann M, Majer BJ, Eisenbauer M, Knasmüller S (2002). Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem Toxicol* 40: 1085-90.
 63. Föllmann W y Lucas S (2003). Effects of the mycotoxin ochratoxin A in bacterial and a mammalian in vitro mutagenicity test system. *Arch Toxicol* 77(5): 298-304.
 64. Henning A, Fink-Gremmels J, Leistner L (1991). Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. En: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky In, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumors*. IARC Scientific Publications, Lyon 115: pp. 255-60.
 65. de Groene EM, Hassing IGAM, Blom MJ, Seinen W, Fink-Gremmels J, Horbarch GJ (1996). Development of human cytochrome P450-expressing cell lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Research* 56: 299-304.
 66. Obrecht-Pflumio S, Chassat T, Dirheimer G, Marzin D (1999). Genotoxicity of ochratoxin A by *Salmonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutat Res* 446: 95-102.
 67. Ueno Y y Kubota K (1976). DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Research* 36: 445-51.
 68. Kada K, Tsuchikawa K y Sadaie Y (1972). In vitro and host-mediated *Rec assay* procedures for screening chemical mutagens, and phloxine, mutagenic red dye detected. *Mutat Res* 16: 165-74.
 69. Malaveille C, Vineis P, Estéve J, Ohshima H, Brun G, Hautefeuille A, Gallet P, Ronco G, Terracini B, Bartsch H (1989). Levels of mutagens in the urine of smokers of black and blond tobacco correlate with their risk of bladder cancer. *Carcinogenesis* 10: 577-86.
 70. Sakai M, Abe KI, Okumura H, Kawamura O, Sugiura Y, Horie Y, Ueno Y (1992). Genotoxicity of fungi evaluated by *SOS microplate assay*. *Natural Toxins* 1: 27-34.
 71. Malaveille C, Brun G, Bartsch H (1994). Structure-activity studies in *E. Coli* strains on ochratoxin a (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative as reactive metabolites. *Mutat Res* 307: 141-7.
 72. Mori H, Kawai K, Ohbayashi F, Kuniyasu T, Yamazaki M, Hamasaki T, Williams GM (1984). Genotoxicity of a variety of

- mycotoxins in the hepatocyte primary culture/ DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Research* 44: 2918-23.
73. Dörrenhaus A y Föllmann W (1997). Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Arch Toxicol* 71: 709-13.
 74. Dörrenhaus A, Flieger A, Golka K, Schulze H, Albrecht M, Degen GH, Föllmann W (2000). Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicol Sci* 53: 271-7.
 75. Stetina R y Votava M (1986). Induction of single-strand breaks and DNA synthesis inhibition by patulin, ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B₁ in cell lines CHO and AWRP. *Folia Biol (Praha)* 32: 128-44.
 76. Creppy EE, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet C, Mousset S, Frayssinet C (1985). Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol Lett* 28(1): 29-35.
 77. Kane A, Creppy EE, Roth A, Roschenthaler R, Dirheimer G (1986). Distribution of the (3H)-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. *Arch Toxicol* 58(4): 219-24.
 78. Lebrun S y Föllmann W (2002). Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch Toxicol* 75: 734-41.
 79. Manolova Y, Manolov G, Parvanova L, Petchkova-Bocharova J, Castegnaro M, Chernozemsky I (1990). Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat Res* 231: 143-9.
 80. Föllmann W, Hillebrand IE, Creppy EE, Bolt HM (1995). Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Arch Toxicol* 69: 280-6.
 81. Degen GH, Gerber MM, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer G (1997). Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch Toxicol* 71: 365-71.
 82. Dopp E, Müller J, Hahnel C, Schiffmann D (1999). Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblast caused by ochratoxin A. *Food Chem Toxicol* 37: 713-21.
 83. Pfohl-Leszkowicz A, Chakor K, Creppy EE, Dirheimer G (1991). DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. *IARC Scientific Publications* 115: pp. 245-53.
 84. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Creppy EE, Dirheimer G (1993a). Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat Res* 289: 265-73.
 85. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Gharbi A, Baudrimont I, Obrecht S, Creppy EE, Dirheimer G (1993b). Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A? En: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G (eds). *Human ochratoxycosis and its pathologies. Colloque INSERM; 231: John Libbey Eurotext, London, pp. 177-87.*
 86. Obrecht-Pflumio S, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A, Dirheimer G (1996). Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Arch Toxicol* 70: 244-8.
 87. Grosse Y, Baudrimont I, Castegnaro M, Betbeder AM, Creppy EE, Dirheimer G, y col (1995). Formation of OTA metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chem Biol Interact* 95: 175-87.
 88. Obrecht-Pflumio S y Dirheimer G (2000). In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chemicobiological interactions* 127: 29-44.
 89. Gautier J, Richoz J, Welti DH, Markovic J, Gremaud E, Guengerich FP, Turesky RJ (2001). Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chem Res Toxicol* 14(1): 34-45.
 90. Gross-Steinmeyer K, Weymann J, Hege H-G, Metzler M (2002). Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *J Agric Food Chem* 50: 938-45.
 91. El Adlouni C, Pinelli E, Azémar B, Zaoui D, Beaune P, Pfohl-Leszkowicz A (2000). Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 123-31.
 92. Obrecht-Pflumio S y Dirheimer G (2001). Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A. *Arch Toxicol* 75(10): 583-90.

Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación

Alonso J, García MA, Pérez-López M y Melgar MJ*

Área de Toxicología, Facultad Veterinaria. Universidad Santiago de Compostela. C/ Carvalho Calero s/n 27002-LUGO.

Tfno.: 982252231 ext 22206. Fax: 00 34 982252195. E-mail: mjmelgar@lugo.usc.es

Recibido 20 de Junio de 2003 / Aceptado 24 de Octubre de 2003

Resumen: Se presenta un estudio sobre la presencia de metales pesados (cadmio, mercurio, plomo, cobre y zinc) en 238 muestras de carpóforos pertenecientes a 28 especies comestibles de hongos silvestres en la provincia de Lugo. El método analítico para la determinación de metales ha sido la Voltamperometría de redisolución anódica. Se ha estudiado la incidencia de los siguientes factores en la acumulación de metales en los hongos: especie, ecología (micorrízicas, saprófitas terrícolas, saprófitas lignícolas y saprófitas cultivadas) y parte anatómica del carpóforo (himenóforo y resto del carpóforo). Las especies saprófitas terrícolas muestran las máximas concentraciones metálicas, siendo las más bajas las de las especies lignícolas y cultivadas. Individualmente las especies más relevantes han sido: *Agaricus macrosporus* para el cadmio, *Boletus pinophilus*, para el mercurio, *Coprinus comatus* y *Lepista nuda* para el plomo, *Macrolepiota procera* para el cobre, y *Calvatia utriformis* y *Lactarius deliciosus* para el zinc. El himenóforo es la parte anatómica que muestra mayores niveles de metales.

Palabras clave: Macromicetos comestibles, metales pesados, voltamperometría, factores de bioconcentración (BCF).

Abstract: Macrofungi as potential biomediation agent in compost material contaminated with heavy metals. A study on the presence of heavy metals (cadmium, mercury, lead, copper and zinc) in 238 samples from 28 species of edible wild mushrooms from the Province of Lugo, is presented. An anodic stripping voltammetric technique was used. The following factors were considered: species, ecology (mycorrhizals, terrestrial saprophytes, and cultivated and wild saprophytes) and morphological portion (hymenium and the rest of the fruit body). Wild saprophytic species showed higher levels than mycorrhizals species, with the cultivated species being those with lower levels. The highest levels of metal were found in the following species: Cadmium, *Agaricus macrosporus*; mercury, *Boletus pinophilus*; lead *Coprinus comatus* and *Lepista nuda*; copper; *Macrolepiota procera*; and zinc, *Calvatia utriformis* and *Lactarius deliciosus*. Hymenophore was always the morphological portion that contained the highest levels of metal.

Key words: Edible mushrooms, heavy metals, voltammetric technique, bioconcentration factors (BCF)

Introducción

Los metales pesados son elementos potencialmente tóxicos, cuya presencia en el medio ambiente se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, fundamentalmente por la acción del hombre. La contaminación metálica supone una amenaza medioambiental importante para los seres vivos, ya que diversos metales que son micronutrientes esenciales, como el cobre y el zinc, resultan tóxicos en concentraciones elevadas, mientras que otros, como cadmio, plomo y mercurio, son tóxicos a dosis mínimas.

Entre los organismos presentes en los ecosistemas terrestres son particularmente destacables los macromicetos, por su ubicuidad y extensa e íntima integración en el medio. El micelio de estos hongos puede captar y bioacumular los metales pesados, apareciendo posteriormente en los carpóforos o setas, en concentraciones a veces muy superiores a las del medio.

La captación de metales pesados por los hongos y la presencia en los carpóforos que éstos producen, depende de una serie de factores medio ambientales y del propio hongo [1-7]. Los primeros determinan la movilidad y disponibilidad de los metales y los segundos definen la mayor capacidad acumuladora de los hongos respecto a las plantas y la diferente aptitud captadora mostrada por las distintas especies.

Inicialmente los metales son fijados por grupos funcionales (fosfato, carboxil, amino y especies diéster de éstos) de los componentes de la pared celular de los hongos, sobre todo polisacáridos como la quitina [8]. Parte de ellos serán transportados al interior de la célula y su traslocación a los carpóforos se ve favorecida por la comunicación orgánica que existe en todo el micelio. La existencia de proteínas, polipéptidos y otras macromoléculas implicadas en la captación de algunos metales, será el principal factor que determine la gran capacidad de acumulación que muestran algunas especies [9-13]. La edad, el grado de expansión y la distribución del micelio en el substrato, así como el tamaño, edad y región anatómica del carpóforo, también influyen significativamente en la presencia de metales pesados [1, 14-16].

*A quien dirigir la correspondencia.

Son, por tanto, múltiples los factores que intervienen, y la interacción de todos ellos determinará la capacidad de captación y acumulación de los metales en los hongos. Muchos de estos factores aun no son bien conocidos, y la importancia biológica y ecológica que puedan tener algunos metales en los hongos es aún una incógnita.

Material y métodos

Muestreo

Se seleccionaron 28 especies de macromicetos frecuentes en las zonas de estudio, comestibles y/o con interés comercial: 15 micorrízicas y 13 saprófitas, de las cuales 9 son terrícolas, 2 lignícolas y 2 cultivadas.

Las zonas de muestreo se distribuyeron en 2 grandes áreas: un área principal en el término municipal de Lugo y alrededores, y un área secundaria en el sur de la provincia, en el municipio de Quiroga. La selección de estas zonas se estableció siguiendo criterios de disponibilidad de las especies y de exposición a contaminación, distinguiéndose 2 tipos de zonas: 1. Zonas expuestas a contaminación antropogénica, es decir, zonas urbanas y zonas anexas a carreteras y, 2. Zonas libres de contaminación aparente, que serían zonas campestres o forestales alejadas de núcleos urbanos, carreteras u otras fuentes de contaminación. Estas zonas se dividieron en 32 subzonas dependiendo de las características del hábitat, de tal forma que se recogieron un total de 238 muestras de carpóforos y 56 muestras de suelos (una o más por subzona dependiendo de la extensión de la misma). Las muestras de macromicetos cultivados se obtuvieron en los mercados locales.

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon según el método descrito por García y col.[4]: los carpóforos se limpiaron y se separaron dos partes anatómicas (himenóforo, o zona fértil en donde se forman las esporas sexuales y el resto del carpóforo). Posteriormente se procedió a la homogeneización y conservación de las muestras en congelación.

Las muestras de suelos se recogieron mediante extractor, obteniéndose un volumen constante correspondiente a los 10 cm superficiales.

Para la mineralización de las muestras de carpóforos se procedió a una digestión abierta con mezcla sulfonítrica (1:4) para el análisis de mercurio [6], y calcinación en horno de mufla a 425 °C y disolución de cenizas en HCl 0,1 N para el análisis de los demás metales.

En muestras de suelos la digestión abierta se realizó con agua regia (HCl:HNO₃ 3:1) para el análisis de todos los elementos.

Análisis

La determinación de los metales se llevó a cabo mediante voltamperometría de redisolución anódica de impulso diferencial (equipo Metrohm VA 693 processor acoplado a stand VA 694), con electrodo de gota de mercurio (HMDE) para el análisis de Zn, Cd, Pb y Cu, y con electrodo rotativo de oro para el análisis de Hg.

Las condiciones de trabajo fueron las descritas por Alonso y col. [6] y Pérez-López y col. [17], estando los potenciales de pico localizados a -1000 mV para el zinc, -600 mV para el cadmio, -400 mV para el plomo, -100 mV para el cobre y 600 mV para el mercurio.

En el análisis de Zn, Cd, Pb y Cu se utilizó tampón acetato para ajustar el pH de las muestras, CH₃COOH (2 mol/l):NH₃ (1 mol/l). Para la determinación del Hg, inmediatamente antes del análisis se añade a cada muestra 0,4 ml de EDTA (0,1 mol/l), 0,2 ml de ácido perclórico (70%) y 0,1 ml de ClNa (0,1 mol/l).

La cuantificación se realizó mediante el método de adiciones estándar, empleando disoluciones patrón a las concentraciones adecuadas.

La calidad del método se valoró mediante el estudio de los parámetros de sensibilidad (límite de detección), exactitud (material de referencia del líquen *Evernia prunastri* y recuperaciones analíticas) y precisión (coeficiente de variación). El resumen de este estudio se muestra en la tabla 1.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos del análisis por duplicado de las diversas partes anatómicas de las 238 muestras de carpóforos y del análisis de las 56 muestras de suelos, se resumen en la tabla 2.

Se observa cómo las mayores concentraciones de metales se encuentran en himenóforo, siendo los valores medios especialmente elevados en mercurio, superiores a los encontrados habitualmente en otros organismos animales o vegetales. A partir de los datos de suelos y carpóforos, es posible calcular los factores de bioconcentración o FBC (cociente entre la concentración metálica en carpóforo y la concentración en el suelo de crecimiento), que muestran el carácter bioacumulador o bioexcluyente de estos organismos. En la tabla 3 se resumen estos factores, observando que los hongos se comportan como activos bioacumuladores de todos los metales exceptuando el plomo, para el que se muestran como bioexcluyentes. Este hecho pone de manifiesto que los macromicetos muestran escasa aptitud captadora para el plomo, unido a la baja movilidad y disponibilidad de este metal en el suelo.

A partir de los resultados obtenidos, se valoran a continuación los factores que afectan a los contenidos de metales pesados en los hongos.

Ecología

Puede observarse en la figura 1, cómo las especies saprófitas terrícolas muestran las máximas concentraciones para todos los metales, con diferencias significativas respecto a los otros grupos. Tras ellas se sitúan las especies micorrízicas, y con niveles mucho más bajos especies lignícolas y cultivadas. Los mayores valores que muestran las especies saprófitas terrícolas respecto a las micorrízicas puede deberse a la mayor actividad descomponedora que muestran las primeras, ya que, como indica Hoiland [3], la degradación de las sustancias polifenólicas, favorece la liberación y captación de los metales. Además, Yoshida y Muramatsu [18, 19] indican que el micelio de los hongos sapró-

Tabla 1. Caracteres analíticos del método empleado.

	Cd	Hg	Pb	Cu	Zn
Límite de detección: en disolución blanco ($\mu\text{g/L}$)	0,081	1,201	0,306	0,990	0,738
en muestras de carpóforos ($\mu\text{g/kg}$)	1,242	27,15	4,590	21,43	11,69
Exactitud: Mat. referencia	0,117	0,20	4,9	3,6	30,4
Certificado (mg/kg)	0,100-0,134	0,16 – 0,24	4,3 – 5,5	3,1 – 4,1	27,0 – 33,8
Determinado (mg/kg)	0,11 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	4,95 \pm 0,30	3,26 \pm 0,25	29,5 \pm 1,1
	95,73 %	88,50 %	101,02	90,28 %	97,04 %
Recuperación analítica media (%)	98,7	90,20	92,8	89,26	94,39
Precisión (coeficiente variación)	2,03	6,21	4,22	4,15	1,23

Tabla 2. Concentraciones medias (mg/kg de peso seco).

	Cd	Hg	Pb	Cu	Zn
Himenóforo	0,819	2,121	1,171	102,8	165,4
Resto del carpóforo	0,454	1,427	1,122	79,60	104,7
Carpóforo completo	0,568	1,625	1,133	86,54	122,2
Suelos	0,079	0,016	25,25	23,12	35,51

Tabla 3. Factores de bioconcentración medios.

	Cd	Hg	Pb	Cu	Zn
Himenóforo	24,16	177,4	0,067	10,35	7,460
Resto del carpóforo	14,56	119,8	0,063	7,884	4,596
Carpóforo completo	16,50	131,3	0,064	9,366	5,172

fitos se localiza fundamentalmente en los horizontes más superficiales del suelo, en los cuales se concentran la mayor cantidad de los metales pesados, mientras que el micelio de las especies micorrízicas se encuentra normalmente en horizontes más profundos.

Los menores contenidos encontrados en las especies cultivadas y lignícolas pueden explicarse por el pequeño volumen de sustrato sobre el que crecen, y por la baja concentración de metales que normalmente presentan estos sustratos, como así lo indican autores como Tyler [20] y Gabriel y col. [21].

Especies

Considerando las Especies individualmente, en la tabla 4 se resumen los niveles medios de metales encontrados en las especies de estudio, destacando para cada metal por su aptitud captadora las siguientes: *Agaricus macrosporus* (cadmio); *Boletus pinophilus* (mercurio); dos especies para el plomo, *Coprinus comatus*, por presentar las mayores niveles de este metal, aunque debe tenerse en cuenta que es la especie con mayor presencia en áreas urbanas, con niveles de contaminación más elevados, y fuera de las zonas urbanas, *Lepista nuda*; *Macrolepiota procera* (cobre); y *Calvatia utriformis* y *Lactarius deliciosus* (zinc).

La especie *Agaricus macrosporus* fue la más sobresaliente por su aptitud captadora, ya que para todos los metales se encuentra entre las 3 primeras especies con mayores concentraciones o

FBC, destacando especialmente para cadmio. *Agaricus silvicola*, una especie muy cercana taxonómicamente, muestra también concentraciones elevadas. Al estudiar los factores de bioconcentración (FBC), *Agaricus macrosporus* amplifica, por término medio, 873 veces los niveles de cadmio del suelo, frente a los 16,5 habituales en otras especies, y sólo *Agaricus silvicola* se acerca con un FBC medio de 350.

Diversos investigadores han destacado la capacidad acumuladora de las especies de *Agaricus* de la sección arvenses [1-2, 5, 16, 22-23] a la que pertenecen *A. macrosporus* y *A. silvicola*. La elevada acumulación de cadmio en estos hongos se debe a la presencia de ciertas macromoléculas implicadas en la captación de este metal, como la fosfogluco proteína cadmio-micofosfotina y otras proteínas de bajo peso molecular identificadas en *Agaricus macrosporus* [24-25]. Además se ha observado en estos hongos que el crecimiento micelial se ve estimulado por la presencia de cadmio hasta un valor crítico, planteando la posibilidad de que este elemento pudiera ser un factor de crecimiento para estos organismos [26].

Parte anatómica

Respecto a la Parte anatómica del carpóforo, se han encontrado para todos los metales, excepto el plomo, mayores concentraciones en himenóforo, con diferencias significativas respecto al resto del carpóforo. En esta parte, a su vez, el sombrero muestra mayores niveles respecto al pie (Figura 2).

Tabla 4. Concentraciones medias (mg/kg de peso seco) en las especies estudiadas.

Especie	n	Cadmio	Mercurio	Plomo	Cobre	Zinc
<i>Agaricus bisporus</i>	6	0,195	0,399	0,504	67,20	65,12
<i>Agaricus campestris</i>	9	0,657	1,871	2,307	108,7	162,4
<i>Agaricus macrosporus</i>	13	33,22	4,012	1,349	202,9	194,0
<i>Agaricus silvicola</i>	6	6,444	2,196	1,419	142,4	146,5
<i>Agrocybe cylindrica</i>	6	0,397	0,287	0,624	35,12	61,13
<i>Amanita rubescens</i>	12	0,636	0,461	0,790	54,04	151,9
<i>Boletus aereus</i>	6	0,654	3,738	0,657	71,75	115,6
<i>Boletus aestivalis</i>	6	0,699	1,789	0,929	57,79	142,6
<i>Boletus edulis</i>	10	0,819	2,389	0,706	62,12	84,61
<i>Boletus pinophilus</i>	13	0,797	5,209	0,595	60,62	100,9
<i>Calvatia utriformis</i>	7	0,515	2,437	2,316	235,6	265,8
<i>Cantharellus cibarius</i>	13	0,277	0,334	0,779	55,35	76,93
<i>Clitocybe nebularis</i>	9	0,476	1,334	1,356	78,48	117,9
<i>Coprinus comatus</i>	10	1,225	2,404	3,823	121,3	113,9
<i>Fistulina hepatica</i>	6	0,206	0,242	0,477	34,13	39,46
<i>Hydnum repandum</i>	8	0,332	0,492	0,831	36,13	32,25
<i>Lactarius deliciosus</i>	9	0,282	0,590	0,662	22,77	199,5
<i>Leccinum scabrum</i>	6	1,048	0,449	1,337	44,22	83,81
<i>Lepista nuda</i>	9	0,558	3,718	2,341	118,8	130,9
<i>Macrolepiota procera</i>	12	1,006	1,962	1,416	212,5	88,20
<i>Marasmius oreades</i>	6	0,460	0,875	1,098	110,8	111,6
<i>Russula cyanoxantha</i>	6	0,345	0,956	0,601	67,26	90,07
<i>Tricholoma columbetta</i>	12	0,341	0,495	0,789	70,28	187,6
<i>Tricholoma equestre</i>	6	0,366	0,726	0,708	45,61	144,3
<i>Tricholoma portentosum</i>	10	0,479	0,776	0,533	53,75	107,9
<i>Xerocomus badius</i>	9	0,624	0,345	0,606	52,35	181,3
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	6	0,535	0,453	1,070	68,96	124,5

n: número de muestras.

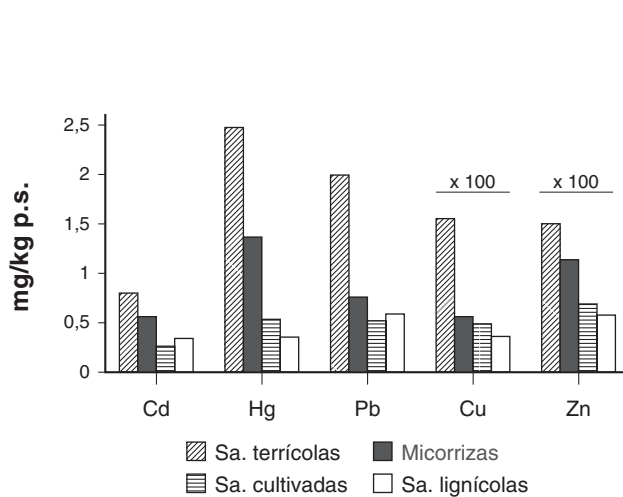


Fig. 1. Niveles de metales pesados en macromicetos según ecología.

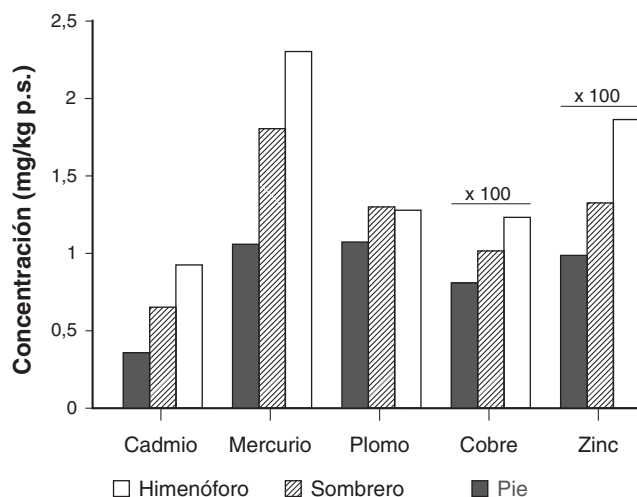


Fig. 2. Concentraciones de metales pesados en las distintas partes del carpóforo.

Las razones de la distinta aptitud captadora de las partes anatómicas, pueden relacionarse con el mayor contenido proteico que autores como Chang y Chan [27] han observado en himenóforo, posiblemente debido a la mayor actividad biológica de esta porción, al ser la parte fértil productora de esporas sexuales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Xunta de Galicia, que a través del proyecto PGIDT02TAL26101PR ayudó a la realización del presenta trabajo.

