
Los procesos de biotransformación del tóxico

- Consideraciones generales.
- Reacciones implicadas en la Fase I.
- Reacciones implicadas en la Fase II.
- Factores biológicos y ambientales que influyen en la cinética de la biotransformación.
- Implicaciones derivadas de la biotransformación de un xenobiótico.

Consideraciones generales

El organismo humano recibe a diario, generalmente a través de su alimentación, una serie de sustancias químicas convencionales, algunas necesarias y otras no, a las que implica en sus procesos metabólicos con la ayuda de los diversos sistemas enzimáticos que posee. Esta forma de proceder también la sigue con todas aquellas estructuras extrañas o xenobióticas.

Se entiende como *biotransformación* el «conjunto de procesos que introducen cambios en las estructuras de los xenobióticos, con la finalidad de favorecer su eliminación». No se trata de simples modificaciones espontáneas, sino que responden a reacciones químicas de carácter muy diverso en las que intervienen distintos sistemas enzimáticos. Evidentemente, equivale al concepto de metabolismo del tóxico y se puede usar de modo indistinto uno u otro término.

Representa una parte muy importante dentro del fenómeno tóxico porque suele ser un factor determinante de lo que puede ser el efecto biológico final de un xenobiótico. En la práctica, abundan los ejemplos en los que el daño tóxico no es causado por la estructura primaria del xenobiótico, sino por algunos de sus metabolitos. En consecuencia la sangre circulante puede contener cinco formas químicas diferentes de xenobióticos: compuesto primario libre, compuesto primario enlazado a proteínas, compuesto bajo una forma activa, derivados inacti-

vados del compuesto, derivados bajo la forma adecuada para su excreción. Cuando predominan las dos últimas posibilidades se puede hablar de una desintoxicación, porque los procesos biotransformadores han conducido a formas moleculares aptas para su eliminación. En cambio, si los responsables de la actividad tóxica son los metabolitos hay que hablar de una biotoxicación. Esto se debe a que las reacciones han desarrollado en la estructura del xenobiótico una electrofilia, que le proporciona una gran reactividad frente a los puntos nucleofílicos de compuestos biológicos importantes.

Los sistemas enzimáticos responsables del proceso de biotransformación de los xenobióticos son los convencionales que intervienen en el metabolismo normal del organismo, aunque en las actuaciones sobre los xenobióticos se caracterizan por ser muy flexibles y poco específicos. En este sentido, hay que señalar cómo el cambio químico ocasionado por el organismo sobre la estructura de un xenobiótico puede ser el resultado de la intervención de distintas enzimas, o también una sola enzima puede estar implicada en la transformación de diferentes estructuras xenobióticas. Unas veces, las actividades ofrecidas por tales enzimas pueden corresponder a las propias de la dinámica bioquímica normal del organismo, mientras que en otras ocasiones son inducidas por los efectos de estímulos capaces de incrementar la concentración de la enzima en las correspondientes células.

En general, puede afirmarse que la biotransformación es un proceso que persigue la mejor eliminación del xenobiótico y evitar que pueda alcanzar, por acumulación, los niveles tóxicos correspondientes.

Cuando un xenobiótico penetra en un organismo pueden ocurrir tres posibilidades:

1. Puede ser eliminado directamente, sin que experimente transformación alguna, a través de algunas de las vías excretoras disponibles.
2. Puede sufrir una transformación estructural, que aumente su polaridad y le haga más hidrosoluble, facilitando de este modo su excreción.
3. Puede experimentar algún tipo de cambio estructural que provoque una modificación en su actividad tóxica: en unas ocasiones la reduce (destoxicación), mientras que en otras la incrementa (biotoxicación). En este último caso, la molécula primaria pasa de carecer de toxicidad a convertirse en un genuino agente tóxico.

Aunque el proceso de biotransformación está catalizado por los mismos sistemas enzimáticos que el organismo posee para realizar su metabolismo intermediario, sin embargo las intervenciones de cada uno de ellos va a depender de la estructura química en cuestión.

No cabe duda que los sistemas enzimáticos se encuentran ampliamente distribuidos por todo el organismo, pero es en el hígado donde se suelen localizar a concentraciones especialmente elevadas: el hígado no sólo es el órgano que recibe de entrada a todos los xenobióticos que han sido ingeridos, sino también el centro corporal metabolizador por excelencia.

Si bien se debe considerar al tejido hepático como el principal implicado en la metabolización de los xenobióticos, también estas reacciones enzimáticas pueden tener lugar en otros órganos, aunque con una importancia menor: riñón, pulmón o intestino. Incluso, en algunos casos puede ser relevante el papel desempeñado por la población microbiana del tracto intestinal, al ser responsable de algunos tipos de cambios: actividad de esterasas capaces de hidrolizar a los metabolitos conjugados, excretados por la bilis, o la actividad de las nitrato-reductasas que reducen los nitratos a nitritos. Por el contrario, tejidos como la piel o los músculos, apenas tienen significación.