Bibliografía

1. Quinche JP (1987) Le cadmium, un élément présent en traces dans les sols, les plantes et les champignons. *Revue Suisse Agric.* 19 (2): 71-77
2. Kojo MR, Lodenius M (1989) Cadmium and mercury in macrofungi. Mechanisms of transport and accumulation. *Angew. Botanik* 63: 279-292
3. Hriland K (1995) Reaction of some decomposer basidiomycetes to toxic elements. *Nor. J. Bot.* 15(3): 305-318
4. García MA, Alonso J, Fernández, MI; Melgar MJ (1998) Lead content in edible wild mushrooms in northwest Spain as indicator of environmental contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 330-335
5. Melgar MJ, Alonso J, Pérez-López M,; García MA (1998) Influence of some factors in toxicity and accumulation of cadmium from edible wild macrofungi in NW Spain. *J. Environ. Sci. Health*, B33(4): 439-455
6. Alonso J, Salgado MJ, García MA, Melgar MJ (2000) Accumulation of mercury in edible macrofungi: Influence of some factors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 158-162
7. Alonso J, García MA, Pérez-López M, Melgar MJ (2003) The Concentrations and Bioconcentration Factors of copper and zinc in edible mushrooms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 180-188
8. Gadd GM (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60
9. Schmitt JA, Meisch HU (1985) Cadmium in mushrooms – distribution, growth effects and binding. *Trace Elements Medicine* 2(4): 163-166
10. Morselt AFW, Smits WTM, Limonard T (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 96: 417-420
11. Jones D, Hutchinson TC (1988) Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. II. Uptake of nickel, calcium, magnesium, phosphorus and iron. *New Phytol.* 108: 461-470
12. Turnau K, Kottke I, Dexheimer J (1996) Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus*/*Pinus sylvestris* mycorrhizas collected from calamine dumps. *Mycol. Res.* 100(1): 16-22
13. Turnau K, Kottke L, Dexheimer J, Botton B (1994) Element distribution in mycelium of *Pisolithus arrhizus* treated with cadmium dust. *Ann. Botany* 74: 137-142
14. Hedrich E (1988) Short-time activation analysis of some austrian mushrooms. *J. Trace Microprobe Techniques* 6(4): 583-602
15. Michelot D, Siobud E, Doré JC, Viel C, Poirier F (1998) Update on metal content profiles in mushrooms. Toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation. *Toxicol.* 36(12): 1997-2012
16. Kalač P, Svoboda L (2000) A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.* 69: 273-281
17. Pérez-López M, Nóvoa MC, Alonso J, Melgar MJ (2003) Niveles de plomo y cadmio en agua marina y lapas (*Patella vulgata* L.) de la Ría de Vigo. *Revista de Toxicología* 20(1): 19-22
18. Yoshida S, Muramatsu Y (1994a) Accumulation of radiocesium in basidiomycetes collected from Japanese forests. *Sci. Total Environ.* 157, 197-205
19. Yoshida S, Muramatsu Y (1994b) Radiocesium concentrations in mushrooms collected in Japan. *J. Environ. Radioactivity* 22: 141-154
20. Tyler G (1982) Metal accumulation by wood decaying fungi. *Chemosphere* 11(11): 1141-1146
21. Gabriel J, Baldrian P, Rychlovský P, Krenželok, M (1997) Heavy metal content in wood-decaying fungi collected in Prague and in the National Park Šumava in the Czech Republic. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 595-602
22. Seeger R (1978) Cadmium in mushrooms. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 166(1): 23-34
23. Kalač P, Stašková I (1994) Heavy metals in fruiting bodies of wild growing mushrooms of the genus *Agaricus*. *Potrav. Vědy* 12(3): 185-195
24. Meisch HU, Bechmann J, Schmitt JA (1983) A new cadmium binding phosphoglycoprotein, cadmium-mycophosphatin, from the mushroom *Agaricus macrosporus*. *Biochim. Biophys.* 745: 259-266
25. Meisch HU, Schmitt JA (1986) Characterization studies on cadmium-mycophosphatin from the mushroom *Agaricus macrosporus*. *Environ. Health Perspectives* 65: 29-32
26. Meisch HU, Scholl AR, Schmitt JA (1981) Cadmium as a growth factor for the mushroom *Agaricus abruptibulbus* (Peck) Kauffmann. *Z. Naturforsch.* 36c: 765-771
27. Chang ST, Chan KY (1973) Quantitative and qualitative changes in proteins during morphogenesis of the basidiocarp of *Volvariella volvacea*. *Mycol.* 65: 355-364.

Detección “*in vivo*” mediante RAPD de alteraciones en el ADN producidas por benzo(a)pireno

Becerril* C, Acevedo, H, Llorente¹ MT y Castaño¹ A

Servicio de Toxicología C.N.A. (AESAs), Majadahonda, 28220 Madrid.

¹Division de Toxicología Medioambiental. CISA-INIA Valdeolmos-28130 Madrid. e-mail: cbeceril@isciii.es

Recibido 28 de Julio de 2003 / Aceptado 24 de Noviembre de 2003

Resumen: La técnica de RAPD (Amplificación al Azar de ADN Polimórfico) permite detectar alteraciones inespecíficas en el ADN procedente de células que poseen una dotación genética idéntica, como son las líneas celulares establecidas, mediante la comparación del patrón de bandas de las células expuestas y no expuestas a la acción de genotóxicos.

En los últimos años hemos desarrollado una metodología sensible y reproducible utilizando la línea celular RTG-2, derivada de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Sin embargo, es preciso comprobar la capacidad predictiva de este ensayo mediante estudios *in vivo*. La línea celular RTG-2, como se ha evidenciado en trabajos anteriores, presenta una gran similitud genética con la especie de la que procede. Por ello, en este trabajo, se ha llevado a cabo una exposición subletal a benzo(a)pireno mediante inyección intraperitoneal de 69 µg/g de p.c. en alevines de trucha arco iris, valorando la aparición de mutaciones mediante la comparación del patrón de bandas obtenido a partir del ADN de células de sangre periférica, a diferentes tiempos (1 - 3 meses). Debido a que la presencia de bandas polimórficas dificulta el análisis entre los grupos de individuos tratados y no tratados, las comparaciones se realizaron en un mismo individuo antes y después del tratamiento. Los análisis cualitativos y cuantitativos mostraron tanto la aparición de nuevas bandas, como alteraciones en su intensidad confirmando, de esta manera, los resultados que previamente habíamos obtenido *in vitro* tras exposiciones a este mismo genotóxico.

Palabras clave: Genotoxicidad, RAPD, huella genética ADN, B(a)P, trucha arco iris.

Abstract: *In vivo* detection of DNA alterations produced by Benzo(a)pyrene using the RAPD technique. The RAPD technique (Random Amplified Polymorphic DNA) is able to detect nonspecific alterations in the DNA of cells with identical gene pool, such as in the case of the established cell lines, by band pattern comparisons of exposed and nonexposed cells. In the past few years, we have developed a sensitive and highly reproducible methodology using RTG-2 cells, an established cell line derived from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). However, it is necessary to test the predictive ability of this assay for *in vivo* studies. The RTG-2 cell line, as we have previously shown, pre-

sents a good genetic similarity with the species from which it derives. Here we show the results of an *in vivo* study on rainbow trout individuals sublethally exposed to 69 µg/g bw of benzo(a)pyrene by i.p. injection. The genotoxic effects have been assessed by band pattern comparison of the DNA that was obtained from peripheral blood cells taken up at different periods of time (1 - 3 months). Due to the fact that the presence of polymorphisms interferes with the analysis between the treated and untreated groups, the comparisons were carried out on the same individual before and after the treatment. Qualitative and quantitative analyses showed the presence of new bands and alterations in band intensity, confirming the results obtained *in vitro* with the same genotoxic agent.

Keywords: Genotoxicity, RAPD, fingerprint ADN, B(a)P, rainbow trout.

Introducción

Las especies piscícolas están sometidas a exposiciones agudas o crónicas causadas por contaminantes ambientales de diferente naturaleza. El potencial genotóxico de alguno de estos compuestos puede alterar la molécula de ADN de las células somáticas y/o germinales de los individuos expuestos y, en función de su naturaleza, su concentración y duración de la exposición, llegar a modificar la estructura genética de las poblaciones, particularmente si estas alteraciones son capaces de permanecer y transmitirse a través de generaciones (1). Por ello y aunque en ecotoxicología el centro de interés se establece a escala poblacional, la detección temprana de daño al ADN en células somáticas adquiere una gran importancia (2, 3).

En este sentido la utilización de líneas celulares derivadas de especies piscícolas podría resultar de gran utilidad para predecir los efectos a nivel genético que la exposición a determinadas sustancias químicas podría inducir en organismos vivos. La línea celular RTG-2 derivada de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es una de las más utilizadas en estudios ecotoxicológicos, habiéndose demostrado en estudios de citotoxicidad, realizados para predecir la toxicidad relativa de sustancias químicas y muestras ambientales, una muy buena correlación *in vivo* / *in vitro* (4, 5).

Esta línea celular también ha sido utilizada para la detección de efectos genotóxicos, aplicando las técnicas tradicionales de valoración de genotoxicidad en humanos (intercambio de cro-

*A quien dirigir la correspondencia.

mátidas, aberraciones cromosómicas etc) (6, 7). Sin embargo, estas técnicas citogenéticas resultan especialmente tediosas cuando se aplican sobre células de peces, ya que en general estos poseen un elevado número de cromosomas de pequeño tamaño. Para resolver estos inconvenientes en los últimos años, se han desarrollado nuevas metodologías, como por ejemplo el ensayo comet, o se han realizado adaptaciones de ensayos ya existentes, como en el caso del ensayo de micronúcleos al que se le han incorporado sistemas de conteo automatizados como la citometría de flujo o el análisis de imagen (8, 9, 10). De igual forma, la aplicación de determinadas técnicas moleculares como la amplificación de genes por PCR o el ADN fingerprint o huella genética, están proporcionando herramientas muy valiosas en los procesos de valoración del riesgo genotóxico medioambiental (11, 12).

La técnica de RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA o Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN) desarrollada por Williams en 1990 (12) permite la amplificación de fragmentos de ADN sin conocimiento previo de su secuencia mediante la utilización conjunta de cebadores de secuencia arbitraria y bajas temperaturas de hibridación. El resultado es la obtención de una huella genética o patrón de bandas característico del ADN de la especie utilizada (13).

Ya que las líneas celulares establecidas presentan una dotación genómica idéntica la huella genética o patrón de bandas obtenido mediante la técnica RAPD, es constante y específico de su ADN, sin la distorsión que presenta la existencia de bandas polimórficas consecuencia de las diferencias interindividuales en la especie *in vivo* (14).

Además, las líneas celulares debido a sus cortos ciclos celulares, permiten realizar, en períodos de tiempo reducidos, seguimientos de los efectos transgeneracionales que pueden producir las exposiciones crónicas a contaminantes medioambientales, lo que las convierten en un sistema muy adecuado para los estudios de genotoxicidad.

En trabajos previos nuestro equipo de investigación ha aplicado esta técnica para la detección de daño inespecífico al ADN tras exposiciones agudas y crónicas de células RTG-2 a genotóxicos patrón (15, 16). No obstante la idoneidad de su aplicación está en función básicamente, de la constatación de que los resultados obtenidos *in vitro* se correlacionen con los resultados que se obtengan en estudios *in vivo*.

En el presente trabajo se realizó un estudio de detección de alteraciones en el genoma de trucha arco iris tras una exposición intraperitoneal subletal a benzo(a)pireno, el mismo contaminante ambiental utilizado en los estudios *in vitro* (15).

Para monitorizar los efectos de la exposición al tóxico en un mismo individuo en una escala temporal, se han utilizado células de sangre periférica que no implicaban el sacrificio de los animales.

Material y Métodos

Se utilizaron un total de 18 truchas para un estudio multiensayo, de las cuales 8 (T1-T8) tras un período de tres meses de duración fueron utilizadas en este estudio. Las truchas fueron acli-

matadas, durante un mes antes de la exposición, en acuarios individuales de cristal de 50 L con flujo continuo. Los parámetros de calidad del agua (pH, oxígeno disuelto y temperatura) se controlaron diariamente. El peso medio de los individuos, en el momento de la exposición, fue de 150 grs aproximadamente.

Se realizó una exposición subletal en la mitad de los individuos (T5-T8) de 69 µg/g de peso corporal de benzo(a)pireno (B(a)P, CAS nº 50-32-8, Sigma, USA) mediante una única inyección intraperitoneal, utilizando aceite de maíz como solvente. Las truchas restantes (T1-T4), fueron tratadas con la misma cantidad de aceite de maíz y se utilizaron como control.

Para realizar los análisis se extrajeron vía vena caudal, 1 ml de sangre periférica en controles y expuestos, inmediatamente antes de iniciar el tratamiento (t_0) y posteriormente, a intervalos de 30 días (t_1 , t_2 , t_3). Dicha sangre se recogió en tubos heparinizados y se centrifugó a 1500 rpm durante 2 min. El sedimento obtenido se resuspendió en 500 µl de tampón citrato (pH 7.4) y se distribuyó en alícuotas de 100 µL que se congelaron y almacenaron a -70 °C hasta su posterior análisis.

Extracción del ADN y reacción de RAPD

El ADN de cada alícuota se extrajo con fenol-cloroformo y su integridad se comprobó en geles de agarosa al 0,8% utilizando como marcador de peso molecular el fago λ (13). La reacción de RAPD se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer (mod. 2400) utilizando 5 ng de ADN mediante un procedimiento optimizado ya descrito en trabajos anteriores (16, 17). Se seleccionaron 4 cebadores en función de su buena correlación *in vivo* / *in vitro* (22): AA-82 (5'-GATCCATTGC-3'), AA-89 (5'-GGCCTCTGAT-3'), C-96 (5'-AGCACTGTCA-3') y D-8 (5'-CCAAGTCGACA-3'). Debido a la presencia de polimorfismos detectados en los individuos antes de la exposición, se realizó un estudio individualizado de todos los individuos (tratados y no tratados). Para facilitar este estudio, en cada gel se corrieron conjuntamente las reacciones de amplificación realizadas con el ADN procedente de un solo individuo y un solo cebador, a los diferentes tiempos de análisis (t_0 a t_3) por cuadruplicado, un blanco (sin ADN molde) y un marcador de peso molecular (marker IV, Roche, Alemania). Los geles se realizaron por duplicado en diferentes días.

Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa (2,1% a 140 V durante 4 h) y tinción con bromuro de etidio. La imagen obtenida en cada gel fue captada utilizando el programa Grab-it (UVP, USA) y para evitar la subjetividad del operador, los geles se analizaron mediante el programa GelWork 1D (UVP, USA). Las bandas se codificaron siguiendo el sistema descrito por Theodorakis y Shugart (18).

Análisis de los resultados

Se llevó a cabo un estudio horizontal intrasujeto, comparando cualitativa y cuantitativamente los patrones de bandas obtenidos a los diferentes tiempos de extracción (t_0 , t_1 , t_2 , t_3), considerando como control en cada individuo, su correspondiente perfil fluorimétrico en t_0 .

El análisis cualitativo consistió en la detección de pérdida y/o ganancia de nuevas bandas en los perfiles de cada uno de los individuos. El estudio cuantitativo se realizó comparando estadísticamente los valores del porcentaje de amplificación, considerando tanto los valores individualizados de cada una de las bandas (excepto las obtenidas con AA-89), como los agrupados en función de sus pesos moleculares (alto, medio y bajo peso molecular) (16).

El análisis estadístico se llevo a cabo comparando en primer lugar, la homogeneidad de las varianzas de cada individuo, mediante la prueba de Friedman, a lo largo del período de estudio y posteriormente, mediante la *t*-Student, las diferencias entre los perfiles fluorimetricos de cada uno de ellos en t_1 , t_2 , t_3 y su correspondiente control a t_0 . El tratamiento estadístico se realizó mediante el programa SPSS.

Resultados y discusión

La presencia de bandas polimórficas (Fig.1) consecuencia de la variabilidad genética que presentan los individuos dentro de una misma población, dificulta el análisis comparativo entre los patrones de bandas de individuos tratados y no tratados. Por esta razón, se ha realizado un estudio horizontal a lo largo del tiempo para cada uno de los individuos (tratados y no tratados), comparando cualitativa y cuantitativamente, los patrones de bandas

obtenidos con cada uno de los cebadores antes (t_0) y después (t_1 t_2 t_3) de la exposición a B(a)P.

En el análisis cuantitativo, mediante la prueba de Friedman, se advirtieron diferencias significativas en prácticamente la totalidad de las bandas en todos los individuos tratados mientras que en los no tratados ninguna de ellas se mostró alterada (Tabla 1). Cuando se estudió la evolución de las alteraciones en función del tiempo (Tabla 2a) se observó en t_1 un 31% de bandas alteradas presentando una gran variación (del 42% al 20%) en función del individuo analizado. Este porcentaje aumentó al 53% en t_2 (del 58% al 50%) para disminuir a prácticamente niveles basales al final del período estudiado (t_3). Esta observación puede ser consecuencia del propio sistema dinámico de renovación de células sanguíneas que se ve favorecido además, por el propio diseño del experimento, ya que los sangrados secuenciales estimulan la eritropoyesis.

Como ya se ha demostrado en trabajos anteriores en los estudios *in vitro*, (15, 16) las diferencias cuantitativas entre los patrones de bandas resultan más patentes cuando éstas se agrupan en función de sus pesos moleculares (Tabla 2b). No obstante, y por razones obvias, los resultados de dicha agrupación varían en función del cebador, de manera que cebadores con un mayor número de bandas y distribuidas en un amplio rango de pesos moleculares, p.ej. AA-89, AA-82 y C-96, resultan más adecua-

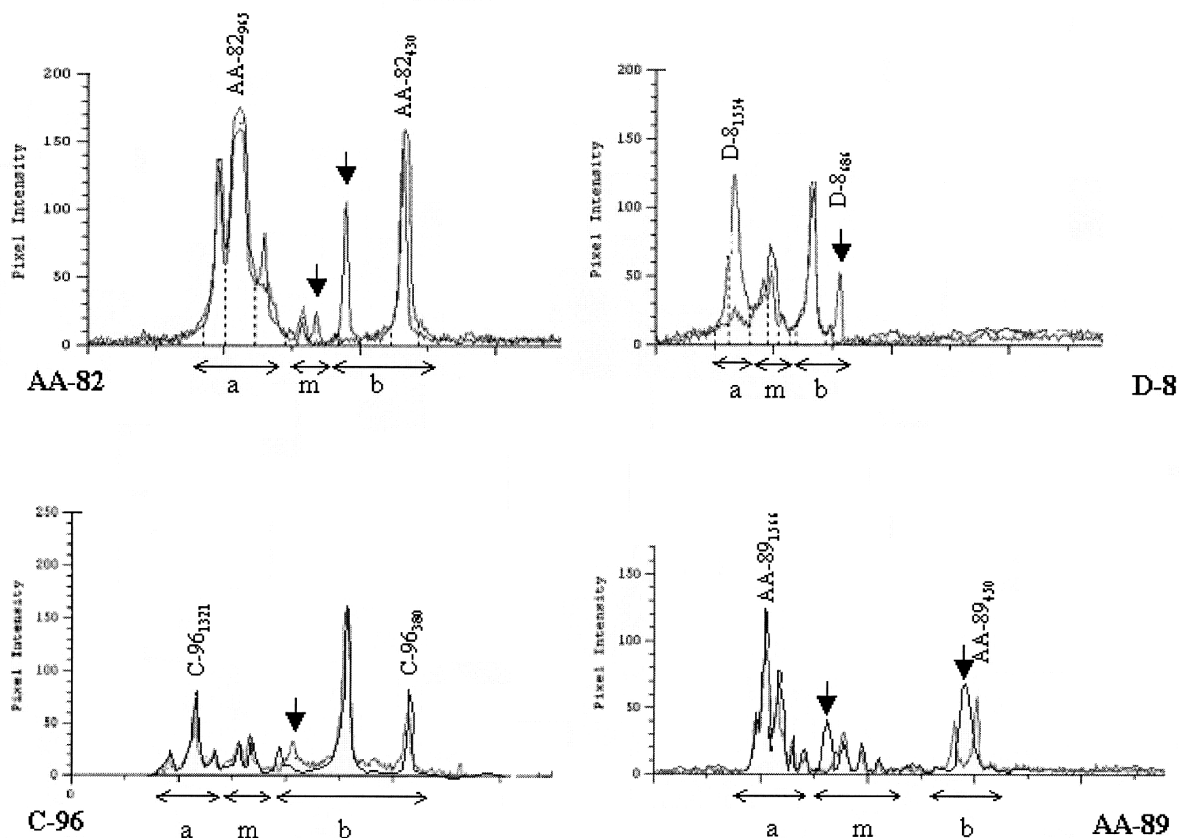


Figura 1. Perfiles de amplificación obtenidos con los cebadores utilizados, detectando todos ellos la presencia de bandas polimórficas (→) en diferentes individuos. Las bandas amplificadas se agruparon en a: alto, m: medio y b: bajo peso molecular.

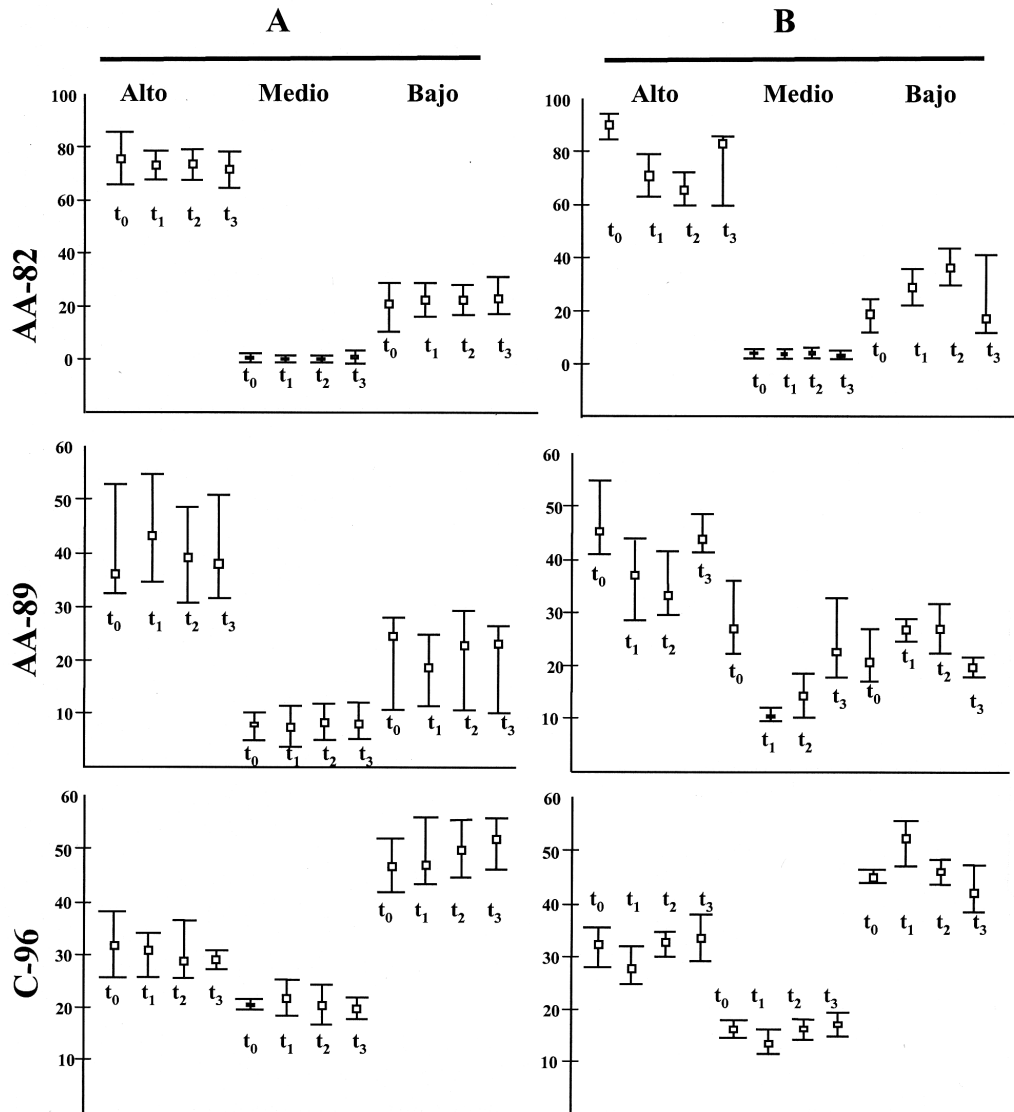


Figura 2. Representación gráfica de los porcentajes de amplificación agrupados en alto, medio y bajo peso molecular para cada cebador. En los individuos tratados (B) se observa una pérdida de amplificación en las bandas de alto peso molecular en los diferentes tiempos (t_0 , t_1 , t_2 y t_3) en función de las bandas de bajo peso molecular. Los individuos no tratados (A) no muestran alteraciones significativas en ninguno de los tiempos ni cebadores utilizados.

dos que aquellos que amplifican pocas bandas o están desigualmente distribuidas, por ejemplo el D-8 (Fig. 1).

En general, las bandas de bajo peso molecular presentan en los individuos tratados niveles mas altos de amplificación en detrimento de las bandas de alto peso molecular, confirmando los resultados previamente obtenidos en los estudios *in vitro* (Fig. 2).

Los metabolitos formados a partir del B(a)P son capaces de formar aductos con la molécula de ADN (19, 20). Estos posteriormente, no solo pueden inducir cambios estructurales y roturas en el ADN, sino que pueden bloquear la actividad de los sistemas enzimáticos de reparación y/o provocar errores en su replicación (21).

Es de esperar que los fragmentos de mayor peso molecular se vean mas fácilmente afectados por la acción del genotóxico que los de bajo peso molecular y, considerando que la capacidad de

amplificación se mantiene constante, las bandas de bajo peso molecular presentan al final de la reacción un mayor intensidad.

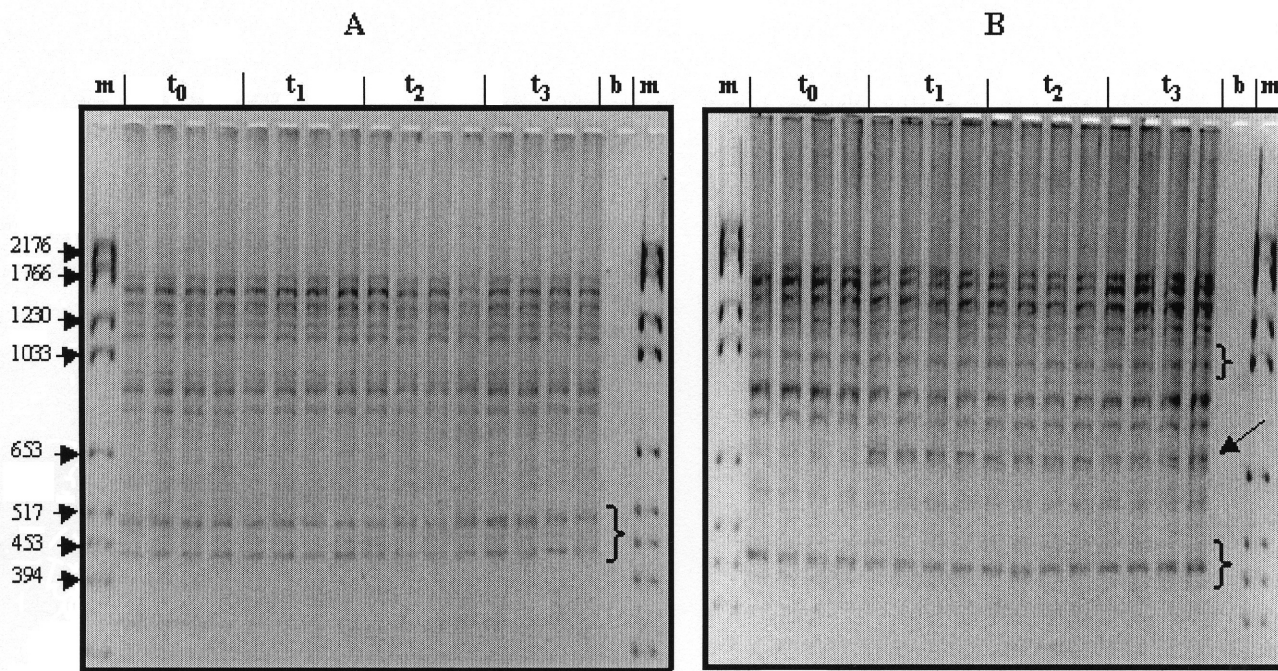
En el análisis cualitativo el patrón de bandas de los individuos no tratados permaneció constante a lo largo del período de estudio. Sin embargo, en la mitad de los individuos expuestos apareció una nueva banda (AA-89₆₃₁) a partir de t_1 (T5) o t_2 , (T8) que permaneció hasta el final del estudio, confirmando de nuevo los resultados observados *in vitro* tanto en las exposiciones agudas como en las exposiciones a largo plazo. En todos los casos la frecuencia de aparición de dicha banda fue del 100% (Fig. 3). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en las exposiciones *in vitro*, no se detectó la desaparición de bandas (15).

La aparición de una misma banda (AA-89₆₃₁) en la mitad de los individuos tratados, sugiere la presencia de puntos calientes en

Tabla 1. Análisis cuantitativo: prueba de Friedman para el análisis de varianzas del porcentaje de amplificación de bandas amplificadas con los cebadores AA-82, C-96 y D-8, en los periodos de muestreo (t_0, t_1, t_2, t_3) para cada uno de los individuos tratados (B) y no tratados (A).

	A				B			
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
C-96 ₁₇₁₄	*	*	*	*	b	c	b	b
D-8 ₁₅₅₄	*	*	*	*	*	c	c	a
C-96 ₁₃₂₁	*	*	*	*	b	b	c	b
D-8 ₁₁₇₂	*	*	*	*	c	a	c	*
D-8 ₁₁₁₂	*	*	*	*	*	b	c	*
C-96 ₁₀₉₉	*	*	*	*	b	*	--	*
AA-82 ₁₀₇₅	*	*	*	*	b	*	b	a
AA-82 ₉₆₅	*	*	*	*	c	*	c	a
C-96 ₉₆₄	--	--	--	--	*	a	--	a
C-96 ₈₅₆	*	*	*	*	*	c	*	*
AA-82 ₈₄₀	*	*	*	*	*	*	*	*
D-8 ₈₂₆	*	*	*	*	c	b	*	*
AA-82 ₇₀₀	*	*	*	*	*	*	a	a
D-8 ₆₈₆	--	--	*	*	--	--	--	--
C-96 ₆₄₂	*	*	*	*	c	a	*	*
AA-82 ₆₄₀	--	--	--	--	--	*	--	*
C-96 ₅₉₈	*	*	*	*	*	--	*	--
AA-82 ₅₇₀	--	*	*	*	a	a	b	a
C-96 ₄₈₇	*	*	*	*	c	a	c	a
AA-82 ₄₃₀	*	*	*	*	b	b	--	b
C-96 ₃₈₀	*	*	*	*	c	c	c	a

Diferencias no significativas frente al control: *
 Diferencias significativas frente al control: a = $p < 0,05$; b = $p < 0,005$; c = $p < 0,001$.
 -- Polimorfismo con ausencia de banda.
 Numero de replicados: 8.



m: marcador de peso molecular en pares de bases. **b:** blanco

Figura 3. Patrón de bandas del cebador AA-89 obtenido a partir de uno de los individuos tratados (B) y no tratados (A) con B(a)P. En el tratado se observa la aparición de una nueva banda (→) a partir de t_1 en el 100% de las amplificaciones hasta el final del periodo estudiado. En ellos se muestra la aparición de bandas polimórficas (}).

Tabla 2. Análisis cuantitativo comparando (a) los porcentajes de amplificación individualizados de cada una de las bandas y (b) agrupadas según sus pesos moleculares antes y después de la exposición a B(a)P en los diferentes tiempos de análisis.

(a)

Bandas	t ₀ -t ₁				t ₀ -t ₂				t ₀ -t ₃			
	T5	T6	T7	T8	T5	T6	T7	T8	T5	T6	T7	T8
C-96 ₁₇₁₄	b	*	b	b	a	*	b	b	*	*	*	*
D-8 ₁₅₅₄	*	*	a	*	*	c	b	b	*	*	*	*
C-96 ₁₃₂₁	*	b	c	a	*	c	b	*	*	*	*	*
D-8 ₁₁₇₂	b	*	*	*	c	*	*	*	b	*	*	*
D-8 ₁₁₁₂	*	a	*	*	b	a	*	*	*	*	*	*
C-96 ₁₀₉₉	*	a	--	*	*	a	--	*	*	*	--	*
AA-82 ₁₀₇₅	b	*	*	*	b	*	*	*	*	*	*	*
AA-82 ₉₆₅	c	*	c	*	c	a	a	b	b	*	*	*
C-96 ₉₆₄	*	a	--	*	*	b	--	b	*	a	--	b
C-96 ₈₅₆	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AA-82 ₈₄₀	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
D-8 ₈₂₆	c	*	*	*	c	*	*	*	a	*	*	*
AA-82 ₇₀₀	*	*	*	b	*	*	a	a	*	*	*	*
D-8 ₆₈₆	--	*	--	*	--	a	--	b	--	*	--	*
C-96 ₆₄₂	b	*	*	*	c	*	a	*	a	*	*	*
AA-82 ₆₄₀	--	*	--	*	--	*	--	*	--	*	--	*
C-96 ₅₉₈	*	--	*	--	*	--	*	--	--	*	*	--
AA-82 ₅₇₀	*	*	*	*	c	a	*	b	a	*	*	*
C-96 ₄₈₇	*	b	b	a	c	a	a	a	b	*	*	*
AA-82 ₄₃₀	c	*	b	*	c	b	a	b	*	b	*	*
C-96 ₃₈₀	c	*	a	b	a	*	c	a	*	*	*	*

(b)

Bandas	t ₀ -t ₁				t ₀ -t ₂				t ₀ -t ₃			
	T5	T6	T7	T8	T5	T6	T7	T8	T5	T6	T7	T8
AA-82												
Alto _{pm}	c	b	c	c	c	b	c	c	*	*	c	*
Medio _{pm}	*	*	*	b	b	b	a	a	*	*	*	*
Bajo _{pm}	b	a	c	c	c	b	b	c	*	*	b	*
C-96												
Alto _{pm}	b	b	b	*	*	*	b	*	*	*	*	*
Medio _{pm}	*	*	*	*	a	*	*	*	*	*	*	*
Bajo _{pm}	c	a	b	*	*	*	*	*	*	*	*	*
D-8												
Alto _{pm}	*	*	a	*	*	*	b	b	*	*	*	*
Medio _{pm}	c	a	*	*	b	a	c	b	*	*	*	*
Bajo _{pm}	c	*	*	*	c	a	b	b	a	*	*	*
AA-89												
Alto _{pm}	c	b	c	c	c	b	c	c	*	*	c	*
Medio _{pm}	*	*	a	*	*	c	a	*	*	*	b	*
Bajo _{pm}	b	a	c	c	c	b	b	c	*	*	b	*

Diferencias no significativas frente al control: *. Diferencias significativas frente al control a = $p < 0,05$; b = $p < 0,005$; c = $p < 0,001$.
 t₀ = antes de la exposición, t₁, t₂ y t₃ : 1, 2 y 3 meses después de la exposición. -- Polimorfismo con ausencia de banda. Numero de replicados: 8.

el genoma a la acción genotóxica del B(a)P y justificaría que a los diferentes períodos de tiempo estudiados, dicha banda permanezca constante.

La existencia de cambios o mutaciones en la secuencia genómica ya se han observado, utilizando esta misma metodología, en estudios de poblaciones de peces y mamíferos sometidos a otros contaminantes. (18, 22, 23, 24). Los resultados preliminares obtenidos, tanto *in vivo* en este estudio, como *in vitro* en estudios previos, son indicadores de la manifestación de alteraciones producidas en el material genético de organismos expuestos a

B(a)P. De esta manera se demuestra la capacidad de la línea celular RTG-2 para predecir los efectos genotóxicos que se observarían en los individuos expuestos *in vivo*.

Sin embargo, como ya se ha comentado, la presencia de bandas polimórficas consecuencia de la variabilidad genética de los individuos, hace que la aplicación de la técnica de RAPD a los estudios *in vivo* requiera el análisis de muestras de gran tamaño que minimice la presencia de dichas bandas y permita transferir los resultados a escala poblacional.

Bibliografía

1. Bickham, J.W., Sandhu, S.S., Hebert, P. Chikhi, L. and Anthwal, R. (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mut. Res.* 463, 33-51
2. Shugart L.R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9, 329-340.
3. Weinstein, I. B. (1988). The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.* 48, 4135 – 4143.
4. Castaño, A., Cantarino, M.J., Castillo, P. and Tarazona, J.V. (1996). Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and *in vitro* LC50 rainbow trout assay. *Chemosphere* 32, 2141-2157
5. Segner, H., 1998. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. In: T. Braunbeck, D.E. Hinton and B. Streit. (Eds) Fish Ecotoxicology. Birkäuser Verlag Basel/Switzerland, pp 1-38.
6. Kocan, R.M., Landolt, M.L. and Sabo K.M. (1982) Anaphase aberrations: a measure of genotoxicity in mutagen-treated fish cells. *Environ. Mutagen.* 4, 181-189.
7. Babich, H. and Borenfreund, E. (1995). Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicol. in Vitro* 5, 91-100
8. Braunbeck, T., Neumüller, D. (1996) The COMET assay in permanent and primary fish cell cultures - a novel system to detect genotoxicity. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 32, 61A.
9. Sánchez, P. Llorente M. T., and Castaño A. (2000). Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: Mitomicyn C, Vincristine sulfate and Benzo(a)Pyrene. *Mut. Res.* 465, 113-122
10. Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S. and Vrzoc M. (1996) Alkaline Single Cell Gel (Comet Assay) and Genotoxicity Monitoring Using Bullheads and Carp. *Environ. Mol. Mutat.*, 26, 345-356.
11. Caetano-Anolles G., Bassam, B.J. and Gresshoff P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9, 553-557
12. Williams, J., Kuberlik, A., Livak, K., Rafalski, J. and Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535
13. Ferrero, M., Castaño, A., Gonzalez, A., Sanz, F. and Becerril, C. (1998). Characterization of RTG-2 fish cell line by random amplified polymorphic ADN. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 40, 56-64
14. Becerril, C., Acevedo, H., Ferrero, M., Sanz F. and Castaño, A. (2001). ADN fingerprint comparison of Rainbow trout and RTG-2 cell line using random amplified polymorphic DNA. *Ecotoxicology* 10, 115-124.
15. Becerril C. (2002) Incidencia de los contaminantes ambientales genotóxicos en células de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid
16. Becerril, C., Ferrero, M., Sanz, F. and Castaño, A. (1999). Detection of Mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagénesis* 14, 449-456.
17. Becerril, C., Ferrero, M. and Castaño, A. (2002) Detection by RAPD of genetic alterations *in vitro*: amplification and conservation conditions of DNA extracts. *Toxicology Mechanisms and Methods* 12, 155-167
18. Theodorakis, C.W. and Shugart, L.R. (1997). Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed *in situ* to radionuclides. *Ecotoxicology* 6, 335-354.
19. Shugart, L., McCarthy, J., Jimenez, B. And Daniels, J. (1987). Analysis of adduct formation in the Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*) between Benzo(a)Pyrene and DNA of the liver and haemoglobin of the erythrocyte. *Aquatic Toxicology* 9, 319-325
20. Bigger C.A., Ponten I., Page, J. and Dipple A. (2000) Mutational spectra for polycyclic aromatic hydrocarbons in the *supF* target gene. *Mut. Res.* 450, 75-93
21. Atienzar, F., Cheung, V., Awadhesh N., Jha, A.N. and Depledge M.H. (2001) Fitness parameters and ADN effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* 59, 241-250
22. Theodorakis, C.W., Bickman, J.M., Elbi, T., Shugart, L.R. and Chesser, R.K. (1998). Genetics of radionuclide-contaminated mosquitofish populations and homology between *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 1992-1998
23. Theodorakis, C.W., Bickham J. W. and Lyne Y. B.(2000). Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriam*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada Test Site, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 2, 317-326
24. Krane D.E., Sternberg D. C. and Burton G.A. (1998). Randomly amplified polymorphic DNA profile-based measures of genetic diversity in crayfish correlated with environmental impacts. *Env. Tox. and Chem.* 18, 504-508.

Efecto de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio

Morales Martín AI¹, Vicente-Sánchez¹ C, Santiago Sandoval² JM^a, *Fernández Tagarro² M, López-Novoa¹ JM y Pérez-Barriocanal¹ F

Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. ¹Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca.

²Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario de Salamanca.

Recibido 28 de Julio de 2003 / Aceptado 23 de Enero de 2004

Resumen: El incremento en la producción anual de cadmio ha favorecido que la incidencia de la intoxicación crónica por este elemento haya aumentado en los últimos años. El estrés oxidativo es uno de los mecanismos implicados en la generación del efecto tóxico, manifestándose, entre otras patologías, por una disfunción y lesión renal. La quercetina, un flavonoide muy abundante en la dieta mediterránea, es un potente antioxidante y un buen quelante de metales. Nuestro objetivo fue estudiar si la administración de quercetina pudiera prevenir la aparición de los procesos nefrotóxicos asociados a la exposición crónica al cadmio. Los experimentos se realizaron con ratas Wistar (200g), incluidas en tres grupos experimentales: 1) ratas a las que se administró cadmio (1,2 mg/kg/día, s.c.) cinco veces por semana, durante nueve semanas, 2) ratas a las cuales se les administró quercetina (50 mg/kg/día, i.p.) cinco veces por semana, empezando en la cuarta semana y 3) ratas a las que se administró cadmio y quercetina. La lesión renal se evaluó midiendo proteinuria, microalbuminuria y glucosuria, así como la excreción de enzimas urinarias N-acetil-beta-D-glucosaminidasa, fosfatasa alcalina y gamma-glutamyl-transpeptidasa. Las muestras de plasma se utilizaron para la determinación de creatinina y nitrógeno ureico plasmático, así como dialdehído malónico, como índice de peroxidación lipídica y antioxidantes totales en plasma. En riñón se midió la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y de la glutatión reductasa. Nuestros resultados mostraron que la administración de cadmio durante 9 semanas produjo un incremento en los valores de flujo urinario, proteinuria, microalbuminuria y glucosuria. El tratamiento con cadmio incluso incrementó la creatinina sérica y el nitrógeno uréico plasmático y elevó drásticamente la actividad de enzimas urinarias. Finalmente el aclaramiento de creatinina disminuyó como consecuencia de la disfunción renal. La administración de quercetina con cadmio mostró una clara mejora en la función renal y revirtió dichas alteraciones. La peroxidación lipídica se incrementó en las ratas tratadas con cadmio y este incremento fue revertido por la administración de quercetina. La concentración de antioxidantes totales en plasma, fue más alta en el grupo que recibió cadmio y quercetina. El grupo tratado con cadmio mostró una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa

y la glutatión reductasa en riñón, sin embargo en el grupo al que se administró también quercetina este descenso fue significativamente menor. Este estudio revela que la quercetina tiene un efecto protector frente a la nefrotoxicidad producida por cadmio y que su propiedad antioxidante parece ser la responsable de esta acción protectora.

Palabras clave: cadmio, quercetina, nefrotoxicidad, estrés oxidativo, antioxidantes.

Abstract: Effect of quercetin in cadmium-induced nephrotoxicity. Increased levels of cadmium in the environment have augmented the incidence of chronic cadmium-induced intoxication over the past few years. Oxidative stress is one of the mechanisms involved in cadmium-toxicity which manifests itself as renal injury, leading to renal dysfunction. Quercetin, one of the most abundant flavonoids present in the mediterranean diet, is a strong antioxidant and a good chelator of metals. Our aim was to study whether the administration of quercetin might offer protection against cadmium nephrotoxicity. Experiments were carried out in male Wistar rats weighing approximately 200 g. The study consisted of three experimental groups: 1) rats that received cadmium (1,2 mg/kg body weight, s.c.), 5 times/week, up to week 9; 2) rats that received quercetin (50 mg/kg body weight, i.p.), 5 times/week beginning from week 4; and 3) rats that received both cadmium and quercetin. Renal toxicity was evaluated by measuring proteins, microalbumin and glucose in urine, as well as urinary excretion of the following enzymes: N-acetyl-b-D-glucosaminidase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl-transpeptidase. Plasma concentrations of creatinine and blood urea nitrogen were determined. Malondialdehyde concentration in plasma was used as an index of lipid peroxidation. Total antioxidants found in plasma were also measured. Kidney samples were used to analyze changes in the activity of the antioxidative enzymes, superoxide dismutase and glutathione-reductase. Our results show that the administration of cadmium over a nine-week period induced an increase in urinary flow, as well as in protein, microalbumin and glucose concentration in urine. Treatment with cadmium also increased serum creatinine and blood urea nitrogen, and drastically elevated the presence of enzyme activity in urine. Finally, as a result of functional renal damage, creatinine clearance was reduced. Animals that received both cadmium and quercetin showed a clear improvement in renal function, and all of the measured parameters remained unaltered. Renal lipid peroxidation was increased

Correspondencia: Ana Isabel Morales Martín. Departamento de Fisiología y Farmacología (Toxicología). Edificio Departamental. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca (Spain). Teléfono: 923 294472. Fax: 923 294669. E-mail: amorales@usal.es.

in rats receiving cadmium alone; this increase was prevented by the administration of quercetin. The concentration of antioxidants in plasma was higher in the group that received cadmium and quercetin. Both the superoxide dismutase and glutathione-reductase activity were found to be lower in kidney in the group treated with cadmium and quercetin. This study demonstrates that quercetin has a protective effect on cadmium-induced nephrotoxicity and that its strong antioxidant activity could be the property responsible for this finding.

Key words: cadmium, quercetin, nephrotoxicity, oxidative stress, antioxidant.

Introducción

El cadmio es un elemento no esencial para los sistemas biológicos, que se encuentra presente como contaminante en los alimentos, el agua o el aire. El incremento en la producción anual de este elemento, su presencia en productos tales como fertilizantes, residuos de baterías y pilas eléctricas y en el humo del tabaco, han hecho que los efectos dañinos sobre la población general, expuesta a bajas concentraciones, hayan aumentado [1].

Una vez absorbido por los pulmones o el tracto gastrointestinal, el cadmio es transportado en sangre unido a albúmina y a glóbulos rojos. En el hígado el cadmio induce la síntesis de proteínas de bajo peso molecular ricas en azufre (metalotioneínas) a las que se une formando un complejo (Cd-MT) que es liberado a la circulación sistémica, transportado por la sangre y filtrado a través del glomérulo a la orina primaria. Seguidamente es reabsorbido por las células tubulares proximales [2]. Las lisozimas de estas células tubulares degradan rápidamente el complejo y liberan cadmio libre al citoplasma [3, 4], el cual se une a metalotioneínas generadas por las propias células tubulares [5]. Si la cantidad de cadmio presente es grande, la producción de metalotioneínas es insuficiente y se origina un exceso de cadmio intracelular que afecta a orgánulos celulares [6] y da lugar a procesos tóxicos.

El estrés oxidativo ha sido descrito como uno de los mecanismos implicados en el daño renal inducido por cadmio [7, 8]. El cadmio parece no generar directamente radicales libres en condiciones fisiológicas, sin embargo, éstos pudieran formarse indirectamente por interacción entre Cd^{2+} y lugares celulares críticos, como es la mitocondria [9]. Diversos estudios confirman que la exposición aguda a cadmio incrementó el estrés oxidativo por producción del anión superóxido y óxido nítrico [10, 11, 12], así mismo, induce peroxidación lipídica y excreción de metabolitos lipídicos en orina [13, 14, 15, 16]. Apoyados en estos estudios, pensamos que un tratamiento preventivo consistente en la administración de un antioxidante, podría prevenir la aparición de patologías asociadas al cadmio entre las que se incluyen: disfunción renal, daños pulmonares, lesiones óseas, disfunciones sexuales, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis.

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos naturales se encuentran en los vegetales y en el vino tinto [17]. La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta

[18]. La quercetina, uno de los flavonoides más abundantes en el reino vegetal, es un potente "scavenger" de radicales libres de oxígeno y un buen quelante de metales [19]. Son numerosos los estudios que confirman la importante capacidad antioxidante de la quercetina y por tanto, su utilidad como posible protector en procesos oxidativos.

Así, el objetivo de nuestro trabajo fue en primer lugar reproducir una intoxicación crónica por cadmio en la que se evidenciara una clara lesión renal, en segundo lugar estudiar el efecto de la quercetina en dicha intoxicación y por último ver la implicación del estrés oxidativo en el posible efecto protector de este antioxidante.

Material y Métodos

Grupos experimentales y reactivos

Este trabajo se realizó con ratas Wistar macho de un peso corporal de aproximadamente 200 gramos, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Para la intoxicación crónica por cadmio se utilizó cloruro de cadmio ($CdCl_2$) C-2544 lote 49H369 disuelto en solución salina. La quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$) Q-0125 lote 21K1690 se preparó disolviendo las cantidades adecuadas en agua Milli Q a la cual se adicionaba Tween 80 en una proporción de 10 μ l por cada 100 ml de solución. Ambos productos proceden de Sigma Chemical Co, San Luis, USA. El resto de reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Para todas las determinaciones bioquímicas se utilizó un analizador automático (Roche/Hitachi 917) con Kits comerciales de Randox (Randox Laboratories LTD, United Kingdom), Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y Boehringer Mannheim Biochemica (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany).

En el diseño del estudio se plantearon tres grupos experimentales: Grupo cadmio (Cd) (n:15): ratas a las cuales se les administró cadmio (1,2 mg/kg/día, s.c.) durante nueve semanas (cinco dosis semanales). Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q) (n:15): ratas a las cuales se les administró cadmio (1,2 mg/kg/día, s.c.) durante nueve semanas (cinco dosis semanales) y quercetina (50 mg/kg/día, i.p.) durante cinco semanas (cinco dosis semanales), comenzando la administración a la cuarta semana de iniciado el tratamiento con cadmio. Grupo quercetina (Q) (n:10): ratas a las cuales se les administró quercetina (50 mg/kg/día, i.p.) durante cinco semanas (cinco dosis semanales).

A diferentes tiempos (T0 o basal, T3, a las tres semanas, T6, a las seis semanas y T9, a las nueve semanas), las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales, en las cuales tuvieron libre acceso a la comida y a la bebida. Tras dos días de acostumbramiento a su nuevo entorno, se recogió orina de 24 horas y muestras de sangre del extremo de la cola (unos 150 μ l) en capilares heparinizados que se centrifugaron para obtener plasma. Al final del experimento las ratas se anestesiaron y posteriormente fueron perfundidas con solución salina heparinizada a 37 °C; se tomaron muestras de riñón y se almacenaron a -80 °C para su posterior utilización en los estudios de estrés oxidativo.

Estudios de función renal

Para valorar la función renal se llevaron a cabo: aclaramientos de creatinina [20], nitrógeno uréico plasmático (BUN) [21], determinaciones bioquímicas en orina: glucosa [22], proteínas [23] y microalbuminuria [24], determinaciones de actividades enzimáticas marcadoras de lesión renal: N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) [25], fosfatasa alcalina (FA) [26] y gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT) [27].

Estudios de estrés oxidativo

El efecto de la quercetina en el proceso de estrés oxidativo generado por el cadmio se evaluó mediante la determinación de biomarcadores: antioxidantes totales (AT) [28] y dialdehído malónico (MDA) [29] en plasma y superóxido dismutasa (SOD) [30] y glutatión reductasa (GR) [31] en riñón.

Estadística

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos se analizaron mediante su exportación a la aplicación estadística *Number Cruncher Statistical System*, versión 6.0.10 para Windows®. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza de una entrada. A continuación se aplicó del test de *Scheffé* cuando los datos presentaban una distribución normal. Consideramos significativo un valor de *p* menor que 0.005 o 0.001. Los datos se expresan como medias ± error estándar de la media (EEM).