La localización de estos sistemas enzimáticos suele ser subcelular, es decir, están ubicados en los diferentes compartimentos celulares. Unas enzimas se encuentran asociadas a las estructuras de las membranas y, por tanto, su situación viene a ser el retículo endoplásmico; otras, en cambio, son enzimas solubles y se emplazan en el citosol. Bastante menos importancia tienen aquellas enzimas que están localizadas en otros orgánulos celulares, tales como núcleo, mitocondrias o lisosomas.

Esta situación de los sistemas enzimáticos implicados en la biotransformación de una estructura xenobiótica puede tener importantes implicaciones toxicológicas. Así por ejemplo, el Cl₄C es hepatotóxico porque sus metabolitos activos son producidos por enzimas del tejido hepático. Incluso el lugar que ocupa el sistema enzimático dentro de un órgano puede conducir a una toxicidad que resulta selectiva para unas células de dicho órgano, mientras que para otras no.

Las diversas reacciones que pueden intervenir en el proceso global de la biotransformación se suelen reunir en dos tipos, tal como se indica en la Figura 4.1:

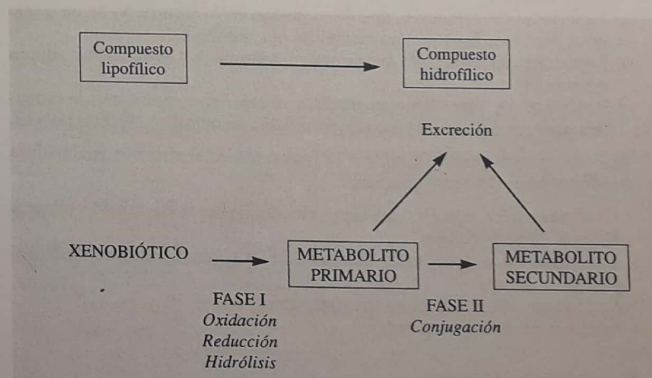


Figura 4.1. Sinopsis del conjunto de procesos implicados en la biotransformación de un xenobiótico.

- **Reacciones de Fase I:** representan el primer camino seguido para la metabolización de la mayoría de los xenobióticos. En esencia, se trata de reacciones oxidativas, reductoras o hidrolíticas, que tienen por objeto la adición, o puesta al descubierto, de algún grupo polar en la estructura química primaria.
- **Reacciones de Fase II:** suelen ser reacciones de conjugación, orientadas a incrementar la hidrosolubilidad de aquellas moléculas que ya disponen de grupos polares, con el fin de proporcionarles una mayor facilidad para su excreción.

Por lo general, una reacción de Fase II ha de ir precedida de alguna otra de la Fase I, pero en el caso de que el xenobiótico disponga de una estructura adecuada para la conjugación no hace falta que se produzca la transformación previa. Esto significa que el principal factor que determina el tipo de reacciones que han de intervenir en la metabolización de un xenobiótico es precisamente su estructura química.

Reacciones implicadas en la fase I

El principal objetivo a cubrir por las reacciones de Fase I es dejar al descubierto algún grupo funcional polar en la molécula primaria del xenobiótico, o bien introducirlos en la misma: OH, SH, NH₂ y COOH. Con ello se consigue un ligero incremento de su hidrosolubilidad.

En esencia, pueden intervenir tres tipos diferentes de mecanismos:

- Reacciones de *oxidación*, que desembocan en la formación de un grupo polar dentro de la estructura molecular del xenobiótico.
- Reacciones de *reducción*, que permiten la formación de funciones aminas o alcoholes.
- Reacciones de *hidrólisis*, que conducen a una fragmentación de la estructura química del xenobiótico con formación de nuevas moléculas polares.

Todo ello resulta posible gracias a la intervención de sistemas enzimáticos catalizadores de las diversas reacciones:

- **Oxidativos microsomales:** sistemas monooxigenasas de función mixta y sistemas aminooxidadas.
- **Oxidativos no microsomales:** alcohol-deshidrogenasa, aldehído-deshidrogenasa.
- **Reductores:** nitrorreductasas, azorreductasas.
- **Hidrolíticos:** esterasas, amidasas.

A) Reacciones de oxidación

La mayor parte de las reacciones de oxidación están catalizadas por enzimas microsomales, si bien en algunos pocos casos pueden intervenir enzimas mito-

condriales o citosólicas. De aquí que se distingan dos grandes grupos de oxidaciones:

- **Microsomales:** hidroxilaciones, epoxidaciones, desalquilaciones, desaminaciones, etc.
- **No microsomales:** oxidaciones de aminas, alcoholes y aldehídos.

Oxidaciones microsomales

Las oxidaciones microsomales representan una ruta importante para la biotransformación de muchos xenobióticos y en su mayoría están catalizadas por *sistemas mono-oxigenasas* de función mixta, así denominados por su capacidad de adicionar a la molécula del xenobiótico un átomo aportado por una molécula de oxígeno, a la vez que con el otro átomo se forma agua. Están localizados en el retículo endoplásmico liso de las células de muchos mamíferos, y abundan de modo particular en el hígado, con preferencia en su región centrotubular.