Resultados

Estudio de la nefrotoxicidad producida por cadmio

En este apartado analizamos la evolución de diversos parámetros fisiológicos de las ratas a las que se les administró únicamente cadmio. Estas ratas no aumentaron su peso al ritmo de los animales controles durante el tratamiento. Al finalizar el mismo, el peso corporal era un 19% menor respecto al grupo control (grupo al que se administró quercetina solamente) (tabla 1). El aclaramiento de creatinina disminuyó significativamente después de nueve semanas de tratamiento. También observamos que los valores de nitrógeno uréico plasmático se duplicaron al final del experimento frente a su valor basal. El flujo urinario se vio incrementado, siendo 2.3 veces superior que su valor basal. En la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular se

observó un fuerte incremento al final del estudio (12 veces más). La excreción urinaria de albúmina después de 9 semanas de tratamiento fue 12 veces mayor que su valor basal. Paralelo al incremento de proteínas en orina hubo un aumento de la excreción urinaria de glucosa (glucosuria), siendo éste 3 veces mayor que su valor basal (Tabla 1).

En la figura 1 se refleja la evolución que siguieron las distintas enzimas marcadoras de lesión renal. Los resultados obtenidos en este grupo muestran a las nueve semanas de tratamiento con cadmio un incremento de 10 veces para la NAG (Fig. 1A), de 8 veces para la FA (Fig. 1B) y de 20 veces para la GGT (Fig. 1C), con respecto a sus valores basales.

Efecto de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio

En este grupo, Cd-Q, el incremento de peso fue un 25% menor comparado con el grupo Q (Tabla 1). El aclaramiento de creatinina disminuyó significativamente, respecto a su valor basal al final del experimento (1.7 veces), pero en menor proporción que en el grupo Cd (2.0 veces). Los valores de nitrógeno uréico en plasma en este grupo fueron significativamente menores que los del grupo Cd al final del estudio (48.78 mg/dl en el grupo Cd frente a 27.50 mg/dl en el grupo Cd-Q). El valor de flujo urinario en el grupo Cd-Q a las nueve semanas no tuvo diferencias significativas con su valor basal, por otra parte, si comparamos este grupo con el grupo Cd, observamos que hubo un menor incremento de flujo urinario al final del experimento (1.5 veces menos). Respecto a la excreción urinaria de proteínas, en este grupo aumentaron significativamente frente a su valor basal, pero este incremento fue menor que el del grupo Cd (1.7 veces menos). Los niveles de microalbuminuria en el grupo Cd-Q fueron mayores al final del estudio respecto al basal (8.2 veces), pero este incremento fue menor que en el grupo del Cd (1.8 veces). En el grupo Cd-Q, los valores de glucosuria al final del estudio fueron 2.0 veces menores que los del grupo Cd (tabla 1).

En cuanto a la evolución de las enzimas marcadoras de lesión renal en este grupo, observamos que están elevadas respecto a sus valores basales, sin embargo, los incrementos son menores que los descritos en el grupo Cd. Aquí la NAG aumentó 5 veces frente a las 10 veces en el grupo Cd (Fig.1A). La FA aumentó

Tabla 1: Resultados obtenidos de peso corporal, flujo urinario (FU), aclaramiento de creatinina (CL_{creat}), nitrógeno uréico plasmático (BUN), glucosuria, proteinuria y microalbuminuria de los 3 grupos experimentales durante el periodo de estudio. T_0 : tiempo basal, T_9 : tiempo al final del estudio (9 semanas). Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias ± EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo; * vs Cd en el mismo tiempo.

	Cd		Cd-Q		Q	
	T_0	T_9	T_0	T_9	T_0	T_9
Peso (g)	199.75 ± 3.88	395.33 ± 8.67 [#]	209.25 ± 3.09	365.5 ± 11.25 [#]	209.29 ± 3.09	489.00 ± 5.52 ⁺
FU (ml/día/100g peso)	4.55 ± 0.46	10.64 ± 1.85 [#]	3.46 ± 0.34	7.23 ± 1.24	4.69 ± 0.31	3.46 ± 0.40
CL_{creat} (ml/min/100g)	0.43 ± 0.03	0.21 ± 0.03 ⁺	0.39 ± 0.03	0.23 ± 0.01 ⁺	0.41 ± 0.04	0.29 ± 0.01
BUN (mg/dl)	25.31 ± 0.64	48.78 ± 1.53 [#]	25.50 ± 0.73	27.50 ± 1.31 [*]	25.00 ± 1.29	29.25 ± 0.75
Glucosuria (mg/día)	1.46 ± 0.28	4.53 ± 0.62 ⁺	1.16 ± 0.27	2.31 ± 0.57	1.85 ± 0.26	2.32 ± 0.38
Proteinuria (mg/día)	3.85 ± 0.38	48.70 ± 3.65 [#]	4.12 ± 0.85	28.61 ± 3.11 ⁺⁺	5.15 ± 1.03	22.73 ± 0.75
Microalbuminuria (mg/día)	25.84 ± 3.89	311.00 ± 4.56 [#]	21.61 ± 2.25	176.27 ± 6.24 ⁺⁺	22.70 ± 1.46	25.87 ± 2.75

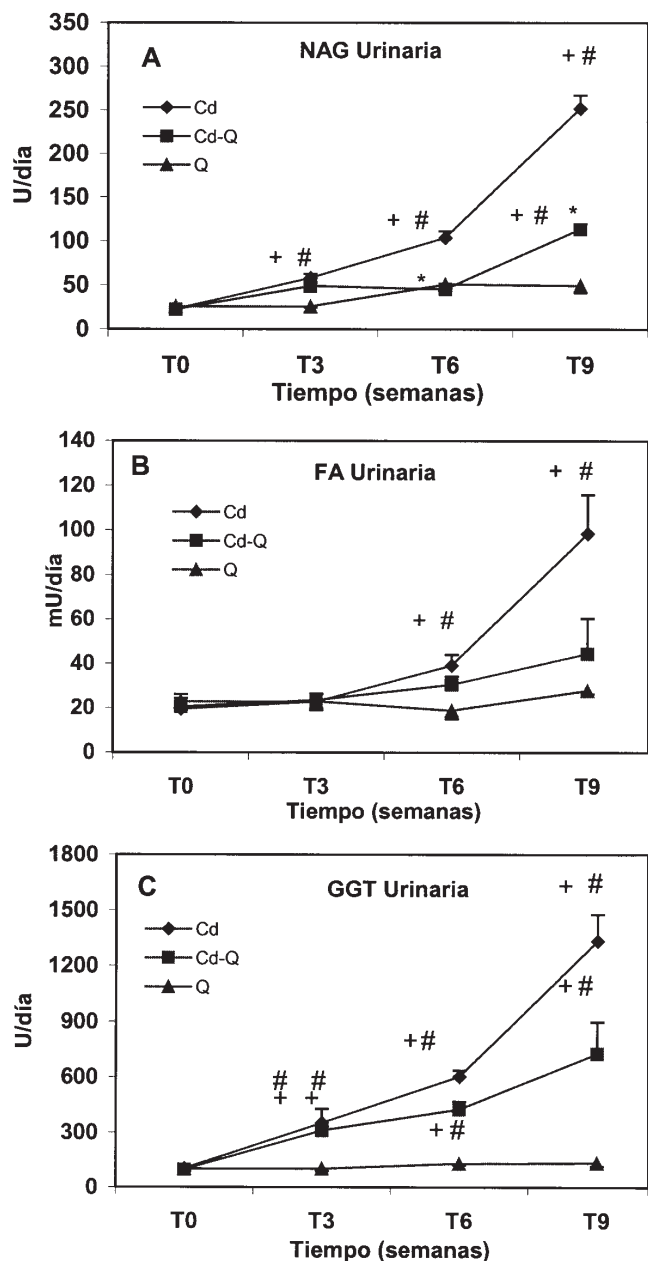


Fig. 1: Evolución de la actividad en orina de la NAG (A), FA (B) y GGT (C) en los 3 grupos durante el periodo de estudio. Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo, * vs Cd en el mismo tiempo.

3.5 veces frente a las 8 veces en el grupo del Cd (Fig.1B) y la GGT aumentó 5 veces frente a las 20 veces del grupo del Cd (Fig. 1C).

Estudios de estrés oxidativo

La figura 2A muestra los valores de MDA en plasma. En el grupo Cd, el MDA aumentó a lo largo del estudio alcanzando valores 3.4 veces superiores a los basales. En el grupo Cd-Q los

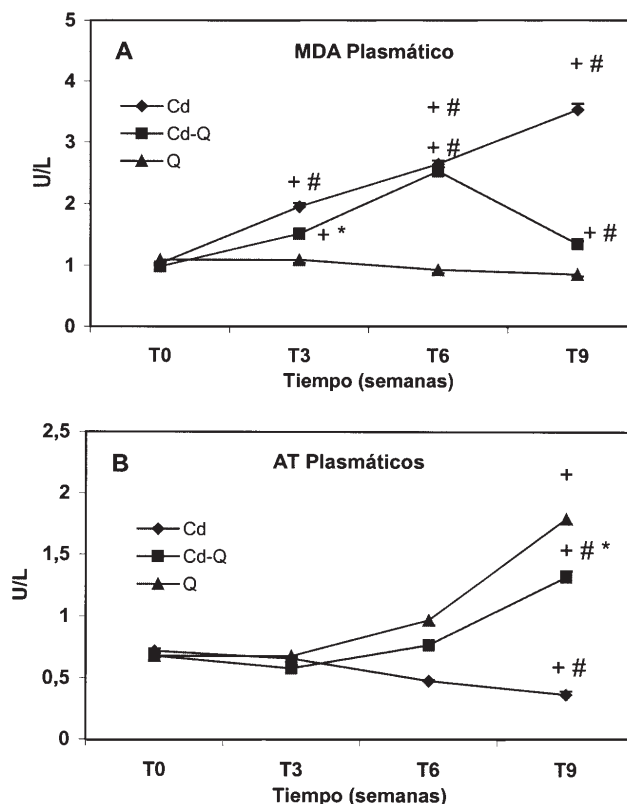


Fig. 2: Evolución de los niveles plasmáticos de MDA (A) y de los AT (B) de los 3 grupos durante el periodo de estudio. Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo; * vs Cd en el mismo tiempo.

valores de MDA son similares a los del grupo Cd hasta la sexta semana del estudio (2 semanas de administración de quercetina), pero a partir de este tiempo hay un espectacular descenso de los valores de MDA llegando a ser al final (5 semanas de administración de quercetina) similares a los basales y 2.5 veces inferiores frente al grupo del cadmio solo. En el grupo Q los valores de MDA fueron similares durante todo el estudio.

Cuando cuantificamos los AT en plasma (Fig. 2B) obtuvimos resultados coherentes con los obtenidos en MDA plasmático (Fig.2A). En el grupo Cd los AT fueron disminuyendo durante todo el estudio, siendo esta disminución significativa a partir de la sexta semana de haber iniciado el tratamiento. Al final de éste, los resultados fueron la mitad de los basales. En el grupo Q ocurrió todo lo contrario, los valores de AT fueron aumentando durante el tratamiento con quercetina siendo 3 y 5 veces superiores frente a los basales y al grupo Cd, respectivamente. En el grupo Cd-Q los valores de AT al principio del estudio (4 semanas) siguieron la misma evolución que los del grupo Cd, hasta que se le administró la quercetina, a partir de ese momento los AT fueron aumentando hasta el final del estudio, siendo 2 y 3.5 veces superiores frente a su valor basal y al grupo Cd, respectivamente.

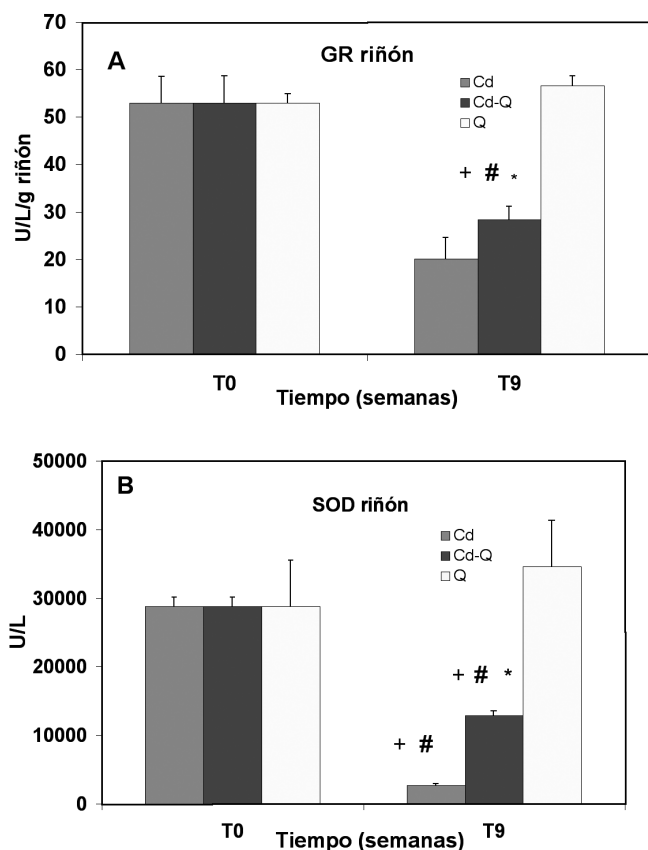


Fig. 3: Valores de GR (A) y de SOD en riñón (B). Basales (T0) y al final del estudio (T9) en los 3 grupos durante el periodo de estudio. Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias ± EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo; * vs Cd en el mismo tiempo.

La GR (Fig.3A) y la SOD (Fig.3B) en riñón, en el grupo de Cd, disminuyeron 2.5 y 10 veces respectivamente frente al grupo control (grupo de quercetina sola). En el grupo Cd-Q estas enzimas también disminuyeron respecto al grupo control, pero esta disminución fue significativamente menor frente al grupo Cd.

Discusión

El riñón es el órgano principalmente afectado en la toxicidad producida por cadmio [32, 33]. Esta nefrotoxicidad se piensa que es causada por el complejo CdMT, el cual procede del hígado y se acumula en el riñón produciendo necrosis en las células del túbulo proximal [2, 4, 34, 35].

El modelo elegido para nuestro estudio, administración de cadmio durante nueve semanas, indujo un claro deterioro de la función renal. El tratamiento con cadmio, a la novena semana duplicó los valores del flujo urinario y del nitrógeno uréico en plasma, y disminuyó a la mitad los del aclaramiento de creatinina endógena respecto a los niveles basales. Estas alteraciones pueden deberse al efecto tóxico que produce el cadmio sobre los

segmentos S₁ y S₂ de los túbulos renales, afectando a las células del túbulo proximal, donde se reabsorbe este metal [35]; así, el incremento en el flujo urinario se justificaría por la alteración en los procesos de reabsorción. Por su parte la glucosa, es reabsorbida en esta porción del túbulo proximal, con lo que un daño a este nivel, explicaría el exceso de glucosa en orina que aparece al final del estudio.

Tanto la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular, como de albúmina sufrieron un aumento significativo al final del tratamiento con cadmio (12 veces más). Nuestros resultados, son similares a los encontrados por Elinder y cols. [36] y por Roels y cols. [37, 38] en los que observan como primer signo de daño renal un incremento de las proteínas séricas de bajo peso molecular en la orina. Este hecho es debido a una alteración en la reabsorción tubular, como consecuencia del daño producido por el cadmio sobre las células del túbulo proximal. Posteriormente observan que hay un aumento en la eliminación de proteínas de alto peso molecular (albúmina) como consecuencia de una mayor permeabilidad del glomérulo, resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio. Esto indica que además de haber daño tubular también existe daño glomerular. Estos hechos han sido contrastados también en estudios epidemiológicos [39], observando que trabajadores con excesiva exposición a cadmio tenían en orina proteínas de bajo peso molecular, tales como RBP, lisozima, ribonucleasa, además de proteínas de alto peso molecular, como albúmina y transferrina, indicando esto que tenían una proteinuria mixta.

Cuando analizamos los marcadores de lesión renal en el grupo al que se administró cadmio, observamos que las actividades de las enzimas se van incrementando ligeramente a partir de la tercera semana, pero este incremento es más pronunciado desde la sexta semana hasta el final del tratamiento. La NAG es una enzima lisosomal, utilizada como biomarcador de nefrotoxicidad [40, 41], y su aumento en orina refleja daño tubular renal [41]. La excreción urinaria inicial de NAG, tras la administración de cadmio, parece estar relacionada con un aumento en la exocitosis lisosomal, mientras que aumentos posteriores pueden deberse a necrosis de las células del túbulo proximal [42]. La FA es una enzima asociada al borde en cepillo, y su mayor excreción urinaria indica necrosis de las células tubulares renales [43]. La GGT es una enzima determinante de la desestructuración del cepillo del epitelio tubular y es útil para determinar necrosis tubular [44, 45]. Todos los valores de las enzimas en orina nos indican que ha habido necrosis de las células tubulares y, por consiguiente daño renal. En los estudios de Liu y Zahir [46, 47] también se describe un incremento en la actividad de estas enzimas en orina a las cinco o seis semanas después de iniciar su estudio con cadmio.

El mecanismo por el cual se produce el daño tóxico parece estar relacionado con el estrés oxidativo. Diversos estudios han observado como el cadmio disminuye los niveles tisulares de GSH, potente antioxidante endógeno [48], induce peroxidación lipídica y excreción de metabolitos lipídicos en orina [13, 14, 15] y además, produce daño en todo el riñón, incluyendo necrosis tubular proximal, degeneración de las células tubulares, proliferación e inflamación glomerular, fibrosis cortical y nefritis

intersticial y apoptosis [46]. Estos resultados explicarían el incremento en los marcadores de lesión renal, NAG, FA y GGT.

En nuestro estudio cuantificamos MDA, como producto de peroxidación lipídica, observando que estaba muy elevado en plasma, lo que nos indica que hubo un aumento en la formación de radicales libres de oxígeno. Además, los AT plasmáticos estaban disminuidos a la mitad en este grupo. La disminución de antioxidantes endógenos (ac. Ascórbico, proteínas con tioles, Bilirrubina, ac. Úrico, α -Tocoferol, Ceruloplasmina, Transferrina, Cisteína, GSH, Carotenos, ac. Lipóico, Ubiquinona) pudiera deberse al gasto de los mismos para contrarrestar los radicales libres de oxígeno. La SOD y la GR son dos enzimas endógenas que catalizan la eliminación de radicales libres. Nuestros resultados muestran que en el grupo Cd, estas enzimas estaban muy disminuidas; esto es debido, posiblemente, a que el tratamiento crónico con cadmio aumenta el estrés oxidativo, haciendo que haya un desgaste en la actividad enzimática de las mismas.

El segundo objetivo fue estudiar el efecto de la quercetina en la intoxicación crónica por cadmio. La quercetina es uno de los flavonoides más abundante de la dieta humana, que se ha descrito como un potente "scavenger" de radicales libres de oxígeno y un buen quelante de metales [19]. Además, la quercetina, tiene un efecto citoprotector mediado por la disminución de NO [49, 50], preserva del daño tubular y de la inflamación intersticial [51], también parece prevenir la peroxidación lipídica en la obstrucción biliar y disminuye la deposición de colágeno y la fibrogénesis [52]. La dosis administrada de quercetina fue de 50 mg/kg/día, ya que ha sido la más utilizada en estudios de este flavonoide anteriores a los nuestros [53]. La vía de administración elegida fue la intraperitoneal ya que la absorción por vía oral no es completa [53, 54]. Se empezó a administrar a la cuarta semana de haber iniciado el tratamiento con cadmio, debido a que el daño renal aparece a la quinta o sexta semana de su administración.

Los resultados obtenidos en el grupo al que se administró cadmio y quercetina indican que, después de iniciado un proceso tóxico con cadmio, la administración de quercetina redujo claramente el daño renal producido por este elemento. Se observó un menor incremento en marcadores de función renal como el flujo urinario y el nitrógeno uréico en plasma, respecto al grupo Cd. En el caso de las enzimas marcadoras de lesión renal (NAG, GGT, FA) también se obtuvieron valores inferiores en el grupo Cd-Q frente a los del grupo Cd, igual que la glucosuria, la proteinuria y la microalbuminuria.

Los mecanismos por los cuales la quercetina reduce la nefrotoxicidad producida por el cadmio no están muy claros, ya que son diversas sus propiedades biológicas. Uno de estos mecanismos podría estar relacionado con sus propiedades antiinflamatorias y relajantes vasculares, a través del metabolismo del ácido araquidónico. Los productos finales de la cascada del ácido araquidónico pueden ser considerados como agentes homeostáticos implicados en el mantenimiento de la integridad de los procesos inflamatorios del sistema cardiovascular y del sistema renal. Un desequilibrio en la síntesis de prostaglandinas puede provocar alteraciones cardiovasculares y renales. Los flavonoides han mostrado que son inhibidores de la síntesis de eicosanoides por

inhibir las actividades de la lipooxigenasa [55] y de la ciclooxigenasa [56]. Este efecto supondría la inhibición de mediadores vasoconstrictores (prostaglandinas vasoconstrictoras, tromboxanos,...) implicados en el daño renal producido por vasoconstricción. Estos mecanismos, además están estrechamente relacionados con la actividad más importante de la quercetina que es la antioxidante e inhibidora de la peroxidación lipídica [57, 58, 59, 60].

Nuestro estudio pone de manifiesto que la quercetina es un potente antioxidante, capaz de revertir el incremento de peroxidación lipídica producido por cadmio a sus valores basales, además de aumentar altamente los antioxidantes plasmáticos endógenos, protegiendo a las células de este proceso dañino que cursa con necrosis y apoptosis celular. Además, la quercetina protege del daño renal, ya que hay una disminución en la orina de los marcadores de daño renal (NAG, GGT, FA), y una mejora de la función renal.

Son diversos los estudios que han empleado antioxidantes para proteger del daño renal inducido por cadmio. La co-administración de cadmio y N-acetil-cisteína (NAC), disminuyó la actividad de enzimas marcadoras de daño hepático, como la alanina-amino-transferasa y de lesión renal, como la lactato deshidrogenasa. Esta protección parece ser debida a una inhibición de la peroxidación lipídica que se midió como disminución de MDA [47]. Por otra parte, la NAC es donadora del aminoácido cisteína y facilita la síntesis de GSH, siendo el GSH, como hemos apuntado antes, antioxidante y posible acomplejante del cadmio [61].

Otro antioxidante, la vitamina E, también fue empleado para ver su efecto sobre el estrés oxidativo generado por cadmio, resultando ser efectiva para prevenir la toxicidad hepática y renal, posiblemente por una disminución de la peroxidación lipídica [47], además la vitamina E ha demostrado actuar como un "scavenger" de radicales libres [62, 63, 64]. Otro de los mecanismos posibles para esta acción protectora está relacionado con su capacidad para estabilizar y proteger a la membrana celular, debido a la interacción entre el α -tocoferol con los ácidos grasos insaturados de fosfolípidos [65, 66]. En este sentido, la vitamina E podría proteger las alteraciones producidas por el complejo Cd-MT en los lípidos de la membrana de las células del borde en cepillo [67].

Los efectos de la administración de Selenio apoyan también el papel del estrés oxidativo en la toxicidad inducida por cadmio. Este metal, esencial para el mecanismo detoxificante de la formación del radical superóxido, ha demostrado tener un efecto protector en este tipo de intoxicación [68].

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la administración subcutánea de CdCl₂ a la dosis de 1.2 mg/kg/día durante nueve semanas es un buen modelo experimental para reproducir una intoxicación crónica por cadmio. También observamos que el flavonoide quercetina a la dosis de 50 mg/kg/día durante cinco semanas ejerce un efecto protector sobre las lesiones y funcionalidad renal que aparecen en nuestro modelo experimental. Por último, la acción antioxidante de la quercetina parece ser la responsable del efecto protector ejercido por la misma, confirmando que el estrés oxidativo juega un importan-

te papel como mecanismo tóxico en la generación del daño renal producido por cadmio.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con cargos al proyecto VIN02-019.