Con referencia al ámbito toxicológico, los sistemas oxigenasas de función mixta están integrados por varias proteínas que, bajo la forma de dos sistemas enzimáticos, tienen la capacidad de oxidar a una gran variedad de sustratos xenobióticos: Citocromo P₄₅₀ y monooxigenasas que contienen FAD.

Citocromo P₄₅₀: son unas hemoproteínas cuyos puntos activos son precisamente los átomos de hierro en su forma oxidada (Fe³⁺) por donde se enlaza al sustrato.

Se conocen diversas isoenzimas, que se suelen agrupar en familias de genes; sus proporciones relativas dependen de algunos factores, tales como la especie animal o las influencias ambientales. Muestran una cierta especificidad de sustrato y sus actividades pueden ser inducidas por la presencia de distintas sustancias.

Se ha identificado un gran número de enzimas citocromo P₄₅₀ de las cuales se han determinado las correspondientes secuencias de aminoácidos. Precisamente su estructura primaria constituye la base para denominar y clasificar las diferentes enzimas, de esta clase, en familias y subfamilias, en función del grado de identidad en su secuencia de aminoácidos. Así, enzimas con una identidad superior al 55% de sus aminoácidos se consideran pertenecientes a la misma subfamilia; enzimas con una identidad entre el 40-55% pertenecen a distintas subfamilias dentro de la misma familia; enzimas con una identidad inferior al 40% pertenecen a distintas familias.

La forma actual de denominación de estas enzimas es por las iniciales CYP seguidas de un número que designa la familia, una letra mayúscula para la subfamilia y un número para la isoenzima. Así, por ejemplo, CYP 1A1 constituye la nomenclatura abreviada de la isoenzima 1 del citocromo P₄₅₀ de la familia 1, subfamilia A.

En los microsomas hepáticos del hombre existen 4 familias: CYP 1, CYP 2, CYP 3 y CYP 4; las tres primeras familias están implicadas en la transformación de xenobióticos, mientras que la última es una familia cuyos sustratos naturales son ácidos grasos y eicosanoides, pero relativamente pocos xenobióticos.

TABLA 4.1. Principales enzimas P₄₅₀ presentes en los microsomas hepáticos humanos.

Familia	Subfamilia	Isoenzima	Algunos sustratos	Algunos inductores	Algunos inhibidores
CYP 1	CYP 1A	CYP 1A1 CYP 1A2	Cafeína	Omeprazol	α-Naftoflavona
CYP 2	CYP 2A	CYP 2A6	Nicotina	Barbitúricos	8-Metoxipsoralen
	CYP 2B	CYP 2B6	Ciclofosfamida		
	CYP 2C	CYP 2C8	Taxol	Quercetina	
		CYP 2C9*	Diclofenaco	Rifampin	
		CYP 2C19*	Propranolol	Rifampin	
	CYP 2D	CYP 2D6*	Debrisoquina		
	CYP 2E	CYP 2E1*	Acetaminofeno	Etanol	4-Metilpirazol
CYP 3	CYP 3A	CYP 3A4* CYP 3A5 CYP 3A7	Lansoprazol	Fenobarbita	
CYP 4	CYP 4A	CYP 4A9/11			

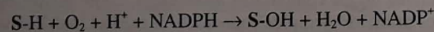
* Metabolizan una gran variedad de medicamentos.

Dentro de cada familia hay una subfamilia, excepto la familia 2 que está constituida por 5 subfamilias (2A, 2B, 2C, 2D y 2E). El número de enzimas dentro de cada subfamilia es variable (Tabla 4.1). En conjunto, en la especie humana hay al menos 15 enzimas citocromo P₄₅₀ distintas que transforman xenobióticos y/o sustratos endógenos.

Desafortunadamente, un sistema de nomenclatura basado en la estructura primaria de las proteínas tiene sus inconvenientes, ya que no proporciona ninguna información acerca de su función, es decir de la reacción que catalizan y, por tanto, no garantiza que proteínas estructuralmente relacionadas realicen la misma función en distintas especies.

Algunas enzimas tienen el mismo nombre en todas las especies de mamíferos; tal es el caso de CYP 1A1, CYP 1A2 y CYP 2E1. Tanto la función como el sistema de regulación de estas tres enzimas están bastante conservados en todas las especies de mamíferos. En cambio, en otros casos, las relaciones funcionales y evolucionarias entre especies no son tan claras. Así, por ejemplo, en la especie humana CYP 2A6 es el único miembro funcional de la subfamilia 2A mientras que CYP 2A1-2A5 corresponden a proteínas de rata y ratón que fueron secuenciadas anteriormente.

La reacción general que catalizan las enzimas mono-oxigenasas del sistema citocromo P₄₅₀, consiste en la fijación de un átomo de la molécula de O₂ en la estructura del xenobiótico, a la vez que el otro átomo acepta dos hidrógenos para formar agua:



donde «S-H» es el sustrato xenobiótico.

En la reacción también interviene una cadena de oxido-reducción que implica la actividad de otras dos enzimas: *NADPH citocromo-P₄₅₀ reductasa* y *NADH citocromo b₅ reductasa*. La primera es una flavoproteína de la que solo se conoce una forma enzimática, capaz de transferirle, uno a uno, dos electrones a la velocidad de captación que admita el citocromo. Su concentración microsomal viene a ser de diez a treinta veces inferior a la del citocromo P₄₅₀. La segunda, es una enzima que existe en forma soluble en el citosol de los eritrocitos, en donde recibe el nombre de metahemoglobina reductasa. El ciclo completo de oxido-reducción se presenta en la Figura 4.2.

- **Monooxigenasas que contienen FAD:** estas enzimas, presentes en la fracción microsomal de hígado, riñón y pulmón, son capaces de oxidar los átomos nucleofílicos de N, P y S de una gran variedad de xenobiótico. Al igual que citocromo P₄₅₀, requieren NADPH y O₂ y catalizan la misma reacción general. Compiten con el sistema anterior en la oxidación de las aminas, a las que convierte en derivados hidroxilaminas, oximas y nitrones (un N-óxido de alquiliden aminoderivados), según sean respectivamente aminas primarias, secundarias o terciarias.

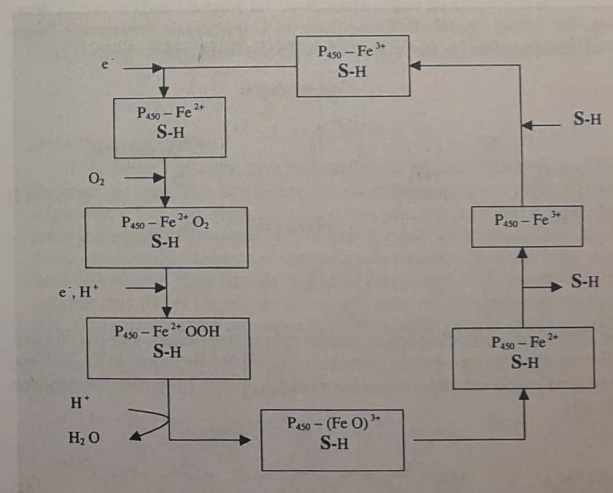


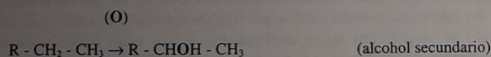
Figura 4.2. Ciclo de oxidación-reducción de un sustrato xenobiótico por la actividad de citocromo P₄₅₀.

1) Reacciones de oxidación catalizadas por citocromo P₄₅₀:

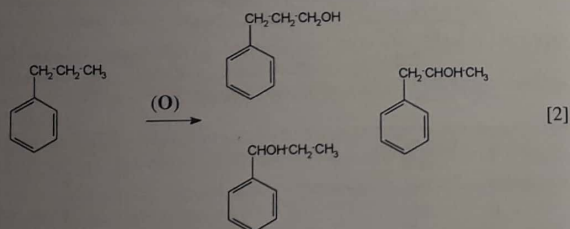
Hidroxilaciones

Consiste en la introducción de un OH en la estructura de aquellos xenobióticos que responden a compuestos alifáticos, alicíclicos o aromáticos, con las peculiaridades propias de cada una de estas estructuras orgánicas.

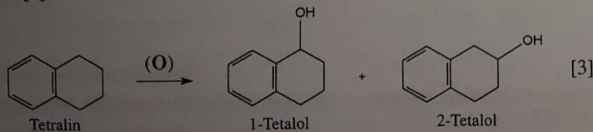
En los *compuestos alifáticos*, la reacción tiene lugar como resultado de la inserción de un átomo de oxígeno en un enlace carbono-hidrógeno. Puede afectar a hidrocarburos, tanto de cadena recta como ramificada, unas veces en el carbono del grupo metilo terminal, otras en el carbono ω₁ (el más próximo al último carbono) [1]:



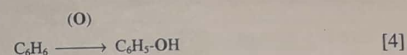
También puede haber inserción de un OH en la cadena lateral alifática de un compuesto con estructura de anillo aromático. Tal sería el caso del n-propilbenceno, que los conejos metabolizan mediante la formación de un derivado hidroxilado en cualquiera de los tres átomos de carbono de la cadena lateral [2]:



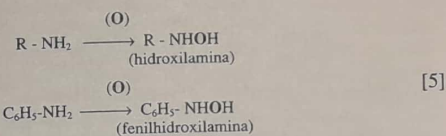
Los *compuestos alicíclicos* que resultan más susceptibles a este tipo de oxidaciones son aquellos que en sus estructuras químicas disponen de dos anillos, uno aromático y otro saturado, como por ejemplo, el 5,6,7,8-tetrahidronaftaleno o tetralin [3]:



Las hidroxilaciones en los *compuestos aromáticos* suelen ser bastante comunes y como ejemplo se puede citar la conversión del benceno a fenol [4]:

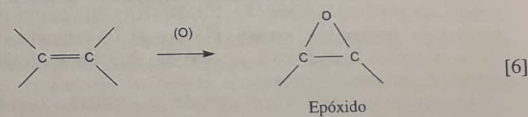


Así mismo, caben hidroxilaciones en las *funciones aminas*, tanto alifáticas como aromáticas [5]:



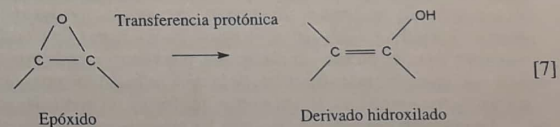
Epoxidaciones

En las estructuras químicas con insaturaciones, tanto alifáticas como aromáticas, el átomo de oxígeno puede insertarse en el doble enlace C=C para dar lugar a la estructura conocida con el nombre de epóxido [6]:



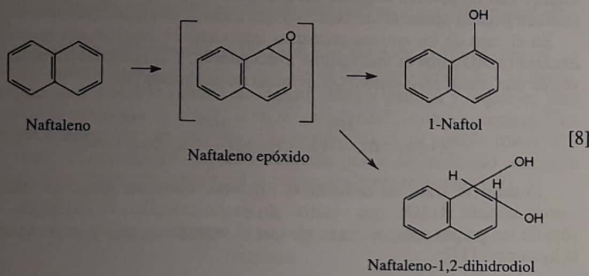
Estos epóxidos pueden evolucionar de tres modos diferentes:

a) Convirtiéndose en un derivado hidroxilado por transposición no enzimática [7]. Es decir, el epóxido intermediario se redistribuye para formar un compuesto hidroxilado.



b) Persistiendo el producto intermediario tóxico. Se ha sugerido que estos epóxidos intermediarios tienen una gran importancia en la toxicidad resultante de los compuestos aromáticos, como ocurre en el caso de uno de los primeros ejemplos conocidos: la oxidación del naftaleno. Por transposición no enzimática se convierte, de modo predominante, en 1-naftol; pero si interviene la actividad de la enzima *epóxido-hidrolasa* se forma el

derivado 1,2-dihidrodiol del naftaleno [8]. En la actualidad se admite que estos epóxidos están implicados en los procesos de carcinogénesis provocados por los hidrocarburos policíclicos.

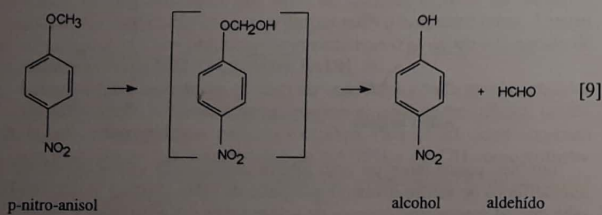


c) Reaccionando el epóxido con la molécula de glutatión, y el derivado se elimina en forma de conjugado con el ácido mercaptúrico.

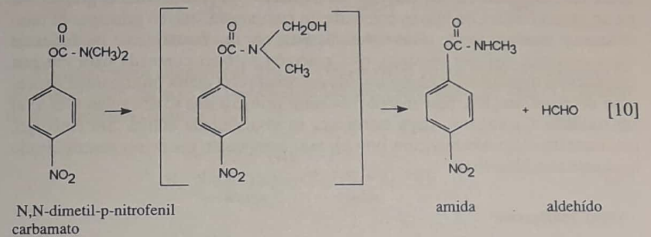
Reacciones de desalquilación en átomos de O, N y S

El carbono alfa de los grupos alquil que se encuentran ligados a los átomos electronegativos O, N o S, puede ser hidroxilado con cierta facilidad por la inserción de un átomo de oxígeno en su enlace C-H. La inestabilidad que la existencia de un átomo electronegativo proporciona a su átomo de carbono adyacente, hace que la estructura resultante de la hidroxilación se descomponga en dos partes: una formada por un aldehído o una cetona, y otra integrada por un metabolito con grupos hidroxilo, amino o sulfhidrilo libres.

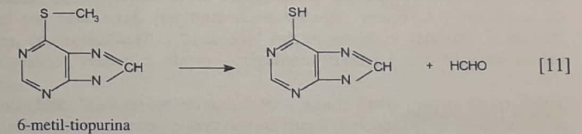
Diversos ejemplos pueden citarse relacionados con estructuras que tienen átomos de O electronegativos: las drogas codeína y fenacetina, el insecticida metoxi-cloro, etc. Un caso de reacción menos compleja tiene lugar con el p-nitro-anisol [9].



Las oxidaciones en estructuras xenobióticas que contienen átomos de N electronegativos, son también reacciones comunes para muchos insecticidas N-dialquil carbamatos [10].

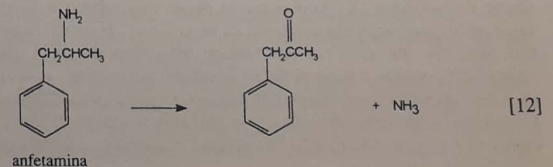


Las oxidaciones en xenobióticos, que incorporan átomos de S electronegativos en sus estructuras, suelen ocurrir con un cierto número de tioéteres, como es el caso de la 6-metil-tiopurina [11].