Bibliografía

- Elinder CG (1992) Cadmium as an environmental hazard. *IARC Sci Publ* 118: 123-132.
- Foulkes C (1978) Apparent competition between myoglobin and metallothionein for renal reabsorption. *Proc Soc Exp Biol Med* 159(3): 321-323.
- Cain K, Holt DE (1983) Studies of cadmium-thionein induced nephropathy: time course of cadmium-thionein uptake and degradation. *Chem Biol Interact* 43(2): 223-237.
- Klaassen CD, Choudhuri S, McKim JM, Jr, Lehman-McKeeman LD, Kershaw WC (1994) In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environ Health Perspect* 102(3): 141-146.
- Cherian MG, Goyer RA, Delaquerriere-Richardson L (1976) Cadmium metallothionein induced nephropathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 38: 399-408.
- Chavez E, Briones R, Michel B, Bravoc B, Jay D (1985) Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: Studies with cadmium. *Arch Biochem Biophys* 242: 493-497.
- Shaikh ZA, Vu T, Zaman K (1999) Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium hepatotoxicity and nephrotoxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 256-263.
- Brennan RJ (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat Res* 356(2):171-178.
- Ochi T (1987) Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutat Res* 180(2): 257-266.
- Hassoun EA, Stohs SJ (1996) Cadmium induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Rev Toxicol* 112: 219-226.
- Koizumi T, Li Z (1992) Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health* 37 (1): 25-36.
- Koizumi T, Shirakura G, Kumagai H, Tatsumoto H, Suzuki KT (1996) Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. *Rev Toxicol* 14 (2): 125-134.
- Manca D (1991) Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Rev Toxicol* 67 (3): 303-323.
- Sarkar S, Yadav P, Trivedi R, Bansal AK, Bhatnagar D (1995) Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol* 9 (3): 144-149.
- Bagchi D (1996) Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol Trace Elem Res* 52 (2): 143-154.
- Senturk UK (1994) Cadmium induced lipid peroxidation in kidney function. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 5 (3-4): 305-313.
- Goldberg DM, Hanh SE, Parkes JG (1995) Beyond alcohol : beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta* 237: 155-187.
- Benthath A, Rusznyák S, Szent-György A (1936) Vitamin nature of flavone. *Nature*; 798. *Flavonoids in Health and Disease*. Ed. Marcel Dekker, INC. New York. 5: 137-161.
- Jovanovic SV, Simic MG (2000) Antioxidant in nutrition. *Ann N Y Acad Sci*. 899: 326-34.
- Bonsnes RW, Tausski HA (1945) The colorimetric determination of creatinine of the Jaffe reaction. *J Biol Chem* 158: 581-584.
- Talke H, Schubert GE (1965) Enzymatische Harnstoffbestimmung im Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin Wschr* 43: 174-175.
- Trinder P (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6:24-27.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Multicenter study of Tina-quant Albumin in urine and β -NAG in urine. Workshop Munich (1991), *Wien klin Wschr* 103, supplement 189:1-64.
- Yakata M, Sugita O, Sakai T, Uchiyama K, Wada K (1983) Urinary enzyme determination and its clinical significance. Enzyme derived from the kidney tubular epithelium—N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. Preclinical evaluation of the urinary NAG activity and changes in renal diseases. *Jap. J Clin Path Suppl* 56:90-101.
- Rosalki SB, Foo AY, Burlina A (1993) Multicenter evaluation of iso-ALP test kit for measurement of bone Alkaline Phosphatase activity in serum and plasma. *Clin Chem* 39:648-652.
- Persijn JP, van der Slik W (1976) A new method for the determination of g-Glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 14:421-427.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. Apr;84(4):407-412.
- Recknagel RO, Glende EA Jr (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 105:331-337.
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10): 3170-3175.
- Goldberg DM, Spooner RJ (1983) Determination of glutathione reductase activity. *Methods of Enzymatic Analysis* Ed. Bergmeyer HV 3^o ed. Vol. 3: 258-265.
- Friberg L (1984) Cadmium and the kidney. *Environ Health Perspect* 54: 1-11.
- Goyer RA, Cherian MG (1995) Renal effects of metals. *Metal Toxicology*. Academic Press. San Diego. 389-412.
- Nordberg GF, Kjellström T, Nordberg M (1985) Kinetic, dose and metabolism. Cadmium and Health. Vol I. Exposure, dose and metabolism. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Goldstein SR, Schnellmann RG (1996) Toxic responses of the kidney. En: Klaassen CD, Amdur MO, Doull J Casarett and Doull's. *Toxicology: The basic science of poisons*. Ed. Mc Graw Hill. - 5th ed. Kansas. 417-443.
- Elinder CG, Edling C, Lindberg E, Kägedal B, Vesterberg O (1985) b2-microglobulinuria among workers previously exposed to cadmium: follow-up and dose-response analyses. *Am J Ind Med* 8: 553-564.

37. Roels HA, Lauwerys RR, Buchet JP, Bernard AM, Vos A, Oversteyns M (1989) Health significance of cadmium induced renal dysfunction: a five year follow up. *Br J Ind Med* 46: 755-764.
38. Roels HA, Lauwerys RR, Buchet JP, Bernard AM, Lijnen P, Van Houte G (1990) Urinary kallikrein activity in workers exposed to cadmium, lead, or mercury vapour. *Br J Ind Med* 47: 331-337.
39. Lauwerys R, Roels H, Regniers M, Buchet JP, Bernard A, Goret (1979) A significance of cadmium concentration in blood and urine in workers exposed to cadmium. *Environ Res* 20: 375-391.
40. Patel V, Luft EC, Yum MN, Patel B, Zeman W, Klert SA (1975) Enzymuria in gentamicin-induced kidney damage. *Antimicrob Agents Chemother* 7: 364-369.
41. Gibey R, Dupond JL, Alber D, Leconte des Floris R, Henry JC (1981) Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), alanine-aminopeptidase (AAP) and beta-2-microglobulin (beta 2M) in evaluating nephrotoxicity of gentamicin. *Clin Chim Acta* 116 (1): 25-34.
42. Josepovitz C, Farrugella T, Levine R, Lane B, Kaloyanides GJ (1985) Effect of netilmicin on the phospholipid composition of subcellular fractions of the rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 810-819.
43. Josepovitz C, Pastoriza- Muñoz E, Timmerman D, Scott M, Feldman S, Kaloyanides GJ (1982) Inhibition of gentamicin uptake in rats renal cortex *in vivo* by aminoglycosides and organic polications. *J Pharmacol Exp Ther* 223: 314-321.
44. Porter GA (1994) Urinary biomarkers and nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab* 20: 181-186.
45. Price RG (1982) Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Rev Toxicol* 23: 99-134.
46. Liu J, Liu YP, Habeebu S, Klaassen CD (1998) Susceptibility of MT-null mice to chronic Cd-Cl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci* 46(1): 197-203.
47. Zahir A. Shaikh, Thanhtram T Vu, Khalequz Zaman (1999) Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 256-263.
48. Meister A, Anderson ME (1983) Gluthatione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
49. Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, Patton S, Malinski T (1998) Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg* 85 (8): 1080-1085.
50. Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R (1999) Influence of the antioxidant quercetin *in vivo* on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 57 (2): 199-208.
51. Shoskes DA (1998) Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation* 66 (2): 147-152.
52. William P, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Maroni N, Gonzalez-Gallego J (2000) The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 33: 742-750.
53. Terao J (1999) Dietary flavonoids as antioxidants *in vivo*: Conjugated metabolites of epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma. *J Med Invest* 46 (3-4): 159-168.
54. Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related flavonoids. *Food Chem Toxicol* 33 (12): 1061-1080.
55. Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Kohno S (1983) Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 116 (2): 612-618.
56. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult RS (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharmacy Pharmacol* 40: 787-792.
57. Das M, Ray PK (1988) Lipid antioxidant properties of quercetin *in vitro*. *Biochem Int* 17 (2): 203-209.
58. Sahu SC, Washington MC (1991) Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer Letters* 58: 75-79.
59. Sahu SC, Washington MC (1991) Effect of antioxidants on quercetin-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Letters* 60: 259-264.
60. Sahu SC, Washington MC (1992) Effect of ascorbic acid and curcumen on quercetin-induced nuclear DNA damage, lipid peroxidation and protein degradation. *Cancer Letters* 63: 237-241.
61. Rana SV, Verma S (1996) Protective effects of GSH, vitamin E, and selenium on lipid peroxidation in cadmium-fed rats. *Biol Trace Elem Res* 51: 161-168.
62. Burton GW, Ingold KU (1981) Autoxidation of biological molecules. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidant *in vitro*. *J Am Chem Soc* 103: 6472-6477.
63. Liebler DC (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J Biol Chem* 261 (26): 12114-12119.
64. Pawluczuk DS, Wong YM (1989) a-Tocopherol as a potential modifier of the toxicity of anthracycline antibiotics. *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* (J. Miquel Eds.) CRC press, Cleveland. 269-280.
65. Diplock AT (1971) The effect of vitamin E on the oxidation state of selenium in rat liver. *Biochem J* 123 (5): 721-729.
66. Erin AN (1984) Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids. A hypothetical mechanism of stabilization of biomembranes by vitamin E. *Biochem Biophys Acta* 774 (1): 96-102.
67. Selenke W (1981) The binding of cadmium metallothionein to isolated renal brush border membranes. *Proc Soc Exp Biol Med* 167 (1): 40-44.
68. Stajn A (1997) Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 117 (2): 167-172.

Evaluación toxicológica en ratas Sprague-Dawley de Interleuquina-2 y del candidato vacunal *FPCR*₃, terapia combinada en pacientes con SIDA

Porras*¹ D, Bacardí¹ D, Aldana L, Merino² N, Amaya¹ R, Suárez¹ J, Vázquez A, Valenzuela¹ C, Rojo¹ G, Milá¹ L, Castillo J, Cosme¹ K y Duarte¹ C

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190., Playa, Ciudad de la Habana, CP 10600. Teléfono: 271 6022, 271 6413 ext 2308; Fax: (5-37) 33 6008 e-mail: tporras7@hotmail.com; ainf.ep@com.ith.tur.cu.

²Instituto de Farmacia y Alimentos, UH. Departamento de Anatomía Patológica. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Calle 222 y Ave. 23. La Coronela. La Habana. Cuba. PO. Box 11600.

Recibido 14 de Febrero de 2003 / Aceptado 12 de Febrero de 2004

Resumen: En busca de nuevas fórmulas terapéuticas para combatir la infección por el virus de inmunodeficiencia humana se han desarrollado diferentes tipos de vacunas, entre las que se encuentran las que estimulan la respuesta de linfocitos T citotóxicos contra antígenos del VIH. A partir de la obtención en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba) de un candidato vacunal que utiliza como vector el virus de la viruela aviar modificado con genes que expresan proteínas anti-VIH, se ha diseñado un estudio clínico que combina la aplicación de este producto (*FPCR*₃) con la terapia antirretroviral de alta eficiencia y dosis bajas de Interleuquina-2 humana recombinante (IL-2hr). Antes de ensayar estos productos biotecnológicos en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida se hizo necesario realizar pruebas toxicológicas para evaluar su seguridad, para lo cual se diseñaron 2 estudios de toxicidad aguda en los que se evaluó la respuesta sistémica y local de ratas Sprague-Dawley a dosis superiores a la que se administrará en los pacientes incluidos en el estudio clínico piloto. Se utilizaron 50 ratas de la sublínea Cenp: SPRD (Sprague-Dawley) en el estudio de toxicidad aguda de Interleuquina-2hr y 70 animales de esta misma especie y sublínea para el realizado al candidato vacunal *FPCR*₃. Los productos se administraron por vía subcutánea e intramuscular respectivamente a niveles de 30, 60 y 90 veces la dosis terapéutica. En el estudio realizado al candidato vacunal *FPCR*₃ se incluyeron 3 grupos en los que se realizaron administraciones repetidas, a fin de evaluar de forma preliminar la tolerancia local de este producto. En ambos estudios se incluyó un grupo control inoculado con el placebo de las formulaciones. Se realizó observación clínica diaria y se llevó a cabo el estudio histopatológico de los órganos diana y del sitio de administración. No se evidenciaron signos de toxicidad ni efectos adversos en los animales inoculados con el candidato vacunal *FPCR*₃ e IL-2. No se reportaron muertes durante los estudios y los animales manifestaron adecuada respuesta ante estímulos, así como incremento progresivo de peso. El estudio histopatológico mostró ligera reacción local caracterizada por secuestro del

inóculo y presencia de tejido de granulación en animales administrados con Interleuquina-2 hr. En los que recibieron diferentes dosis del candidato vacunal *FPCR*₃ se reportaron granulomas macrofágicos de diversa intensidad en el sitio de administración. No se reportó en ningún caso signos de toxicidad en los órganos estudiados. Aún cuando se precisan otros estudios toxicológicos, estos resultados sugieren que la aplicación del candidato vacunal *FPCR*₃ contra el virus de la inmunodeficiencia humana y de Interleuquina-2hr es segura y bien tolerada en el espectro de dosis estudiadas, garantizando un marco de seguridad adecuado para su aplicación en los pacientes infectados con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida incluidos en el estudio clínico piloto.

Palabras clave: Toxicidad aguda, vacunas DNA, VIH, Interleuquina-2.

Abstract: Toxicological evaluation of Interleukin-2 and *FPCR*₃ vaccine candidate in Sprague-Dawley rats, combined therapy in AIDS - patients. Different types of vaccines have been developed in the search for new therapeutic formulas against the human immunodeficiency virus; among them, are those that stimulate cytotoxic T lymphocyte response against HIV antigens. After a vaccine candidate was obtained at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Havana, Cuba) using a modified fowl pox virus with genes that express HIV proteins, a clinical trial combining the application of this product (*FPCR*₃) with highly active antiretroviral therapy and low doses of human recombinant Interleukin-2 was designed. Before testing these biotechnological products in patients with acquired immunodeficiency syndrome, it was necessary to evaluate their safety by carrying out various toxicological assays. Two acute toxicity studies were designed in which the systemic and local responses of Sprague-Dawley rats given higher doses than the patients included in the pilot clinical study. Fifty rats of the Cenp subline: SPRD (Sprague-Dawley) were used in the acute toxicity study of hr-Interleukin-2 and 70 animals of this same species and subline were used for the vaccine candidate, *FPCR*₃. The products were administered by subcutaneous and

*A quien dirigir la correspondencia.

intramuscular routes respectively, at doses 30, 60 and 90 times higher than the therapeutic dose. Three groups were included in the *FPCR₃* vaccine candidate study, receiving repeated administrations to evaluate local tolerance for this product. In both studies a control group inoculated with placebo formula, was used. Daily clinical observation was carried out. A histopathological study of the target organs and the administration site was also carried out. No signs of toxicity or adverse effects were observed in the animals inoculated with the *FPCR₃* vaccine candidate or with IL-2. No deaths were reported during the studies and the animals showed an adequate response to stimuli, as well as a progressive increase in weight. The histopathological study showed a slight, local reaction characterized by the presence of granulation tissue in animals that received Interleukin-2. Macrophage granulomas of different intensities at the administration site were observed in the animals that received different doses of the vaccine candidate, *FPCR₃*. No signs of toxicity were observed in the target organs. Even though other toxicological studies are necessary, these results suggest that the use of the vaccine candidate, *FPCR₃* and of Interleukin-2, against the human immunodeficiency virus, is safe and well tolerated when the doses studied are given, assuring adequate safety for its administration to patients infected with the acquired immunodeficiency syndrome included in the pilot clinical trial.

Keywords: Acute toxicity, DNA vaccines, VIH, Interleukin-2.

Introducción

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), caracterizada por la disminución progresiva de células T CD4+ y por el incremento sostenido de la carga viral [1]. El uso de terapias antirretrovirales ha demostrado resultados importantes en la disminución de la replicación del virus, la cual se incrementa rápidamente al cesar la aplicación del medicamento [2]. Estudios comparativos entre pacientes progresivos y no progresivos han demostrado que existe correlación entre una vigorosa respuesta inmune de linfocitos T CD8+ y la disminución de la replicación viral [3], por lo que se ha hecho necesario el uso de estrategias terapéuticas que combinen medicamentos antivirales con estimuladores del sistema inmune, ensayándose diseños que incluyen Interleuquina-2 humana recombinante (IL-2hr), terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE) y vacunas terapéuticas que estimulan la respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) [2].

IL-2hr es una citoquina imprescindible para la supervivencia y expansión proliferativa de células T activadas y células "natural killer", por lo que se ha empleado en la terapéutica de pacientes con SIDA, minimizando sus efectos tóxicos mediante la administración de bajas dosis [4].

Por otra parte, las dificultades prácticas en el desarrollo de vacunas contra el VIH que estimulen una respuesta amplia de anticuerpos neutralizantes han centrado la atención en la producción de vacunas terapéuticas que sean capaces de estimular la respuesta de células T citotóxicas contra antígenos de VIH [5], como el candidato vacunal *FPCR₃*, obtenido a partir de la trans-

formación de un vector viral de la familia *Poxviridae* (virus de la viruela aviar) con un gen que expresa antígenos anti-VIH.

A partir de la obtención de este producto y de la producción de IL-2hr en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba, se ha diseñado un estudio clínico piloto en el cual se combinará terapia antirretroviral de alta eficacia con administraciones de bajas dosis de IL-2hr y el candidato vacunal *FPCR₃*. El objetivo de este trabajo fue realizar estudios de toxicidad aguda de ambos productos biofarmacéuticos y explorar la tolerancia local del candidato vacunal, a fin de evaluar la seguridad de los mismos para su uso en pacientes VIH+.

Material y Métodos

Los estudios se llevaron a cabo según las normas éticas descritas para el uso de animales de experimentación [6], siguiendo las guías de Buenas Prácticas de Laboratorio [7, 8] y los Procedimientos Patrones de Operación aprobados para la realización de estudios toxicológicos [9].

Animales de ensayo

Se utilizó la sublínea de ratas Cexp: SPRD *ALY*[®] (Sprague-Dawley) suministrada por la división de roedores gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). A su llegada a la instalación los animales fueron clínicamente examinados, pesados y alojados de forma individual en cajas de makrolón con lecho de bagazo de caña estéril. Se mantuvieron en observación durante 7 días antes del inicio de los estudios en condiciones ambientales controladas (temperatura entre 19 y 21°C, humedad relativa promedio de 68 % y ciclos luz-oscuridad de 12 horas), las cuales permanecieron constantes durante la fase experimental. El alimento (*ALY co*, CENPALAB) fue suministrado diariamente a razón de 25 g por animal y el agua fue suministrada *ad libitum*.

Para el estudio de toxicidad aguda de IL-2 hr fueron seleccionadas 50 ratas, 25 de cada sexo con peso promedio de 166 gramos, (entre 5 y 6 semanas de edad), mientras que para los estudios realizados con el candidato vacunal *FPCR₃* se escogieron aleatoriamente 70 ratas, 35 de cada sexo, cuya variación de peso no excedió \pm el 20 % del valor promedio de 185.5 gramos (edad entre 6 y 7 semanas).

Formulación

Se emplearon formulaciones de IL-2 hr y el candidato vacunal *FPCR₃* contra el VIH producidas en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba). IL-2hr fue obtenida con un 99 % de pureza (HPLC-RP), actividad biológica de 5×10^6 UI/mL y concentración de proteínas (Lowry) de 0.46 mg/mL. Fueron confirmados además, la esterilidad, apirogenicidad, pH y estabilidad de éste producto. La formulación del candidato vacunal *FPCR₃* contra el VIH fue obtenida a partir del virus de la viruela aviar (VVA, familia *Poxviridae*) modificado con un gen que expresa proteínas anti VIH. Fue comprobada su esterilidad, apirogenicidad, estabilidad y título viral (1×10^7 ufp/mL), así como sus propiedades organolépticas, inocuidad y

ausencia de micoplasmas, siendo en todos los casos satisfactorio el resultado de los ensayos realizados [10].

Diseño Experimental

Los estudios fueron diseñados siguiendo las regulaciones descritas por ICH/EMEA (International Conference on Harmonization/European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) [11, 12]. En el diseño se incluyeron además, aspectos descritos en la guía designada como la 425 de la OECD [13]. Los animales empleados en los estudios de toxicidad aguda de IL-2hr y del candidato vacunal contra el VIH fueron aleatorizados siguiendo una lista generada por el programa *Aleator* [14] y administrados por vía subcutánea e intramuscular respectivamente, siguiendo el esquema siguiente:

Estudio de toxicidad aguda de IL-2hr

Grupos experimentales y dosificación: Se incluyeron en el estudio cinco grupos (cada uno con 10 animales, 5 de cada sexo), en los que se inocularon 3 niveles de dosis, un control administrado con solución salina (0.9%) y otro con el placebo de la formulación.

Grupo I: Control (solución salina 0,9 %)

Grupo II: Placebo

Grupo III: $1,05 \times 10^6$ UI / kg (30 veces la dosis terapéutica)

Grupo IV: $2,1 \times 10^6$ UI / kg (60 veces la dosis terapéutica)

Grupo V: $3,2 \times 10^6$ UI / kg (90 veces la dosis terapéutica)

Frecuencia de administración: Se realizó administración única el día 1 del estudio, por vía subcutánea (vía que se empleará en el estudio clínico), en el espacio intercostal derecho.

Duración del ensayo y observaciones: El estudio tuvo una duración de 14 días, transcurridos los cuales los animales fueron sacrificados. Durante la fase experimental los animales fueron mantenidos en las condiciones ambientales descritas anteriormente y se realizaron observaciones clínicas diarias, a fin de registrar cualquier variación en el comportamiento o signo de toxicidad. Estas evaluaciones clínicas se realizaron según el método de valoración descrito por DiPasquale y Hayes [15] e incluyeron cambios en piel y pelaje, coloración y apariencia de las membranas mucosas y ojos, sistema respiratorio, nervioso central y periférico y actividad somatomotora. Se realizó la medición del peso corporal los días 1, 7 y 14 del estudio y se cuantificó el consumo de alimento con una frecuencia diaria.

Estudio de toxicidad aguda y evaluación preliminar de la tolerancia local del candidato vacunal FPCR₃ contra el VIH

Grupos experimentales y dosificación: Los animales se distribuyeron en 7 grupos (cada uno con 10 animales, 5 de cada sexo), que fueron a su vez divididos en función del número de administraciones recibidas. Se incluyeron 2 grupos inoculados con el placebo de la formulación

Grupo I: Placebo

Grupo II: $4,2 \times 10^5$ ufp/kg (30 veces la dosis terapéutica)

Grupo III: $8,4 \times 10^5$ ufp/kg (60 veces la dosis terapéutica)

Grupo IV: $12,6 \times 10^5$ ufp/kg (90 veces la dosis terapéutica)

Grupo V: Placebo

Grupo VI: $4,2 \times 10^5$ ufp/kg (30 veces la dosis terapéutica)

Grupo VII: $8,4 \times 10^5$ ufp/kg (60 veces la dosis terapéutica)

Frecuencia de administración: Los grupos I, II, III y IV recibieron una administración única el día 1 del ensayo por vía intramuscular (vía que se empleará en el estudio clínico), en el cuadriceps femoral de la extremidad posterior derecha. Los grupos V, VI y VII fueron administrados los días 1, 3 y 5, a fin de evaluar de forma preliminar la tolerancia en el sitio de administración tras inoculaciones reiteradas de este novedoso producto, el cual, a diferencia de la IL-2hr no ha sido empleado en esquemas clínicos. Este diseño se realizó siguiendo las regulaciones descritas por ICH/EMEA para estudios de tolerancia local [16].

Duración del ensayo y observaciones: Los grupos del I al IV se mantuvieron en estudio durante 14 días, momento en que fueron sacrificados, mientras que los grupos V, VI y VII fueron sacrificados el día 7 del experimento. En ambos casos las condiciones ambientales y los parámetros de observación coinciden con los descritos para el estudio de toxicidad aguda de IL-2hr.

Estudio histopatológico para ambos estudios: El día señalado para el sacrificio, a los animales se les practicó eutanasia mediante dislocación cervical previo tratamiento anestésico con éter y fueron desangrados por un corte en la arteria femoral. Se procedió a la observación de la superficie corporal y cavidades y a la necropsia en la que se realizó la búsqueda macroscópica de signos de toxicidad o anomalías en todos los órganos. Se tomaron muestras de hígado, bazo, ganglios mesentéricos y sitio de administración, las cuales fueron procesadas utilizando una tinción de hematoxilina-eosina y observadas utilizando un microscopio Carl Zeiss.

Procesamiento de datos

Las variables usadas para el tratamiento estadístico fueron el peso corporal (PC), el consumo promedio semanal de alimentos (CA) y los hallazgos histopatológicos (HH). En todos los casos se estimaron las medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, valores máximos y mínimos).

Para los análisis de PC y CA se verificaron los supuestos de normalidad (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) en cada tiempo de evaluación y para cada sexo, aplicándose Análisis de varianza (ANOVA) paramétrico o la alternativa no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), dependiendo del cumplimiento de los supuestos de distribución. Se realizaron comparaciones pareadas en los intervalos consecutivos, utilizando la prueba t pareada o la prueba de Wilcoxon, en función del cumplimiento del supuesto de aproximación por una distribución normal. Los datos resultantes del estudio histopatológico fueron analizados a través de la construcción de las tablas de clasificación cruzadas, con la prueba de independencia asociada (prueba exacta de Fisher)[17]. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa SSPS 8.0 sobre Windows[18].

Resultados

Observaciones clínicas

En las observaciones clínicas realizadas diariamente a los animales administrados con IL-2hr y con el candidato vacunal *FPCR₃* contra el VIH no se evidenciaron signos de toxicidad ni efectos adversos. No se reportaron cambios en el pelaje, la coloración, apariencia de ojos y membranas mucosas fue normal, así como la actividad somatomotora y comportamiento, observándose adecuada respuesta ante los estímulos. No se registraron muertes. En el estudio de toxicidad aguda de IL-2hr se observaron quistes pequeños en aproximadamente el 50 % de los animales de los grupos tratados con este producto, así como ligeras induraciones, ambos en el sitio de administración. Estos hallazgos no se relacionan con la dosis estudiada ya que se reportaron con mayor frecuencia de aparición en animales tratados con la menor dosis de IL-2 (6 animales /10), en contraste con un solo animal reportado en el grupo tratado con 90 veces la dosis terapéutica. En los estudios realizados al candidato vacunal *FPCR₃*, las induraciones ligeras en el sitio de inoculación fueron también el único signo registrado, las cuales fueron detectadas solamente en los grupos que recibieron el producto de forma repetida. Este signo manifestó una rápida reversión, siendo indetectable 48 horas después de ser administrada la sustancia de ensayo.

Peso corporal y consumo de alimento

En los estudios realizados con ambas sustancias de ensayo (IL-2hr y candidato vacunal *FPCR₃* contra el VIH) se mantuvo un incremento significativo de peso corporal en ambos sexos ($p=0.0003$) (tabla 1, tabla 2), sin que existiera diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en cada tiempo de evaluación ($p > 0.05$).

El consumo de alimento mantuvo un comportamiento similar en ambos estudios realizados. Los animales hembras mantuvieron un consumo promedio entre 19 y 21 gramos /día, mientras que los animales machos consumieron de manera uniforme 25 gramos/día (tabla 3) No se reportaron diferencias significativas entre los grupos de tratamientos ni entre los tiempos de evaluación en ninguno de los casos analizados ($p > 0.05$).

Hallazgos macroscópicos

Durante la observación macroscópica no fue reportada ninguna alteración morfológica en los órganos y tejidos inspeccionados durante la necropsia.