Desaminación oxidativa

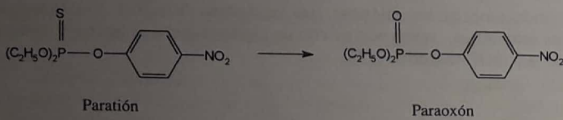
Suele tener lugar en aquellos xenobióticos con estructuras químicas que disponen de una parte aromática con un grupo amino primario. El carbono alfa adyacente a la amina primaria es hidroxilado; después, del intermediario inestable que resulta se sustrae un ión hidruro que forma amoníaco, mientras que se da una transposición en el carbono alfa oxidado para dar lugar a un aldehído o una cetona. Este tipo de reacción tiene lugar en la metabolización de las anfetaminas por el hígado de conejo, aunque no ocurre lo mismo con el perro o la rata, animales que tienden a la hidroxilación directa sobre el anillo aromático [12].



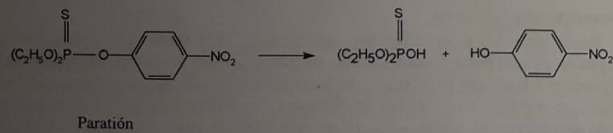
Oxidación del átomo de P

Algunos insecticidas deben su actividad insecticida, o su actividad tóxica sobre los mamíferos, a una reacción de oxidación que transforma el grupo $P=S$ en un grupo $P=O$. Con ella se convierte un compuesto, que en principio es relativamente inactivo frente a las colinesterasas, en otro fuertemente inhibidor de estas enzimas. Así por ejemplo, esta reacción es bien conocida para muchos compuestos organofosforados y ha sido estudiada con cierta profundidad para el caso del paratión [13]. Este insecticida sufre primero una toxicación (vía a) al ser oxidado a paraoxón, cuya estructura es tóxicamente activa. Sin embargo, mediante una segunda reacción (vía b), este compuesto puede ser detoxificado mediante una hidrólisis.

Vía a) Toxicación



Vía b) Destoxicación:



[13]

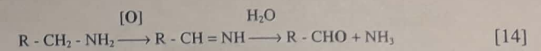
Deshalogenación oxidativa

En los derivados halogenados se puede producir una separación oxidativa del átomo de halógeno (X), pero a través de un mecanismo indirecto. En primer lugar, el oxígeno activado se inserta en un enlace $C-H$ dando lugar a una estructura inestable, que pasa por una fase de redistribución en la que se rompe el enlace $C-X$ y queda intacto el punto de ataque del oxígeno activado. Cuando el carbono contiene un solo átomo de halógeno aparece un aldehído, mientras que si tuviera dos se formaría un haluro ácido; ambos son inestables y pueden reaccionar de modo no enzimático con grupos funcionales situados en macromoléculas biológicas.

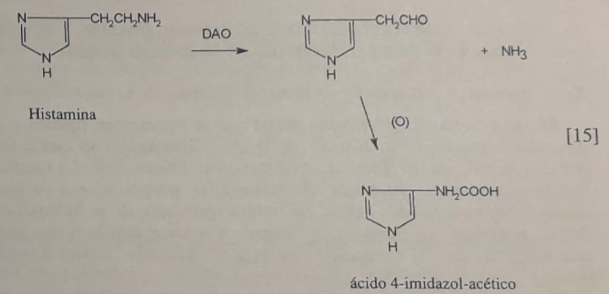
II) Reacciones de oxidación catalizadas por amino-oxidasas

Otras enzimas, las amino-oxidasas, cuya función biológica normal es la de metabolizar las aminas biógenas formadas en los procesos biológicos normales, también pueden actuar sobre las funciones aminas de algunos xenobióticos.

En el caso de las aminas primarias interviene la denominada *mono-amino-oxidasa* (MAO), que es una enzima mitocondrial, y la reacción transcurre a través de una deshidrogenación, con pérdida de amoníaco [14]:

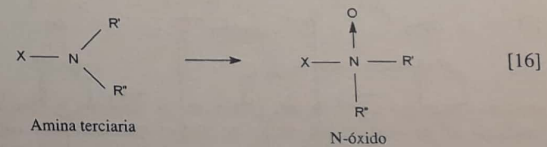


Cuando se trata de estructuras diamino, entra en juego la enzima *di-amino-oxidasa* (DAO), que cataliza de modo selectivo la oxidación de uno sólo de los grupos aminos. Es la vía que el organismo utiliza para metabolizar la histamina [15]:



[15]

Las amino-oxidasas pueden catalizar la conversión de las aminas secundarias en oximas y nitrones, mientras que sólo pueden actuar con algunas aminas terciarias para transformarlas en derivados N-óxidos [16]:



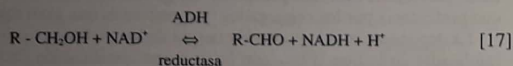
[16]

También puede tener un gran interés biológico la oxidación de los átomos nucleofílicos de azufre divalente por parte de estas enzimas amino-oxidasas. Se sabe que, al menos, son capaces de actuar sobre tiocarbamidas y tiourea.