Estudio histopatológico

Toxicidad aguda de IL-2 hr

En el 78 % de los animales involucrados en este estudio no se detectó alteración histológica en el sitio de administración de la sustancia de ensayo. Valores similares se reportaron durante el análisis realizado a muestras de hígado, bazo y ganglios mesentéricos (96 %, 80 % y 100 % respectivamente).

En la tabla 4 se presenta la frecuencia de aparición de los hallazgos en los órganos blanco, siendo evidente que la hematopoyesis extramedular del bazo es el evento más común (18 % de los animales). No fueron encontradas diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores reportados en los grupos control (solución salina y placebo) y los grupos administrados con IL-2 hr, lo que permite asumir que es un hallazgo no relacionado con el producto en estudio. No se observó agotamiento celular en la pulpa blanca del bazo, ni en ganglios mesentéricos, ni ningún otro signo histopatológico que indicara inmunosupresión. En el

Tabla 1. IL-2 hr: Variaciones en el promedio de peso corporal (g). (Media ± Desviación Estándar).

Grupo	Día 1		Día 7		Día 14	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
I	154.0 ± 3.32	176.6 ± 6.66	182.8 ± 11.14	243.0 ± 7.75	196.0 ± 13.47	273.0 ± 9.57
II	158.4 ± 1.82	176.4 ± 7.40	184.8 ± 8.07	239.0 ± 6.78	195.8 ± 10.26	268.6 ± 7.09
III	156.0 ± 5.00	177.0 ± 8.34	188.0 ± 10.02	236.2 ± 8.76	199.8 ± 17.68	262.2 ± 14.04
IV	155.6 ± 3.44	179.4 ± 6.62	186.8 ± 9.52	238.4 ± 5.27	195.6 ± 13.22	266.0 ± 7.18
V	155.4 ± 5.50	179.6 ± 6.80	189.2 ± 11.52	244.6 ± 5.03	203.6 ± 12.70	273.4 ± 8.50

Tabla 2. Candidato vacunal *FPCR₃* contra el VIH: Variaciones en el promedio de peso corporal (g). (Media ± Desviación Estándar).

Grupo	Día 1		Día 7		Día 14	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
I	176.8 ± 7.9	196.4 ± 11.1	203.0 ± 11.0	245.8 ± 16.5	215.2 ± 13.5	285.2 ± 18.3
II	166.0 ± 12.6	204.8 ± 13.3	192.4 ± 17.1	256.2 ± 11.9	204.6 ± 16.1	290.0 ± 13.0
III	170.6 ± 8.3	208.8 ± 2.9	196.00 ± 8.2	260.2 ± 11.4	207.6 ± 9.0	294.8 ± 9.8
IV	169.8 ± 5.9	207.0 ± 6.5	194.60 ± 5.6	258.2 ± 9.2	208.2 ± 9.2	290.4 ± 8.5
V	170.6 ± 11.7	206.4 ± 11.1	204.0 ± 14.7	258.6 ± 8.7	—	—
VI	166.4 ± 6.1	204.0 ± 10.0	193.67 ± 1.5	247.7 ± 16.0	—	—
VII	165.8 ± 7.9	201.4 ± 19.3	194.00 ± 5.2	262.3 ± 3.5	—	—

Tabla 3. Consumo promedio de alimento (g) de animales hembras y machos en ambos estudios. (Media ± Desviación Estándar)

Grupo	Sexo	CONSUMO DE ALIMENTO (g)			
		Toxicidad aguda de IL-2hr		Toxicidad aguda y Tolerancia local de FPCR ₃	
		Semana 1	Semana 2	Semana 1	Semana 2
I	V	20.1± 2.0	22.0 ± 0.8	19.5 ± 1.4	20.5 ± 0.7
	H	25.0 ± 0.0	24.9 ± 0.1	25.0 ± 0,0	25.0 ± 0,0
II	V	20.0 ± 1.1	24 .0± 0.7	20.5 ± 1.2	20.4 ± 1.0
	H	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0,0
III	V	20.6 ± 0.8	20.7 ± 1.5	20.0 ± 0.7	20.0 ± 1.3
	H	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0,0
IV	V	19.3 ± 1.1	20.0 ± 0.7	20.3 ± 1.2	21.1 ± 0.9
	H	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0,0
V	V	20.3 ± 0.7	21.1 ± 0.2	21.4 ± 1.0	–
	H	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	25.0 ± 0.0	–
VI	V	–	–	19.7± 0.5	–
	H	–	–	25.0 ± 0.0	–
VII	V	–	–	19.7 ± 0.8	–
	H	–	–	25.0 ± 0.0	–

Tabla 4. Frecuencia de aparición de hallazgos histopatológicos en el estudio de Toxicidad aguda de IL-2hr.

Grupo	Sitio de administración				Hígado		Bazo		Ganglio
	NAS	S	TG	ED	NAS	HE	NAS	HE	NAS
I	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	5/10	5/10	10/10
II	9/10	0/10	0/10	1/10	9/10	1/10	9/10	1/10	10/10
III	8/10	2/10	1/10	0/10	9/10	1/10	9/10	1/10	10/10
IV	7/10	3/10	0/10	0/10	10/10	0/10	9/10	1/10	10/10
V	5/10	3/10	2/10	0/10	10/10	0/10	8/10	2/10	10/10

NAS Nada a señalar, S secuestro del inóculo rodeado por reacción granulomatosa, TG Tejido de granulación, ED Edema de la dermis, HE Hematopoyesis extramedular.

sitio de administración, el 16 % de los animales, pertenecientes a los grupos inoculados con IL-2 hr, presentaron secuestro del inóculo rodeado de reacción granulomatosa, sin que la comparación de estos valores con los grupos control y placebo mostraran significación estadística ($p > 0.05$). Se observó además tejido de granulación subcutánea (Figura 1).

Toxicidad aguda y tolerancia local del candidato vacunal FPCR₃ contra el VIH

En el 65 % del total de animales estudiados, no se reportaron hallazgos histopatológicos en el sitio de administración, siendo en el resto la reacción granulomatosa de diferentes tipos el principal signo encontrado. Esta reacción está compuesta mayormente por macrófagos y fue localizada preferentemente en el endomisio de las fibras musculares, acompañada de tejido de granulación incipiente y de eventual regeneración del sarcolema (Figura 2). Fue reportada además hematopoyesis en hígado y bazo (Figura 3), sin que existieran diferencias significativas entre la frecuencia de aparición en los grupos tratados con la sustancia de ensayo y el grupo placebo ($p > 0.05$) (tabla 5)

Discusión

El incremento sostenido de peso y el consumo estable de alimento mantenido por los animales utilizados en los estudios pre-clínicos de seguridad realizados a IL-2 hr y al candidato vacunal FPCR₃ constituyen índices indirectos de la no toxicidad de las sustancias estudiadas, dada la sensibilidad de estos parámetros para detectar alteraciones debidas a sustancias exógenas, incluso aquellas de baja toxicidad. Independientemente de la dosis administrada, los animales aumentaron de peso durante la fase experimental de los estudios de forma significativa ($p < 0.05$) hasta el momento del sacrificio, sin que aparecieran variables en cada tiempo de evaluación que indicaran la influencia de dosis de hasta 90 veces la dosis terapéutica en ambos parámetros, que registraron valores similares a los reportados para animales sanos de la especie [19,20].

Nuestras observaciones clínicas conducen a confirmar la seguridad de estos productos; no se evidenciaron alteraciones etológicas ni morfológicas que pudieran ser atribuibles a las sustancias en estudio. Las induraciones encontradas de forma poco frecuente y reversible en el caso de animales tratados con tres

Tabla 5. Toxicidad aguda del candidato vacunal FPCR₃ contra el VIH. Frecuencia de aparición de alteraciones microscópicas por grupos.

Grupo	Sitio de administración						Hígado		Bazo		Timo	Ganglio
	NAS	GFM	GD	GFM	GFMD	TG	NAS	HE	NAS	HE	NAS	NAS
I	9/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	4/10	6/10	0/10	0/10
II	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	8/10	2/10	4/10	6/10	0/10	0/10
III	9/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	10/10	0/10	4/10	6/10	0/10	0/10
IV	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	9/10	1/10	5/10	5/10	0/10	0/10
V	6/10	1/10	0/10	2/10	1/10	0/10	7/10	3/10	4/10	6/10	0/10	0/10
VI	1/10	0/10	1/10	3/10	4/10	1/10	8/10	2/10	5/10	5/10	0/10	0/10
VII	0/10	0/10	1/10	4/10	5/10	0/10	7/10	3/10	1/10	9/10	0/10	0/10

Leyenda: GD: Granuloma difuso, GFM: Granuloma focal minino, GFMD: Granuloma focal minimo disperso, TG: Tejido de granulación, HE Hematopoyesis extramedula, H: Hígado, B: Bazo, T: Timo, GL: Ganglios linfáticos, NAS: Nada a señalar.

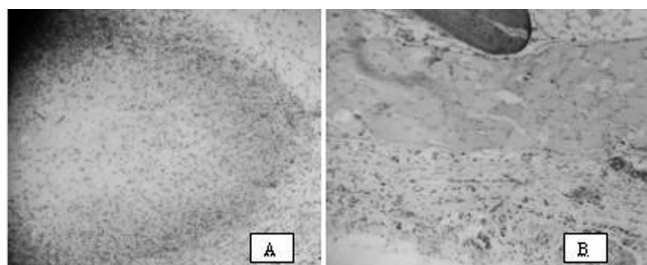


Fig. 1. Observaciones microscópicas en el sitio de administración de IL-2hr. A. Secuestro de inóculo. B Tejido de granulación subcutáneo.

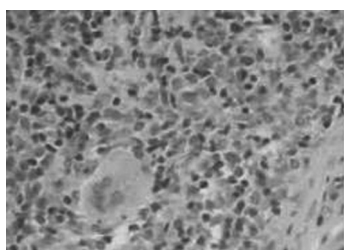


Fig. 3. Hematopoyesis extramedular en bazo de un animal inoculado con el grupo placebo en el estudio de Toxicidad aguda del candidato vacunal FPCR₃.

dosis del candidato vacunal FPCR₃, así como los pequeños quistes observados en los animales administrados con IL-2 hr no parecen tener relación con las dosis administradas, sino con el mecanismo de acción de éstos producto, según han reportado otros autores [21, 22, 23, 24] y no constituyen efectos adversos de consideración, dada su baja frecuencia de aparición y su mínima intensidad.

La observación microscópica realizada durante el estudio histopatológico confirma el resultado de las observaciones clínicas reportadas. En el sitio de administración la mayoría de los animales no mostraron ningún signo de alteración histológica. La IL-2hr utilizada en bajas dosis desarrolla reacciones de tipo inflamatoria como consecuencia de la activación de la cascada de citoquinas proinflamatorias (interferón g, factor estimulador de colonias de macrófagos, entre otras) y de la proliferación y diferenciación de macrófagos y células linfoides [21], lo que condiciona la formación de granulomas macrofágicos de diver-

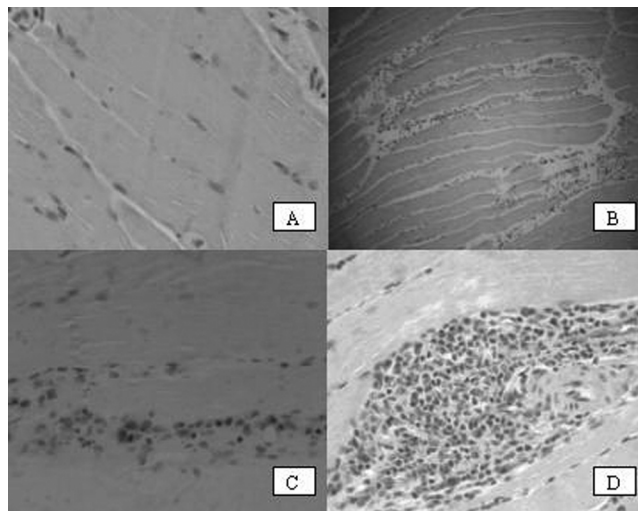


Fig. 2. Observaciones microscópicas en el sitio de administración en animales inoculados con el candidato vacunal FPCR₃. A- fibra muscular sin alteraciones. B- granuloma mínimo disperso. C- granuloma focal mínimo. D-granuloma macrofágico con tejido de granulación incipiente.

sa intensidad Otros autores [22] han reportado la presencia de eosinófilos y leucocitos mononucleares (entre los días 4 y 7 del estudio) en el sitio de administración en ratones inoculados con dosis bajas de IL 2 hr, la cual se tradujo en inflamación en la región donde fue administrado el producto. Los efectos encontrados por nosotros son de menor severidad que los reportados en la literatura.

Los distintos tipos de reacción granulomatosa observados en los animales tratados con dosis de hasta 90 veces la dosis terapéutica del candidato vacunal FPCR₃ son la respuesta esperada ante la inoculación de una sustancia inmunogénica y ha sido reportada por autores que han empleado vacunas similares a ésta en adultos seronegativos [23]. Por su magnitud se consideran efectos poco significativos a nivel local

La hematopoyesis extramedular, (fundamentalmente en el bazo, y en menor frecuencia en el hígado), se ha descrito con anterioridad como resultado de la respuesta orgánica a la influencia moderada de estrés en el curso de la experiencia [24]. La frecuencia de aparición de este signo en el bazo es mayor en el grupo administrado con solución

salina que en los grupos tratados con IL-2 hr, mientras que en el hígado solo aparece en 2 animales, uno de los cuales fue inoculado con el placebo de la formulación. En el caso de los animales tratados con el candidato vacunal, la frecuencia con que se reportó hematopoyesis extramedular de bazo es similar entre todos los grupos en estudio, lo que permite asumir la independencia de este hallazgo del producto inoculado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede afirmar que la IL -2 hr aplicada en los niveles de dosis estudiados no evidencia alteraciones, ni locales ni sistémicas, que puedan ser interpretadas como signos de toxicidad o daño biológico, lo que confirma los resultados obtenidos por Kendall [2] en estudios clínicos cuya estrategia terapéutica combina el uso de productos antirretrovirales y vacunas anti VIH con el uso de bajas dosis de este producto ($2,5 \times 10^6$ UI/ día) a fin de minimizar los efectos tóxicos derivados del mecanismo de acción de esta citoquina y propiciar la recuperación acelerada de los niveles de inmunidad en pacientes con SIDA. El candidato vacunal ensayado (FPCR₃) no evidenció tampoco efectos adversos ni en el sitio de administración, ni en los órganos diana estudiados, lo cual sugiere que, aun cuando se precisen otros estudios toxicológicos, ambos productos biofarmacéuticos podrían ser empleados con un adecuado marco de seguridad en un estudio clínico piloto de terapias combinadas en pacientes VIH+.

Referencias

- Walker B. (1999) Cellular immune response in VIH-1 infections and effects of therapy on immunologic parameters. *Int AIDS Soc*, 74-8.
- Smith K. (2001). Low dose daily Interleukin- 2 immunotherapy: accelerating immuno restoring and expanding VIH-specific T-cell immunity without toxicity. *AIDS* 15: S28- S35.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, *et al.* (1997). Vigorous VIH-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, 278:1447-1450.
- Smith K, Jacobson E. (1999). Restoration of immunity with IL-2 therapy. *The AIDS reader* 9: 563-572.
- Corey L., Mc Elrath J., Weinhold K., Matthews T., Stablein D., Grahm B., *et al.* (1998) Cytotoxic T cell and Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency Virus Type 1 envelope with a combination vaccine regimen. *J. Infectious Dis.* 177:301-9.
- Guidelines for Breeding and Care of Laboratory Animals (1998) World Health Organization and International Council for Laboratory Animals Science(ICLAS).
- Food and Drug Administration (1997) Good Laboratory Practice for non clinical laboratory studies. Title 21 Code of Federal Regulations, Subchapter A, Part 58.
- Programa para el Uso de Animales de Experimentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. (1998) UBioterio, CIGB.
- Procedimientos Patrones de Operación. UBioterio. CIGB.
- Rodríguez A (2002). Análisis de calidad de IL.2hr y el candidato vacunal FPCR3 contra el VIH. Informe Final. (La Hab). Departamento de Aseguramiento de la Calidad. Dirección de Calidad. CIGB. Informe N° 065/02.
- ICH/EMEA(1997). Preclinical safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Step 4.
- ICH/EMEA (2000) No-clinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals. ICH M3 (M) (modification of CPMP/ICH/286/95).
- OECD (2001). Guidelines for the Testing of Chemicals 425: Acute Oral Toxicity; Modified Up-and-Down Procedure.. Section 4: Health Effects (Updated Guideline, adopted 20th December 2001).
- Aleator I (1997). Randomization (computer software). Versión 1.1. Dpto de Automatización, CIGB.
- DiPasquale L, Hayes W. (2001). Acute Toxicity and Eye Irritancy. In: Principles and methods of Toxicology. (Hayes W ed., Fourth Edition).pp 864-867. Taylor and Francis, Philadelphia, USA.
- ICH/EMEA (2001) Note for Guidance on Non-Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products, CPMP/SWP/2145/00 (CPMP adopted Feb. 01).
- Hochberg, Y. (1988) A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance *Biometrika* 75: 800-802.
- SPSS Inc.(1997)Statistical Package Scientific System, version 8.0, Windows.
- Charles River France (1992) Technical Information. Rat CD.Crl: CD(SD)BR.
- IFFA CREDO (1991) Laboratory Animals. Technical Information, 'The OFA rat (Sprague/Dawley)
- Smith K. (2000) Interleukin 2 immunostimulation. *Therapeutic Immunology*. 2^a edition (K. Austen, S. Brakoff, F. Rosen, Eds). Blackwell Sci, Cambridge, MA.
- Dunn C.J, Hardee M.M *et al* (1996) The inflammatory potential of IL-2: local induction of a specific chronic granulomatous lesion in mice.
- Clements-Mann ML., Weinhold K., Matthews TJ., Graham BS., Gorse GJ., Keefer MC., McElrath J., *et al.* (1998) Immune responses to human immunodeficiency virus type 1 induced by canarypox expressing VIH-IMN gp120, VIH-1 SF2 recombinant gp120 or both vaccines in seronegative adults. *J. Infectious Dis*, 177_ 1230-1246
- Swan, CJV (1973) Tumours of the haematopoietic System. In: V.S.Turosov (Ed.). *Pathology of tumours in laboratory animals*. Vol 1, pp 185 -214. Iarc Scientif Pub. N° 5, Lyon.

Convulsiones secundarias a la administracion de flumazenilo en un caso de sobredosis de benzodiazepinas y antidepressivos tricíclicos

Melo¹ OL, Nogué S², Trullás² JC, Aguiló² S y Maciel² A

¹Toxicología Clínica, Universidad del Rosario; Bogotá, Colombia. ²Área de Vigilancia Intensiva. Hospital Clínic. Barcelona

Recibido 28 de Agosto de 2003 / Aceptado 4 de Febrero de 2004

Resumen: El flumazenilo es un antagonista competitivo del receptor GABA que revierte con eficacia los efectos de la sobredosis por benzodiazepinas. Es un medicamento seguro, aunque se han descrito algunos efectos adversos poco frecuentes, entre ellos las convulsiones. Se presenta el caso de un paciente de 30 años, que fue encontrado en coma después de tomar un número indeterminado de tabletas de benzodiazepinas y antidepressivos tricíclicos en un intento suicidio; tras la administración de flumazenilo, desarrolló una convulsión tónico-clónica generalizada. Durante su evolución tuvo que ser ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos por presentar insuficiencia respiratoria secundaria a una broncoaspiración, de la cual evolucionó satisfactoriamente en 48 horas. Se revisan los factores de riesgo para el desarrollo de convulsiones por la utilización de este antídoto y se dan algunas recomendaciones para el uso seguro del flumazenilo.

Palabras clave: Flumazenilo, benzodiazepinas, coma, convulsiones, antidepressivos tricíclicos.

Abstract: Seizures after flumazenil administration in a case of combined benzodiazepine and tricyclic antidepressant overdose. Flumazenil is a competitive inhibitor of the GABA receptor which effectively counteracts the effects of benzodiazepine overdose. It is considered to be safe, although infrequent adverse effects, including seizures, have been described. We present the case of a 30-year-old patient who was found in coma after taking an unknown amount of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in an attempt to commit suicide. After the administration of flumazenil, the patient suffered generalized tonic-clonic seizure. The patient was admitted to the ICU due to respiratory insufficiency secondary to broncoaspiration, with a satisfactory evolution after 48 hours. The risk factors for the development of seizure after flumazenil administration are discussed, recommendation for its safe use are suggested.

Key words: Flumazenil, benzodiazepines, coma, seizures, tricyclic antidepressant.

Introducción

El flumazenilo, es un inhibidor competitivo del receptor g-acido aminobutírico, con una gran efectividad para antagonizar los efectos de la sobredosis por benzodiazepinas pura o asociada [1, 2], en pacientes de cualquier edad y que estén con un grado de coma inferior a 12 puntos según la escala de Glasgow [3,5]. El flumazenilo es también eficaz para revertir la sedación o anestesia después de cualquier procedimiento en el que se hayan aplicado benzodiazepinas [2] y también es una herramienta útil para el diagnóstico diferencial del paciente que se remite al Servicio de Urgencias en coma de origen desconocido, presumiblemente de etiología tóxica [3-5].

Aunque es un medicamento relativamente seguro, se han descrito algunos efectos adversos infrecuentes como náuseas, vómitos, ansiedad, agitación, arritmias y convulsiones [1,2,6,7]. Se presenta el caso de un paciente que desarrolló una convulsión tónico-clónica generalizada tras la administración de flumazenilo.

Caso clínico

Un hombre de 30 años fue remitido al Servicio de Urgencias del Hospital, por haber sido encontrado inconsciente por su familia; en el lugar de los hechos se hallaron blisters vacíos de diazepam (tabletas por 5 mg, 20 unidades), citalopram (tabletas por 20 mg, 14 unidades) y lormetazepam (comprimidos por 1 mg, 60 unidades); también se encontraron algunas tabletas de risperidona y restos de vómito. El paciente tenía de base un trastorno límite de personalidad y antecedentes depresivos de larga evolución, habiendo realizado 5 intentos de suicidio, el primero a los 19 años y el último hacía 2 años. No tenía antecedentes epilépticos.

El paciente ingresó en Urgencias sin poderse precisar el tiempo de evolución desde la ingesta, presentando un estado de coma con una puntuación de 6 en la escala de Glasgow (apertura de ojos-1, respuesta motora-4, respuesta verbal-1), con presión arterial 110/90 mmHg, frecuencia cardíaca 64 por minuto, temperatura 36,5°C y saturación de oxígeno de la hemoglobina del 92%. El examen físico no mostró otros hallazgos patológicos, salvo pupilas mióticas, hipotonía muscular e hiporreflexia tendinosa. El ECG fue normal, así como el hemograma y la bioquímica. Se tomó una muestra de orina para análisis toxicológico que fue positiva para benzodiazepinas y negativa para drogas de abuso (anfetaminas, cocaína, cannabis, opiáceos y metadona). Se indicó la administración de flumazenilo (0,5 mg) con lo que

Correspondencia: Dr. Santiago Nogué, Área de Vigilancia Intensiva. Hospital Clínic. Calle Villarroya 170. 08036 Barcelona. E-mail: snogue@clinic.ub.es. Fax: 93-2275693.

mejoró la puntuación en la escala de Glasgow (2+5+2), por lo cual se mantuvo al paciente en observación y con una perfusión continua del mencionado antídoto (0,25 mg/h). A las 10 horas el intoxicado fue evaluado de nuevo, constando un deterioro de su nivel de conciencia (Glasgow 1+3+1), desaturación de oxígeno de la hemoglobina (80%) y marcada hipoventilación del hemitórax derecho; ante la respuesta previa favorable al flumazenilo, se iniciaron nuevamente bolos endovenosos de flumazenilo de 0,25 mg cada minuto, hasta un total de 1 mg; a los 5 minutos, el paciente presentó una convulsión tónico-clónica generalizada, que duró unos 15 segundos, que cedió espontáneamente. Una gasometría arterial mostró una acidosis metabólica con hipoxemia severa (pO_2 47 mmHg), por lo que se decidió realizar la intubación orotraqueal y la ventilación mecánica. En la radiografía de tórax se observó una atelectasia del hemitórax derecho e imágenes alveolares en la base del hemitórax izquierdo compatibles con una broncoaspiración, por lo cual se inició tratamiento antibiótico con amoxicilina y ácido clavulánico y se trasladó al Área de Vigilancia Intensiva. Se tomó una nueva muestra de orina (12 horas después del ingreso) que se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución y que mostró la presencia de antidepresivos tricíclicos. La crisis convulsiva fue atribuida a la administración del flumazenilo en un paciente intoxicado con antidepresivos tricíclicos y con complicaciones respiratorias, por lo que no se consideró indicada la práctica de un electroencefalograma ni de un TAC craneal. La monitorización electrocardiográfica continua del paciente no mostró trastornos del ritmo, ni de la conducción ni de la repolarización. A las 24 horas el paciente había recuperado la conciencia y mejorado de su insuficiencia respiratoria, por lo que se pudo retirar la ventilación mecánica y extubar sin complicaciones. Al ser interrogado, confirmó la ingesta voluntaria de diazepam, clomipramina y lormetazepam, sin recordar la cantidad ni la hora del intento de autólisis. La evolución del paciente fue favorable y pudo ser dado de alta del Hospital una semana más tarde.

DISCUSION

El flumazenilo es una imidabenzodiazepina hidrosoluble, con una estructura química muy similar al midazolam, y que se comporta como un antagonista competitivo a nivel del receptor benzodiazepínico (especialmente el receptor BZ2 o W2 a nivel del $GABA_A$). Su eficacia está determinada por la dosis [1-3].

La administración de flumazenilo puede acompañarse, en menos del 1% de los casos, de efectos adversos de tipo gastrointestinal (hipo, náuseas, vómito), cardiovascular (arritmias ventriculares, bloqueos de conducción, hipo o hipertensión, dolor torácico), neurológico (cefalea, parestesias, opistótonos, convulsiones) o psiquiátrico (ansiedad, confusión, alteraciones cognitivas y ataques de pánico) [1,2,6,7,9-12].

La capacidad del flumazenilo para precipitar convulsiones en animales intoxicados con antidepresivos tricíclicos ha sido claramente demostrada [8]. Spivey [9] revisó 43 casos de convulsiones asociadas, al menos temporalmente, con la administración intravenosa de flumazenilo, y esta complicación estuvo muy relacionada con la dosis del antídoto. Las convulsiones no se consideran un efecto tóxico directo del flumazenilo, sino que se atribuyen al efecto proconvulsivante de los antidepresivos tri-

cíclicos, que es potenciado con el uso del flumazenilo, ya que este antídoto revierte el efecto anticonvulsivante de las benzodiazepinas en el caso de sobredosis mixtas de benzodiazepinas y tricíclicos. En la citada revisión se constata que el 42% de los pacientes que convulsionaron tras la administración de flumazenilo, habían ingerido antidepresivos tricíclicos, y que esta complicación se asoció a la presencia de un ensanchamiento del QRS en el ECG; otros casos de convulsiones son atribuidos a un síndrome de abstinencia a las benzodiazepinas inducido por el flumazenilo. Haverkos [12] describe una paciente de 39 años con antecedentes de crisis convulsivas, que haber ingerido una mezcla de antidepresivos tricíclicos y benzodiazepinas, y que presentó un *status* epiléptico después de la administración de flumazenilo. Mintzer et al [13] también ha demostrado la capacidad del flumazenilo para desencadenar un síndrome de abstinencia en consumidores crónicos de benzodiazepinas. A pesar de esta conocida asociación entre el flumazenilo y las convulsiones, nunca debe perderse de vista que un intoxicado puede también convulsionar por otros motivos como la hipoxemia, el bajo gasto cardíaco, el traumatismo craneoencefálico asociado o un accidente vascular cerebral, y que estas causas han de ser también excluidas por criterios clínicos, gasométricos, hemodinámicos o con ayuda de las exploraciones complementarias adecuadas.

Ante un paciente que se sospecha que ha ingerido benzodiazepinas y antidepresivos tricíclicos, u otros tóxicos con riesgo de inducir convulsiones (como cocaína, litio, metilxantinas, isoniazida, propoxifeno, inhibidores de la monoaminoxidasa, bupropion o ciclosporina), se debe intentar evitar el uso de flumazenilo, o utilizarlo con algunas precauciones como corregir, en caso necesario, la hipoxia o la hipotensión antes de utilizar este antídoto, administrando siempre dosis progresivas que no superen los 0,25 mg por minuto. Debe evitarse su aplicación en pacientes epilépticos y en los consumidores adictivos de benzodiazepinas y, en cualquier caso, valorando siempre la relación riesgo/beneficio que puede obtenerse con el uso de este antídoto.

Bibliografía

- Weinbroum AA, Flaishon R, Sorkine P, Szold O, Rudick V (1997). A risk-benefit assessment of flumazenil in the management of benzodiazepine overdose. *Drug Saf* 17: 181-196.
- Wanke L (2003). Flumazenil. *Drugdex drug evaluations*. Micromedex healthcare series, volumen 117.
- Munné P (1996). Flumazenil. En: Munné P, Nogué S, Millá J. *Antídotos. ¿Cuándo y cómo utilizarlos?* Edicomplet, Barcelona, 53-58.
- Kulka PJ, Lauen PM (1992). Benzodiazepine antagonists. An update of their role in the emergency care of overdose patients. *Drug Saf*, 7:381-386.
- Gueye PN, Hoffman JR, Taboulet P, Vicaut E, Baud FJ (1996). Empiric use of flumazenil in comatose patients: limited applicability of criteria to define low risk. *Ann Emerg Med*, 27: 730-735.
- Mullins ME (1999). First-degree atrioventricular block in alprazolam overdose reversed by flumazenil. *J Pharm Pharmacol*, 51: 367-370.

7. Short TG, Maling T, Galletly DC (1988). Ventricular arrhythmia precipitated by flumazenil. *Br Med J*, 296: 1070-1071.
8. Lheureux P, Vranckx M, Ledeu D, Askenasi R (1992). Flumazenil in mixed benzodiazepine/tricyclic antidepressant overdose: a placebo-controlled study in the dog. *Am J Emerg Med*, 10: 184-188.
9. Spivey WH (1992). Flumazenil and seizures: analysis of 43 cases. *Clin Ther*, 14: 292-305.
10. Mordel A, Winkler E, Almog SH, Tirosh M, Ezra D (1992). Seizures after flumazenil administration in a case of combined benzodiazepine and tricyclic antidepressant overdose. *Crit Care Med*, 20: 1733-1734.
11. Bodenham AR (1989). Death after flumazenil. *Br Med J*, 299: 457.
12. Haverkos GP, DiSalvo RP, Imhoff TE (1994). Fatal seizures after flumazenil administration in a patient with mixed overdose. *Ann Pharmacother*, 28: 1347-1349.
13. Mintzer MZ, Stoller KB, Griffiths RR (1999). A controlled study of flumazenil-precipitated withdrawal in chronic low-dose benzodiazepine users. *Psychopharmacology*, 147: 200-209.

Tratamiento con fomepizol de una intoxicación aguda por metanol

Melo Trujillo¹ OL, Alonso Pérez² D, Zabalza Cerdeiriña² M, Nogué Xarau³ S, Grau Junyent² JM y Munné Mas³ P

¹Toxicología Clínica, Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia. ²Servicio de Medicina Interna. Hospital Clínic, Barcelona

³Área de Vigilancia Intensiva. Unidad de Toxicología Clínica. Hospital Clínic, Barcelona

Recibido 19 de Septiembre de 2003 / Aceptado 4 de Febrero de 2004

Resumen: La intoxicación por metanol puede causar alteraciones del equilibrio ácido-base, trastornos oculares y disfunción neurológica que pueden llevar a la muerte o a generar secuelas graves. El tratamiento específico consiste en la aplicación de antidotos que impidan que la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) metabolice el metanol; tradicionalmente se ha utilizado el alcohol etílico para este objetivo, pero recientemente se ha introducido el fomepizol, un fármaco capaz de inhibir la ADH. Se presenta el primer paciente tratado en España con este fármaco. Se trata de un hombre de 59 años con antecedentes de alcoholismo crónico, que ingresó en el Servicio de Urgencias por una alteración del estado de conciencia, y en el que se detectó una severa acidosis metabólica, manifestando en el interrogatorio la ingesta en las horas previas de unos 50 mL de "alcohol de quemar". La concentración de metanol en suero fue de 0,24 g/l. Se inició tratamiento con bicarbonato sódico y fomepizol a una dosis de 15 mg/kg, con buena tolerancia y sin reaparición de la acidosis. Se objetivó una disminución de la agudeza visual, aunque en el fondo de ojo inicial sólo se apreció una pequeña hemorragia en astilla parapapilar derecha compatible con una neuropatía de carácter tóxico, y que ha sido su única secuela.

Palabras clave: Metanol, 4-metilpirazol, fomepizol.

Abstract: Treatment of acute methanol poisoning with fomepizole. Methanol poisoning may cause metabolic acidosis, visual abnormalities and neurological dysfunction and may also result in severe sequelae or death. The treatment indicated is the administration of antidotes which inhibit the metabolism of the methanol by the alcohol dehydrogenase enzyme (ADH). Traditionally, ethyl alcohol has been used for this purpose, but recently, fomepizole, an inhibitor of alcohol dehydrogenase, has been introduced. We report on the first patient treated with this antidote in Spain. A 59-year-old man with a history of chronic alcoholism was admitted to the Emergency Department due to altered consciousness. Severe metabolic acidosis was detected and the patient admitted having consumed some 50 mL of rubbing alcohol. The serum methanol concentration was 0,24 g/l. Treatment was begun with sodium bicarbonate and fomepizole at a dose of 15 mg/kg, which was well-tolerated with no reappearance of acidosis. Reduced visual acuity and a small haemorrhage in the right optic papilla were observed, both of which were compatible with a toxic neuropathy.

arance of acidosis. Reduced visual acuity and a small haemorrhage in the right optic papilla were observed, both of which were compatible with a toxic neuropathy.

Key words: Methanol, 4-methylpyrazole, fomepizole.

Introducción

La intoxicación por metanol puede causar alteraciones del equilibrio ácido-base y disfunción neurológica, que puede conducir a la muerte o dejar secuelas graves como una ceguera o un síndrome de Parkinson [1, 2]. El metanol en sí, es poco tóxico, pero su metabolización a través de la alcohol deshidrogenasa, lleva a la formación de formaldehído y ácido fórmico, que son metabolitos muy tóxicos. El diagnóstico de esta intoxicación puede ser difícil y requiere de un alto índice de sospecha. El tratamiento se basa en la corrección de la acidosis metabólica con bicarbonato sódico, la aplicación de ácido fólico como protector de la toxicidad ocular y, en algunos casos, la hemodiálisis como método de depuración extrarrenal. La terapéutica más específica es la administración de antidotos que inhiban o saturan la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH); tradicionalmente se ha utilizado el alcohol etílico para este fin, pero recientemente se ha introducido el fomepizol [3], un fármaco capaz de bloquear la ADH e impedir la generación de formaldehído y ácido fórmico. Las referencias bibliográficas relacionadas con el tratamiento con fomepizol de la intoxicación por metanol o etilenglicol, son muy escasas y ninguna de España [4-11], por lo que hemos creído de interés la presentación de este caso.

Caso clínico

Un hombre de 59 años fue remitido al Servicio de Urgencias de otro hospital, tras haber sido encontrado somnoliento en la vía pública. Refería como antecedentes un glaucoma de ángulo abierto en ojo derecho, alcoholismo de 30 años de evolución (130 g/día) y tabaquismo (1 paquete cigarrillos /día). Las constantes clínicas a su ingreso mostraban una presión arterial de 167/85 mmHg, frecuencia cardiaca de 79 por min y frecuencia respiratoria de 36 por min. A la exploración física ofrecía un aspecto descuidado, con signos de deshidratación y somnolencia (14 puntos en la escala de Glasgow); la auscultación cardiorrespiratoria fue normal, así como la palpación abdominal. Se practicaron unos análisis generales cuyo resultado más destacable fue la presencia de una acidosis metabólica (pH 7.06, bicarbo-

Correspondencia: Dr. Santiago Nogué. Área de Vigilancia Intensiva. Hospital Clínic. Calle Villarroel 170. 08036 Barcelona. E-mail: snogue@clinic.ub.es. Fax: 93-2275693.

nato 9 mmol/l y exceso de base -21). Se decidió el traslado del paciente a nuestro Hospital donde ingresó con regular estado general, afebril y con una saturación de oxígeno de la hemoglobina del 98%. El examen físico no mostraba otros hallazgos patológicos, salvo la somnolencia y las pupilas midriáticas e hiporreactivas. En los controles analíticos destacó un hemograma normal pero con un leve aumento del VCM (104.9 fl), glucosa 173 mg/dl, sodio 137 mEq/L, potasio 4,58 mEq/L, y persistente acidosis metabólica con ácido láctico normal (15 mg/dL) (Tabla 1). Se indicó la administración intravenosa de bicarbonato sódico (250 mEq) y terapia multivitamínica.

A las 10 horas del ingreso el paciente fue reinterrogado y refirió que 36 horas antes, había bebido unos 50 mL de “alcohol de quemar” disuelto en agua, con el objetivo de beber alcohol, y que posteriormente a la ingesta presentó varios episodios de vómito y que a las pocas horas notó una disminución de la agudeza visual en ambos ojos, astenia y somnolencia. Se tomó una muestra de sangre y se solicitó la concentración de metanol que fue de 0,24 g/l. El anion gap estaba aumentado y el ácido láctico persistía normal (Tabla 1), por lo que se decidió iniciar terapia antidótica con fomepizol a una dosis de 15 mg/kg, en una infusión de 1 hora; el control de metanol a las 12 horas fue de 0,1 g /l, por lo cual se administró una nueva dosis de fomepizol (10mg/kg) siguiendo el protocolo vigente en nuestro Hospital; el control analítico de metanol 12 horas más tarde fue negativo. Desde ese momento no volvió a precisar más aporte de bicarbonato, al tiempo que se normalizaba el anion gap y se reducía la concentración de ácido láctico. Se realizaron controles analíticos incluyendo pruebas de función hepática, pancreática, renal, glucosa y hemograma, con resultados normales excepto una fosfatasa alcalina de 301 U/L y una gamma GT de 102 U/L atribuibles a su alcoholismo crónico. El paciente aquejaba una gran reducción de agudeza visual en ambos ojos, que le impedía leer, aunque en el fondo de ojo inicial sólo se apreció una pequeña hemorragia en astilla parapapilar en ojo derecho, compatible con neuropatía de carácter tóxico, y que fue la única secuela de su intoxicación. No se objetivaron efectos adversos atribuibles al fomepizol. El paciente fue dado de alta al cabo de una semana, y ha sido seguido ambulatoriamente a los 6 meses, persistiendo la pérdida de la agudeza visual.

Discusión

El alcohol metílico o metanol, es una sustancia que se encuentra en algunos productos domésticos como el alcohol de quemar, limpiacristales, disolventes y otros productos comerciales. Casi todos los casos de intoxicaciones por metanol se dan en alcoholó-

licos privados de su bebida habitual, ingestas suicidas o consumo accidental en niños. Como es una sustancia más económica que el etanol, se ha utilizado para adulterar bebidas alcohólicas [7, 10]. Las manifestaciones clínicas son generalmente de inicio tardío, entre 12 y 24 horas después de la exposición, y relacionadas con la producción de formaldehído y sobre todo de ácido fórmico, a través de la acción de la alcohol deshidrogenasa, que es el principal responsable de la neurotoxicidad, de la acidosis metabólica y del aumento del anion gap [1, 5, 7, 10]. El diagnóstico de la intoxicación por metanol se realiza a través de la anamnesis, de los hallazgos clínicos como síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos y dolor abdominal), hiperventilación, alteración del estado de conciencia y trastornos visuales; la evolución puede ser hacia el coma profundo con convulsiones y depresión respiratoria [1, 2, 10]. La presentación de estos signos y síntomas, asociados a una acidosis metabólica con aumento del anion gap, es altamente sugestivo del diagnóstico, que se debe confirmar con la determinación de metanol o de ácido fórmico.

La terapia antidótica se reserva para casos que presentan concentraciones de metanol superiores a 0.2 g/L [4, 7, 10]. El objetivo de esta terapia es bloquear la capacidad metabólica de la alcohol deshidrogenasa. Una opción es la impregnación con alcohol etílico, que es 20 veces más afin por esta enzima que por el metanol, siempre y cuando se alcance una concentración de etanol en plasma superior a 1 g/L [1, 2]; si se elige este tratamiento, hay que verificar regularmente los niveles de etanol en sangre (no sobrepasar 1,5 g/L), controlar la glicemia por el riesgo de hipoglicemia asociada a la administración del etanol y tener en cuenta que en pacientes alcohólicos que estén en tratamiento con disulfiram, la administración de etanol les desencadenará un síndrome acetaldehídico.

La otra opción antidótica es el 4-metilpirazol (fomepizol), un inhibidor competitivo de la ADH, que ha sido aprobado recientemente por la FDA como tratamiento de la intoxicación por metanol [4, 10, 11] y etilenglicol [12, 13]. Aunque no se ha demostrado una mayor eficacia del fomepizol con respecto al etanol, sus ventajas potenciales son múltiples: el fomepizol tiene un efecto inhibitorio muy potente sobre la ADH, y su metabolización y eliminación son lentos, por lo que esta mayor duración de la acción, simplifica su administración y la vigilancia del tratamiento, particularmente cuando se combina con la hemodiálisis. Su dosificación es sencilla y no necesita un control analítico. El uso del fomepizol evita los efectos tóxicos del etanol, es bien tolerado en sujetos sanos [14], no produce hipoglicemia, no altera el estado de conciencia y no induce síndrome acetaldehí-

Tabla 1. Evolución de los parámetros analíticos durante las primeras 32 horas.

HORAS	pH	BICARBONATO mmol/L	ANION GAP mEq/L	LACTATO mg/dL	METANOL g/L
Ingreso	7.06	9	No medido	No medido	No medido
+ 4	7.17	12.2	No medido	15	No medido
+ 14	7.44	22	34	16	0,24
+ 26	7.40	26,6	15,3	No medido	0,10
+ 32	7.36	24,9	16,6	10	IST*

* Inferior a la sensibilidad de la técnica.

dico si el paciente estaba bajo tratamiento con disulfiram. El tratamiento con fomepizol se recomienda para pacientes con concentraciones de metanol por encima de 0,2 g/L o cuando hay una alta sospecha de intoxicación asociada a por lo menos dos de los siguientes hallazgos: pH arterial < 7,3, bicarbonato sérico < 20 mmol/l, anion gap > 16 mEq/L u osmol gap > 10 mOsm/kg H₂O [6, 10]. El fomepizol se administra por vía intravenosa a una dosis inicial de 15 mg/kg y adicionales de 10 mg/kg cada 12 horas durante 48 horas o hasta que la concentración de metanol es < 0,1 g/L. El mayor inconveniente del fomepizol es su coste, que queda parcialmente compensado al evitar el uso del etanol y por tanto la necesidad de sus controles, y también porque puede hacer innecesaria la indicación de la hemodiálisis.

La hemodiálisis es una importante herramienta terapéutica en esta intoxicación, que permite depurar el metanol y sus metabolitos tóxicos. Su indicación se basa en una combinación de criterios clínicos (alteraciones neurológicas u oculares) y analíticos (concentración de metanol en sangre y anion-gap). No hay duda de que en el caso presentado, un diagnóstico más precoz de intoxicación por metanol hubiese puesto en marcha esta técnica extractiva, contribuyendo así a una reducción de las secuelas oculares. También se aconseja el tratamiento temprano con ácido fólico que, experimentalmente, se ha demostrado que reduce las lesiones oculares.

La intoxicación por metanol está presente en nuestro medio y debe ser sospechada ante toda acidosis metabólica de causa no definida, especialmente si cursa con anion gap u osmol gap aumentados. El fomepizol representa una nueva opción terapéutica frente al etanol, para impedir que la ADH genere metabolitos tóxicos. El fomepizol es un medicamento seguro y eficaz, pero de coste muy elevado.

Bibliografía

1. Kruse JA (1992). Methanol poisoning. *Intensive Care Medicine*, 18:391-397.
2. Liu JJ, Daya MR, Mann NC (1999). Methanol-related deaths in Ontario. *J Toxicol Clin Toxicol*, 37:69-73.
3. Jacobsen D, McMartin K (1996). 4-Methylpyrazole. Present status. *J Toxicol Clin Toxicol*, 34:379-381.
4. Burns MJ, Graudins A, Aaron CK, McMartin K, Brent J (1997). Treatment of methanol poisoning with intravenous 4-methylpyrazole. *Ann Emerg Med*, 30:829-832.
5. Girault C, Tamion F, Moritz F, Callonnet F, Droy JM, Bonmarchand G, Leroy J (1999). Fomepizol (4-Methylpyrazole) in fatal methanol poisoning with early CT scan cerebral lesions. *J Toxicol Clin Toxicol*, 37:777-780.
6. Brent J, McMartin K, Phillips S, Aaron C, Kulig K (2001). Fomepizole for the treatment of methanol poisoning. *N Eng J Med*, 344:424-429.
7. Brown MJ, Shannon MW, Woolf A, Boyer EW (2001). Childhood methanol ingestion treated with fomepizole and hemodialysis. *Pediatrics*, 108:4/e77
8. Bekka R, Borron SW, Astier A, Sandouk P, Bismuth C, Baud FJ (2001). Treatment of methanol and isopropanol poisoning with intravenous fomepizole. *J Toxicol Clin Toxicol*, 39:59-67.
9. Hantson P, Wallemacq P, Brau M, Vanbinst R, Haufroid V, Mahieu P (1999). Two cases of acute methanol poisoning partially treated by oral 4-methylpyrazole. *Intensive Care Med*. 25:528-531.
10. Barceloux DG, Bond GR, Krenzelok EP, Cooper H, Vale JA (2002). American academy of clinical toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*, 40: 415-446.
11. Mégabarne B, Borron SW, Trout H, Hantson P, Jaeger A, Krencher E, Bismuth C, Baud FJ (2001). Treatment of acute methanol poisoning with fomepizole. *Intensive Care Med*, 27:1370-1378.
12. Dawidek-Pietryka K, Szczepaniak S, Dudka J, Mazur M (1998). In vitro studies of human alcohol dehydrogenase inhibition in the process of methanol and ethylene glycol oxidation. *Arch Toxicol*, 72:604-607.
13. Sivilotti MLA, Burns MJ, McMartin KE, Brent J (2000). Toxicokinetics of ethylene glycol during fomepizole therapy: implications for management. *Ann Emerg Med*, 36:1-15
14. Sarkola T, Eriksson CJ (2001). Effect of 4-methylpyrazole on endogenous plasma ethanol and methanol levels in humans. *Alcohol Clin Exp Res* 25:513-516.

Genómica, proteómica y citómica: Nuevas herramientas en el desarrollo de medicamentos

II JORNADA DE LA RED ESPAÑOLA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

El 1 de Marzo de 2004 se ha celebrado bajo la Presidencia de Honor S.M. La Reina de España, en el Centro de Ciencias Medioambientales -CSIC en Madrid la II Jornada de la Red Española de Métodos Alternativos (REMA, <http://www.remanet.net>) con el sugerente título de “*Genómica, proteómica y citómica: Nuevas herramientas en el desarrollo de medicamentos*”. Fue organizada por la Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal junto a los Ministerios de Sanidad y Consumo, Agricultura, Pesca y Alimentación y Ciencia y Tecnología en colaboración con diversas entidades entre las que figuran AETOX, Farmaindustria, CCMA-CSIC, CISA-INIA, SESA, SEMA, SBC, SECAL, SEEA y AEFI.

En la **inauguración** César Fernández Quintanilla, Director del Centro de Ciencias Medioambientales, mostró la satisfacción de su centro por acoger el encuentro que había despertado gran expectación, y al que asistieron más de un centenar de personas.

Fernando García Alonso, Director General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo, indicó que la responsabilidad de la aprobación de nuevos medicamentos en la Unión Europea es una tarea compartida entre la Agencia Europea del Medicamento y las Agencias Nacionales. Manifestó que las agencias tienen la responsabilidad de proteger la salud y por ello son conservadoras, insistiendo en la necesidad de que los procedimientos de evaluación estén incluidos en el “guión”, es decir, en las normativas. Sin embargo es necesario el desarrollo de procedimientos más predictivos y que precisen de menos animales.

Pilar León, de la Subdirección General de Explotaciones Ganaderas del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, responsable del bienestar animal y del empleo de animales de experimentación, indicó que se están realizando grandes esfuerzos y potenciando la difusión y el conocimiento entre los investigadores de la filosofía de las tres Rs. La presente legislación europea sobre protección animal está siendo revisada.

Emili Esteve, de Farmaindustria, insistió en que la evaluación toxicológica para el registro de medicamentos está muy reglamentada, y ha sido actualizada en 2003. Aseguró que los métodos alternativos serán empleados si resultan atractivos, es decir, que estén aceptados por la legislación y supongan ventajas de costo, facilidad de realización y reducción en el empleo de animales.

Argelia Castaño, Presidenta de REMA y miembro del Comité Científico asesor de ECVAM, explicó que REMA pretende integrar los intereses de la Administración, la Industria, la Sociedad y el Mundo Científico para favorecer el desarrollo y uso de métodos alternativos a la experimentación animal. Ello es particularmente importante en la evaluación de compuestos químicos, medicamentos y cosméticos, siendo necesario aplicar las mejores tecnologías disponibles.

— — —
La **Primera Sesión** fue moderada por M^a Luisa Abad (MS y C) y Nuria Basi (REMA).

Helma Hermans, Secretaria de la In Vitro Testing Industrial Platform (IVTIP, <http://www.ivtip.org>), explicó que su organización es un foro informal de 26 compañías europeas de compuestos químicos, medicamentos, cosméticos, y servicios. Entre sus objetivos se encuentra asesorar a los organismos de la Unión Europea, optimizar el valor de proyectos europeos e incentivar la transferencia de tecnologías y el desarrollo y uso de alternativas a la experimentación animal.

Joan Albert Vericat, de NeuroPharma, S.A., profundizó en el empleo de la Toxicogenómica exponiendo diversos casos concretos que muestran la gran productividad y utilidad de la tecnología. La técnica es robusta, muy rápida, con poca variabilidad para señales altas, permite integrar los datos y aproximarse a los mecanismos de toxicidad, descubriendo los genes claves alterados y buscar explicaciones a los fenómenos. Sin embargo es preciso profundizar en la variabilidad existente entre los diversos modelos, es crucial emplear dosis y períodos de exposición realistas perfectamente controlados y desarrollar bases de datos comunes que permitan aprovechar la información que actualmente se está obteniendo.

— — —
La **Segunda Sesión** fue moderada por Pilar León, del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, y Argelia Castaño (REMA).

Raffaella Corvi, del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos, insistió acerca de “*Métodos Alternativos: Previsiones de ECVAM*”. Su centro se ha reorganizado ante las exigencias de la nueva política europea sobre compuestos químicos (REACH) y de la séptima enmienda de la directiva de cosméticos. Ambas legislaciones coinciden en la

obligación de emplear al máximo los métodos *in vitro*. La toxicogenómica supone la segunda generación de métodos alternativos por la revolución que suponen al proporcionar un gran volumen de información.