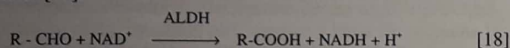
III) Oxidación de alcoholes y aldehídos

Muchos medicamentos y otros xenobióticos presentan grupos funcionales alcoholes o aldehídos, que pueden ser oxidados (o deshidrogenados) por enzimas no microsomales como son, *alcohol-deshidrogenasas* y *aldehído-deshidrogenasas*.

Las *alcohol-deshidrogenasas* (ADH) son una clase de enzimas capaces de catalizar la conversión de funciones alcoholes en funciones aldehídos o cetonas. Se localizan en la fracción soluble de hígado, riñón y pulmón y requieren para su actividad la presencia de NAD^+ , o en su caso $NADP^+$, como coenzima. Una característica interesante de esta reacción enzimática es su posible reversibilidad, es decir, el compuesto carbonilo formado puede ser reducido de nuevo hasta alcohol, siempre que intervenga la correspondiente reductasa [17].



Las *aldehído-deshidrogenasas* (ALDH), cuya fuente principal es el hígado, catalizan la oxidación de los aldehídos hasta ácidos carboxílicos, necesitando NAD^+ como cofactor [18]:

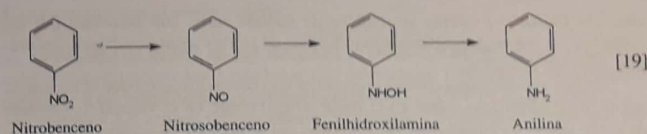


La mayoría de las veces, la actividad de estas enzimas sobre los alcoholes representa un proceso de detoxificación: el etanol por acción de ADH y ALDH se convierte en ácido acético, que es rápidamente metabolizado a dióxido de carbono y agua. Sin embargo, se conocen casos en los que el ácido carboxílico resultante es más tóxico. Se pueden citar dos ejemplos de esta bioactivación muy típicos: las metabolizaciones de metanol y de etilenglicol, que dan lugar respectivamente a la formación de los ácidos fórmico y oxálico.

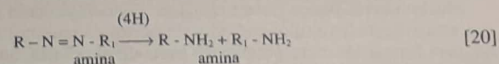
B) Reacciones de reducción

Se trata de reacciones que se desarrollan con mayor facilidad bajo condiciones de tensión baja de oxígeno y en las que los sustratos se reducen porque aceptan electrones. Pueden intervenir una serie de enzimas capaces de reducir a xenobióticos cuyas estructuras contienen grupos nitro o azo, entre otros. A veces se duda si las reacciones son propiamente enzimáticas o se deben a la acción de agentes reductores como $NADPH$, $NADH$, $FADH$, etc.

Los derivados nitro aromáticos pueden ser reducidos con la ayuda catalítica de sistemas enzimáticos *nitrorreductasas*, que son propios de mamíferos, localizadas en hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebro. Para su actividad necesitan condiciones anaeróbicas y la contribución de $NADPH$ y $NADH$ como cofactores. Posiblemente, se siga el camino de formar derivados nitroso e hidroxilamina como pasos intermedios [19].



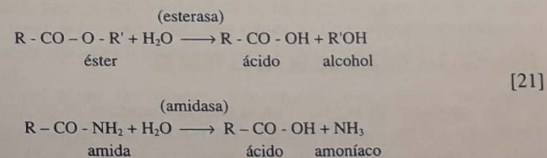
Planteamientos similares se dan para la actividad de los sistemas enzimáticos *azorreductasas*, capaces de metabolizar los colorantes tipo azo, con el resultado de dos estructuras aminas [20]:



C) Reacciones de hidrólisis

Las reacciones hidrolíticas son las únicas de la fase I que no utilizan energía. Una gran cantidad de xenobióticos, que tienen en sus estructuras enlaces tipo éster o amida, son susceptibles de experimentar un proceso hidrolítico. Estas reacciones son catalizadas por numerosas enzimas *esterasas* y *amidadasas* no específicas, contenidas en las fracciones microsomales y solubles de hígado, mucosa intestinal, músculo, plasma sanguíneo, riñón y tejido nervioso en los mamíferos.

La rotura hidrolítica de los enlaces éster o amida libera grupos carboxílicos, que en el primer caso se acompañan de una función alcohol y, en el segundo, de una amina o amoniaco. De modo general, responden al siguiente esquema [21]:



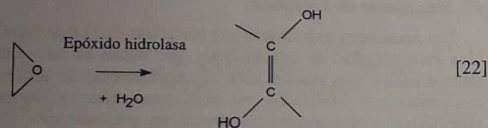
En general, las hidrólisis enzimáticas de amidas transcurren de modo más lento que las de los ésteres, posiblemente debido a la gran especificidad de sustrato que presentan las amidadasas y, tal vez, a factores electrónicos. En cuanto a las esteradasas caben distinguir dos tipos, según puedan ser inhibidas por los ésteres organofosforados (tipo B) o no (tipo A).