Enrique O'Connor, del Centro de Citometría y Citómica del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia se centró en la "*Citómica en el estudio de nuevos fármacos*". La citómica o citometría de sistemas celulares complejos (citoma) estudia el fenotipo molecular de cada célula individual mediante citometría de flujo o microscopía confocal y de barrido láser. Entre las aplicaciones automatizadas más interesantes destacan la detección de receptores extra e intracelulares y su activación, los sistemas de transporte y metabolismo, los efectos intracelulares y las alteraciones metabólicas y muerte celular

— — —

La **Tercera Sesión** fue moderada por Elina Valcarce (MS y C) y Eduardo de la Peña (REMA).

Antonio Martínez, de PROGENIKA Biopharma S.A., se centró en "Aplicaciones de la genómica para la identificación de nuevas dianas terapéuticas en cáncer y enfermedades neurodegenerativas". La genómica funcional trata de averiguar cuales son los genes que responden ante estímulos externos y su relación con las vías desencadenadoras de fenómenos patológicos. Utilizando plataformas de expresión génica de unos 50000 genes, se identifican los genes de interés, se validan las dianas a nivel molecular, celular y animal, y se realiza el cribado químico y ensayos con animales. La información generada permite evaluar la predisposición genética a padecer una determinada enfermedad, el desarrollo de sistemas de diagnóstico precoz, el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces, la optimización de ensayos clínicos y la personalización de los tratamientos farmacológicos.

Fernando Corrales, del Dpto. de Medicina Interna de la Universidad de Navarra, "*Proteómica: traducción de genomas en funciones celulares*" remarcó que la proteómica trata de unir los conocimientos generados en la secuenciación génica con la utilidad de las 30000 proteínas del ser humano. Aunque el nivel de automatización no es tan alto como los procedimientos de genómica, permite identificar la modificación de las cascadas de señales en respuesta a un determinado fármaco e identificar nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas.

Enrique Santamaría, también del Dpto de Medicina Interna de la Universidad de Navarra, expuso la "*Detección de marcadores precoces de esteatohepatitis mediante proteómica funcional*". Se ha estudiado el proteoma hepático en ratones deficientes en la síntesis de S-adenosilmetionina, que causa esteatohepatitis no alcohólica y hepatocarcinoma. Tras detectar cambios en la expresión de 117 proteínas, se observó que 12 se presentaban desde el nacimiento, y que 4 de ellas se asociaban a alteraciones mitocondriales básicas. La

prohibitina fue identificada como una diana primaria, que también se encuentra alterada en pacientes obesos.

La **Mesa Redonda** fue moderada por Francisco Ferrándiz y Eugenio Vilanova (REMA). José Vicente Castell, del Hospital La Fe de Valencia, presentó "*Predictomics*". Se trata de un proyecto de investigación financiado por la Unión Europea para tratar de predecir la toxicidad crónica empleando plataformas de genómica, proteómica y citómica para diferenciar los cambios tóxicos directos, de los defensivos, los adaptativos y los epifenómenos.

J. Félix Olalla, de la Agencia Española de Medicamento, insistió en la necesidad de la inclusión de los procedimientos en la legislación, y sobre todo de realizar evaluaciones usando aproximaciones caso por caso basándose en la información disponible y valorando la relevancia de los procedimientos empleados.

Domingo Gargallo, de Glaxo SmithKline, manifestó que las empresas farmacéuticas son las más interesadas en que los procedimientos novedosos sean aplicables no sólo en las fases de desarrollo de medicamentos, que son las que actualmente demandan un mayor uso de animales, sino también en las de evaluación.

Joan Albert Vericat, de Neuropharma SA, insistió en que las empresas farmacéuticas están volcadas en forma proporcional a su tamaño en el empleo de las diferentes "ómicas" ya que están convencidas de su gran utilidad.

Mariana Sáenz de Galdeano, de la Asociación Nacional de Defensa de los Animales, indicó que su organización participa a través de Eurogrupo en la actualización de las normativas de protección y experimentación animal. Es necesaria la fiabilidad en la evaluación de la seguridad de los compuestos químicos por lo que hay que desarrollar procedimientos alternativos al uso de animales que puedan incorporarse a ese proceso cuando sean suficientemente predictivos.

Adela López de Cerain, representante de REMA, recordó que esta asociación se había constituido como una red nacional cuyo principal objetivo era integrar los intereses de la administración, la industria (farmacéutica y química), el mundo científico/académico y la sociedad. Por lo tanto los aspectos de regulación y registro que competen a la administración tienen perfecta cabida en REMA. Reconoció que, como había quedado patente en la Jornada, los modelos animales siguen siendo imprescindibles en la investigación, entre otras cosas para validar las dianas moleculares identificadas por las modernas técnicas "ómicas". En este sentido recordó que una de las tres Rs es el refinamiento, es decir el perfeccionamiento de los experimentos con animales atendiendo a los principios éticos, si bien a veces se identifican los métodos alternativos como métodos exclusivamente *in vitro*.

Finalmente Eugenio Vilanova dio por terminada la jornada agradeciendo la participación a todos los asistentes.

Jornada AETOX-SESA sobre Toxicología ambiental: Seguridad química

Las jornadas sobre Toxicología Ambiental: Seguridad Química fueron organizadas por la Dirección General de Salud Pública de la Consejería de Sanidad de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM), Asociación Española de Toxicología (AETOX) y Sociedad Española de Sanidad Ambiental (SESA). Se celebraron los días 22-25 de marzo de 2004 en el Centro de Enseñanza Medio Ambiental de la Caja de Ahorros del Mediterráneo (CEMACAM), centro situado en la urbanización Torre Guil de Sangonera La Verde (Murcia). Las Jornadas fueron inauguradas por el Subdirector General de Sanidad Ambiental del Ministerio de Sanidad y Consumo (D. Francisco Marqués Marqués); Dña. Elisa Gómez Campoy que ostentaba la representación de la Dirección General de Sanidad de la CARM y codirectora de las Jornadas; el Presidente de la AETOX (D. Eduardo de la Peña de Torres) y codirector de la Jornada; el Presidente de la SESA (D. José V. Martí Boscà) y el Director del CEMACAM - Torre Guil (D. Antonio Gómez Plaza).

Las jornadas se desarrollaron con la siguiente estructura y organización:

1. *Presentación de ponencias de los siguientes temas:*

1.1) Introducción a la Evaluación del Riesgo de las Sustancias Químicas (Dres. Eduardo de la Peña de Torres / Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC, y Elisa Gómez Campoy / Servicio de Sanidad Ambiental de la CARM). En esta ponencia se expuso una breve introducción acerca del control del riesgo químico en referencia a la legislación vigente e información sobre seguridad (fichas de datos de seguridad y etiquetas y pictogramas).

1.2) Aspectos legislativos de las Sustancias y Productos Químicos (Dr. Francisco Marqués Marqués / Subdirección de Sanidad Ambiental y Salud Laboral del Ministerio de Sanidad y Consumo). En esta sesión se abordaron principalmente los aspectos legislativos de sustancias químicas y preparados en cuanto a la clasificación y etiquetado, evaluación del riesgo y su puesta en el mercado.

1.3) Evaluación Físico-Química de las Sustancias Químicas (D. Juan Ignacio Sánchez Gelabert / Sanidad Ambiental de la DGSP/CARM). En esta presentación se

resaltó la importancia de los estudios de las propiedades físico-químicas de las sustancias y preparados químicos para su caracterización en cuanto a su peligrosidad, almacenamiento, manipulación y su posible impacto medioambiental

1.4) Evaluación Toxicológica (Dra. Isabel M^a Moreno Navarro/ Universidad de Sevilla). Se centró principalmente en los distintos ensayos llevados a cabo en animales y plantas con el fin de evaluar la toxicidad de las sustancias químicas y su mecanismo de acción antes de su comercialización.

1.5) Evaluación de la Mutagenicidad (D. Oscar Herrero Felipe / CCMA-CSIC). En esta ponencia se expusieron los distintos ensayos que actualmente se realizan para evaluar la mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad de las distintas sustancias químicas.

1.6) Evaluación de Toxicidad para la Reproducción (Dr. Guillermo Repetto Kuhn / Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses / Universidad de Sevilla). Esta sesión se centró en la evaluación toxicológica sobre la reproducción, la disrupción endocrina y los métodos alternativos a la experimentación animal.

1.7) Introducción Medioambiental (Dra. Ana de la Torre Reoyo (CISA/INIA). Se abordó principalmente la estimación del riesgo de las sustancias químicas sobre el medio ambiente tras su aplicación o emisión.

1.8) Introducción de la Historia de Murcia (Dr. Gonzalo Matilla Seiquer / Universidad de Murcia). En un ambiente más distendido y con el fin de acercarnos a la historia de Murcia, se nos presentó la región en la etapa del Imperio Romano.

1.9) Búsqueda de Datos Toxicológicos (Dr. Guillermo Repetto). Nos ofrecieron un listado de las bases de datos "on line" y en "cd rom" con el fin de localizar de una manera rápida y fiable la información toxicológica útil.

1.10) Salud Laboral (Dr. Juan Francisco Periago / Instituto de Seguridad y Salud Laboral). La visita al Instituto de Seguridad y Salud Laboral de la Región de Murcia nos acercó a las actividades que se desarrollan en dicha entidad dedicadas a la investigación de los agentes químicos y/o físicos medioambientales potenciales de causar patologías laborales.

1.11) Realización de Fichas de Datos de Seguridad Química (Dra. María Tarancón / Servicio de Salud de Andalucía / Sevilla).

1.12) Seguimiento de Exposición Ocupacional a Plaguicidas en Almería (Dres. Tesifón Parrón Carreño y José Luis Serrano. Servicio de Salud de Andalucía / Almería). De forma muy didáctica se nos presentó un programa de vigilancia epidemiológica de los efectos agudos en la salud del uso de sustancias plaguicidas puesto en marcha en Andalucía.

2. Ejemplo práctico de búsqueda de datos en cd rom y bases de datos en línea o Internet, bajo la supervisión de G. Repetto; J.I. Sánchez Gelabert; A. de la Torre; I. Moreno; Antonio Juan García Fernández; O. Herrero; M. Tarancón; José Jesús Guillén, O. Herrero, J.V. Martí, E. Gómez Campoy y E. de la Peña). Esta sesión práctica nos permitió elaborar fichas de datos de seguridad con el apoyo de la información toxicológica obtenida "on line" y/o de bases de datos en "CD rom" presentadas anteriormente.

3. Visita al Instituto de Seguridad y Salud Laboral (Dr. J.Fco. Periago) y a la Depuradora de la Granja Experimental de la Universidad de Murcia, Campus de Espinardo (Dr. Antonio Muñoz). La visita a la Universidad de Murcia tuvo como objeto conocer una innovadora planta de depuración de purines que cumple en su totalidad la legislación vigente.

4. Tres Mesas Redondas sobre a) Aspectos Ecotoxicológicos. Repercusión Ambiental (Dres. A. de la Torre, A.J. García e I.M^a. Moreno); b) Aspectos Toxicológicos: Repercusión Sanitaria Realización (Dres. E. Gómez Campoy, J.V. Martí, J.J. Guillén y E. de la Peña); y c) Mesa Coloquio sobre el curso donde participaron la totalidad de los ponentes y asistentes presentes.

Estas jornadas se desarrollaron durante 26 horas desde la tarde del 22 hasta el medio día del 25 de marzo; se clausuraron con la entrega de diplomas a los 28 asistentes procedentes de diferentes departamentos o servicios de Sanidad Ambiental de las diferentes CCAA (Andalucía, Extremadura, Cataluña, Islas Baleares, Castilla-La Mancha; Castilla-León; La Rioja; Madrid, Murcia, Navarra, País Vasco, Región Valenciana); así como representantes del Ministerio de Sanidad y Consumo, de las Uni-

versidades de Alcalá de Henares, Almería, Miguel Hernández, Navarra, Murcia y Sevilla), organismos de Investigación y Control, Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Instituto de Salud Carlos III, CISA-INIA, representantes de la Industria, miembros de la Dirección Gral. de Industria y de la Dirección Gral. de Salud de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, y del Centro e Ciencias Medioambientales del CSIC.

CONCLUSIONES

El curso de Toxicología Ambiental de Seguridad Química ha conseguido formar a los participantes acerca de: a) Legislación existente sobre sustancias y productos químicos; b) Pruebas físico-químicas, toxicológicas y ecotoxicológicas para la evaluación de las sustancias y productos químicos; c) búsqueda de datos físico-químicos, toxicológicos y ecotoxicológicos tanto en las bases de datos en cd rom como en Internet; d) correcta elaboración de fichas de datos de seguridad química de las sustancias.

Desde nuestro punto de vista, las Jornadas consiguieron la interconexión entre las distintas disciplinas relacionadas con la Toxicología y Seguridad Química. Se han entablado excelentes relaciones entre profesionales de distintas áreas, lo que ha facilitado el intercambio de información y nuevas ideas. Tanto la organización como la alta calidad y elevado interés de las ponencias propiciaron un aprendizaje y acercamiento a la situación actual en la que se encuentra la caracterización de las sustancias químicas y la valoración de los riesgos derivados de ellas. Somos conscientes de la alta participación e interés suscitado por los distintos participantes de curso, además, debido a la gran demanda consideramos que se podrían organizar posteriores ediciones ya que contribuyen a ampliar la formación de profesionales dedicados a los distintos campos relacionados con la Toxicología y la Seguridad Química.

Encarna Quesada, Esther Sabater

División de Toxicología
Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández
Avda. de la Universidad s/n
03202 Elche, Alicante, España

PRÓXIMOS CONGRESOS

- 21-25 marzo 2004, Baltimore, USA
SOT 43rd Annual Meeting
Website: <http://www.toxicology.org/MemberServices/Meetings/am2004/index.html>
- 21- 24 abril 2004, Edimburgo, Gran Bretaña
British Toxicology Society annual Meeting
e-mail: clive.kind@astrazeneca.com
- 1-4 junio 2004, Strasbourg, Francia
XXIV EAPCCT Congress
Location: Strasbourg Convention Centre
- 7-9 julio 2004, Universidad S.E.K. de Segovia, España
XIII Reunión Científica de la SEMA
Organiza: Dr. Samuel González (smancebo@seksmail.com)
Campus de Santa Cruz la Real
C/ Cardenal Zuñiga nº 12, 40003, Segovia
Tel.: 921-412410 / Fax 921-445593
- 11-16 julio 2004, Tampere, Finlandia
ICT X 2004
Prof. Hanna Tähti, Medical School, FIN-33014 University of Tampere, Finland
Tel + 358 3 2156672 / Fax +358 3 2156170 / e-mail blhata@uta.fi
or ictx@tsgcongress.fi
- 29 agosto- 2 septiembre 2004, Vancouver BC, Canadá
7th International ISSX Meeting
e-mail: nholahan@issx.org
Website: <http://www.issx.org>
- 28 agosto-3 septiembre 2004, JW Marriott Hotel, Washington, DC. USA
FBI Laboratory Forensic Toxicology Symposium & Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) and The International Society of Forensic Toxicologists (TIAFT)
Website: <http://www.soft-tox.org>; <http://www.tiaft.org>
- 4-8 septiembre, 2004, Maastricht, Holanda
34th Annual Meeting of the EEMS
e-mail: erica.vandenoever@fd.unimaas.nl
Website: <http://www.unimaas.nl/congresbureau/EEMS2004/general.htm>
- 24 septiembre, 2004, Palma de Mallorca
VIII Jornadas Nacionales de Toxicología Clínica
e-mail: comtox@hsd.es
- 6-10 marzo 2005, New Orleans, Louisiana, USA
SOT 44rd Annual Meeting
Website: <http://www.toxicology.org/>
- Cáceres, Septiembre 2005
XVI Congreso Nacional de Toxicología
Website: <http://tox.umh.es/aetox/index.htm>



XVI CONGRESO NACIONAL DE TOXICOLOGÍA

Cáceres, 28 al 30 de Septiembre de 2004

LUGAR DE CELEBRACIÓN:

Complejo Cultural San Francisco

de la Institución Cultural El Brocense
de la Excm. Diputación Provincial de Cáceres

COMITÉ ORGANIZADOR:

PRESIDENTE: Francisco Soler Rodríguez

SECRETARÍA: M^a del Prado Míguez Santiyán y Marcos Pérez López

VOCALES: Pura Matas Cascos, Guillermina Font Pérez,
Jesús Pablo García Cambero y Ana Lourdes Oropesa Jiménez

CORREO DE CONTACTO: cctox2005@unex.es

PÁGINA WEB : <http://www.unex.es/toxicologia>

Constitución del Comité Español de IUTOX

En la Subdirección General de Relaciones Internacionales del Ministerio de Ciencia y Tecnología, tuvo lugar el pasado día 29 de Marzo de 2004, la reunión para la constitución del Comité Español de IUTOX (Internacional Union Toxicology), aprobada por la Comisión Permanente de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, bajo la presidencia de su subdirector, D. Esteban Manrique Reol, quedando constituido dicho Comité por los siguientes miembros:

- D. EDUARDO DE LA PEÑA DE TORRES
Presidente del Comité Español de IUTOX y de la Asociación Española de Toxicología (AETOX)
- D^a PILAR GASCÓ ALBERICH
Secretaria del Comité Español de IUTOX y miembro de la Junta Directiva, de la Asociación Española de Toxicología
- D. MANUEL SANCHO RUIZ
Director del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses
- D. EUGENIO VILANOVA GISBERT
Catedrático de Toxicología, Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante)
- D^a ARGELIA CASTAÑO CALVO
Presidenta de la Red Española de Métodos Alternativos (REMA)
- D^a ANGELES YUSTE MARTÍNEZ
Representante del Ministerio de Ciencia y Tecnología

Instrucciones a los autores

Los MANUSCRITOS se enviarán por triplicado, escritos claramente y a doble espacio, con márgenes amplios, por una sola cara y en hojas DIN A4. Tanto la forma como el contenido deberán ser cuidadosamente revisados para evitar correcciones sobre las pruebas. Se indicará sobre el margen izquierdo la localización de tablas y figuras.

El TEXTO debe ser claro y conciso, cuidando la ortografía y la utilización de abreviaturas. Todas las páginas irán numeradas correlativamente, comenzando por la primera página o titular y siguiendo con el texto, bibliografía, tablas y pies de figuras.

Los ARTÍCULOS originales no deberían superar las cuatro páginas impresas u ocho en las revisiones incluyendo tablas y figuras (una página impresa equivale a unas tres páginas mecanografiadas). El precio de cada página adicional es de 60 €. Las COMUNICACIONES cortas y los CASOS clínicos no deben superar las dos páginas impresas incluyendo una o dos tablas o figuras y hasta 10 citas bibliográficas.

El editor someterá las copias a dos revisores externos a la revista cuyas observaciones se trasladarán al autor para la reescritura del original.

Presentación del manuscrito

En la PRIMERA PÁGINA deberá constar: título del artículo y hasta cinco palabras clave, ambos en inglés y castellano. Nombre completo del autor/es, institución donde se ha realizado el trabajo y dirección donde hay que enviar las pruebas. Para facilitar la comunicación se agradecería la inclusión de un número de teléfono, fax o e-mail.

RESUMEN: Será lo más informativo posible, y comprenderá una pequeña Introducción, un sucinto Material y Métodos, los Resultados abreviados y las Conclusiones del trabajo. Su lectura dará una idea clara del mismo, se acompañará de una versión en inglés (*Abstract*) y palabras clave (*Key words*). No debe sobrepasar las 30 líneas mecanografiadas y no debe incluir abreviaturas ni referencias.

La INTRODUCCIÓN describirá los orígenes y bases del estudio. Las revisiones y las comunicaciones cortas no necesitan introducción.

En la sección de MATERIAL Y MÉTODOS se evitarán descripciones de todo aquello que pueda encontrarse en la bibliografía citada. Deben describirse de forma concisa los individuos y series estudiados, criterios de selección, procedimientos, duración y número de repeticiones de los ensayos, equipo y materiales utilizados y cuantos datos puedan precisarse para la repetición del estudio. Los métodos estadísticos deberán también describirse en esta sección. Para sustancias químicas o fármacos se citará el nombre genérico conforme a la IUPAC. Si se utiliza una marca registrada, se hará constar el nombre genérico y el nombre del fabricante.

La sección de RESULTADOS presentará sin interpretarlas, las observaciones realizadas, así como el análisis estadístico. Los datos numéricos se pueden presentar en tablas pero sin repetirlos entonces en el texto.

En la DISCUSIÓN se considerarán los resultados presentados comparándolos con otros publicados, las razones que apoyan la validez de los mismos, su aplicación práctica y las directrices para nuevas investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA: La exactitud de las referencias bibliográficas es responsabilidad del autor. Sólo deberían incluirse referencias relacionadas estrechamente con el trabajo y que el autor pueda verificar personalmente. Todas las referencias listadas deben ir citadas en el texto. Citas como "observaciones no publicadas" o "pendientes de publicación" deberían evitarse. Las referencias irán numeradas por orden de aparición en el texto y citadas numéricamente y entre corchetes. Por ejemplo: [1], [2-13]. Al final del texto la bibliografía irá citada de la siguiente manera:

a) artículos de revistas: apellidos e iniciales de todos los autores, año, título completo, revista en su abreviatura normalizada, número de volumen y primera y última página y utilizando los signos de puntuación como en el ejemplo.

7. de la Peña E, Herrera A, Barrueco C, Canga C (1988) Sistemas de activación metabólica. *Rev Toxicol* 6: 33-38.

b) libros: apellidos e iniciales de los autores, año de publicación, título completo del libro, editorial, lugar de publicación y nº de páginas o, si se trata de un capítulo, apellidos e iniciales de los autores, año de publicación, título del capítulo, en: editores del libro, título completo del libro, editorial, lugar de publicación y primera y última página:

21. de la Peña E, Burguete I, Guadaño A (1999) Evaluación Mutagénica y Genotóxica. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, MRCIA98. Madrid. pp. 398.

14. de la Peña E, Guadaño A, Repetto G (1999) Métodos alternativos y complementarios en experimentación animal. En: Pérez-García CC, Díez-Prieto I, García Partida P (cols) Introducción a la Experimentación y Protección Animal. León. Universidad de León. 215-223.

FIGURAS: Todas las figuras deberán ir numeradas consecutivamente y enviadas en hoja aparte. Las fotografías se enviarán en diapositiva o copia en positivo sobre papel brillante. Las figuras publicadas previamente deben ser enviadas con el permiso escrito del titular de los derechos. Las explicaciones de la figuras no deben repetirse en el texto y tienen que ser breves y claras. Notas como "ver texto" deben evitarse.

Formato: las ilustraciones se enviarán en el formato definitivo o indicando claramente el porcentaje de reducción que se desea. En cualquier caso hay que tener en cuenta las proporciones de la columna o página impresa.

Las inscripciones dentro de las figuras serán claras y aproximadamente de 2 a 3 mm de altura. Para la publicación de fotografías en color, el autor tendrá que sufragar los gastos, según presupuesto de la editorial.

Las TABLAS deberán presentarse en hojas aparte, una tabla por hoja, numeradas correlativamente con números arábigos y con una leyenda.

En resumen la ESTRUCTURA DE UN ARTÍCULO será la siguiente: *Título, title, firma, resumen, palabras clave, abstract, key words, texto, agradecimientos, bibliografía.*

La redacción de la revista se reserva el derecho de introducir modificaciones en los artículos recibidos, siempre que no alteren el sentido de los mismos, para adaptarlos a las normas de publicación.

Los trabajos (original y dos copias) se enviarán a la Editora de la Revista de Toxicología o como archivo pdf en un correo electrónico:

Dra Adela López de Cerain Salsamendi

C.I.F.A. Universidad de Navarra

C/ Irunlarrea, s/n. 31008 PAMPLONA

(Navarra) España.

Fax: 948/42 56 52. E-mail: rev.toxicol@unav.



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Rev. Toxicol. 21 (1) 1-50 2004

ISSN 0212-7113

<http://aetox.com>

INCLUIDA EN IBECs, ICYT, IME, EMBASE/*Excerpta Medica* y *Chemical Abstracts*

Asociación Española de Toxicología

Presidente: Dr. Eduardo de la Peña (epena@ccma.csic.es)
CSIC, Centro de Ciencias Medioambientales.

Secretaria: Dra. Victoria Carrera (aetox@umh.es)
Universidad Miguel Hernández
Edificio Vinalopó.
Avda. del Ferrocarril s/n
03202 Elche (Alicante).

Internet: <http://aetox.com>

Sección de Toxicología Clínica

Dra. Ana Ferrer (aferrer@msf.unizar.es)
Hospital Clínico de Zaragoza.

Dr. Santiago Nogué (nogue@medicina.ub.es)
Hospital Clínico y Provincial de Barcelona.
Internet: <http://ebro.unizar.es/aet>

Sección de Toxicología Ambiental

Dr. Eduardo de la Peña (epena@ccma.csic.es)
CCMA-CSIC. Madrid.

Dra. Pilar Gascó (p.gasco@mju.es)
Instituto de Toxicología. Madrid

Dra. Ana de la Torre (torre@inia.es)
Centro de Investigación de Sanidad Animal
INIA. Madrid.

Sección de Toxicología Forense

Dr. Juan Luis Valverde (biblio@bcn.inaltox.es)
Instituto de Toxicología. Barcelona.

Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos

Dr. Guillermo Repetto (repetto@us.es)
Instituto de Toxicología. Sevilla.
Internet: <http://aetox.com>

Revista de Toxicología (Editada desde 1983)

Editora: Dra. Adela López de Cerain
(acerain@unav.es)

CIFA. Universidad de Navarra
C/ Irunlarrea s/n. 31008. Pamplona

e-mail: rev.toxicol@unav.es
Internet: <http://aetox.com>