Las esteradasas tipo A incluyen las arilesteradasas (ésteres aromáticos de sustratos), mientras que en las tipo B se integran las colinesteradasas del plasma (ésteres de colina), las acetilcolinesteradasas de eritrocitos y tejido nervioso (ésteres de acetil), las carboxilesteradasas (ésteres alifáticos), etc. Las arilesteradasas inespecifici-

cas, que hidrolizan ésteres aromáticos de cadena corta, son activadas por los iones Ca^{2+} y son responsables de la hidrólisis de ciertos triésteres organofosforados, como el paraoxon.

Muchos son los xenobióticos que sufren una destoxicación por la acción de las enzimas hidrolasas, tanto en el reino animal como en el vegetal: los ésteres de ácido ftálico de sustancias plastificantes; los ésteres de los ácidos picolínico y fenoxiacético propios de algunos herbicidas; las estructuras piretroides, o derivados, de insecticidas; etc. Precisamente, la resistencia de ciertas razas de insectos a la acción tóxica del malatión se debe a la actividad de una carboxilesterasa que destoxifica al compuesto.

Mucho interés tienen otras hidrolasas, conocidas como epóxido-hidrolasas, que actúan sobre los anillos epóxidos de ciertos compuestos tipos areno o alqueno, para formar los correspondientes *trans*-dihidrodiolos, que han sido mencionados en el apartado de «epoxidación» [22].



Ciertos epóxidos lábiles pueden ser responsables de una actividad carcinogénica, que pierden al ser destoxicados por la acción de las epóxido-hidrolasas o por las glutatión epóxido S-transferasas, cuyos mecanismos de hidratación resultan óptimos en la zona de pH alcalinos. Todos ellos son enzimas localizadas en la fracción microsomal del hígado de mamíferos y otros tejidos.

Reacciones implicadas en la fase II

Las reacciones de la fase II de la biotransformación de un xenobiótico que ha penetrado en el organismo se caracterizan por ser reacciones de *conjugación*, catalizadas por enzimas en su mayor parte citosólicas. Aunque a veces tienen lugar sobre la estructura primaria, sin embargo la mayoría de ellas ocurre sobre los metabolitos formados en las reacciones propias de la fase I, que adicionan grupos polares.

El proceso bioquímico tiene lugar con agentes conjugantes de origen endógeno, mediante enlaces de tipo covalente, que le proporcionan un carácter poco reversible. El producto inicial, o el metabolito, se conjugan con el ácido glucurónico u otro carbohidrato; con el sulfato; con el glutatión; con aminoácidos; o bien sufren reacciones de acetilación o de metilación. Al ser reacciones biosintéticas, necesitan del aporte de energía que puede ser suministrada por la activación de cofactores y, en algunos casos, por el propio sustrato, cuando es convertido en un compuesto intermediario de alta energía.

Puesto que los cofactores son activados con ATP, de un modo directo o indirecto, sus disponibilidades dependerán de manera importante del estado energético del órgano correspondiente. De aquí que, en la práctica, se haya podido establecer una escala de capacidades relativas para las distintas reacciones de conjugación: elevada, para el ácido glucurónico; media, para los aminoácidos; baja, para sulfato y glutatión; variable, para la acetilación.

El objetivo primordial de los procesos implicados en las conjugaciones de la fase II es hacer la molécula xenobiótica más hidrosoluble y, por consiguiente, facilitar su eliminación por algún órgano de excreción. También estos órganos presentan ciertas preferencias por algún tipo de compuesto conjugado: el riñón es la vía preferente de conjugados glucurónicos, glicínicos y sulfatos; la bilis es la vía elegida por los conjugados del glutatión; en cambio, los conjugados acetilados carecen de una ruta preferida. En general, la vía enterohepática es usada con preferencia por los conjugados que presentan una gran masa molecular.

La dependencia del aporte de energía de los distintos tipos de conjugaciones implicadas en la fase II ha dado lugar a una clasificación de las mismas, según que la energía pueda proceder de un agente conjugante activado (tipo 1) o del sustrato activado (tipo 2). Las conjugaciones del tipo 1 incluyen la formación de conjugados glucurónicos, sulfatos, metilados y acetilados. En cambio, a las conjugaciones del tipo 2 corresponden los conjugados aminoacídicos.

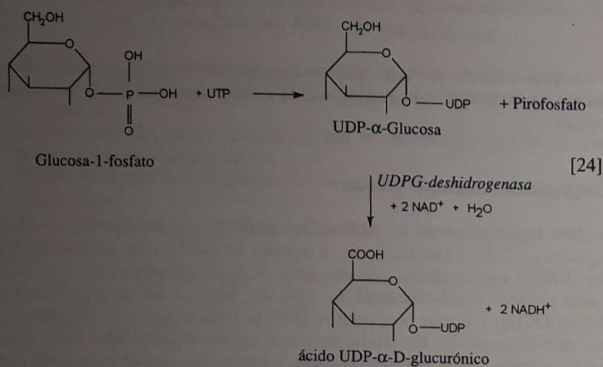
Conjugación con el ácido glucurónico

La glucuronidación representa una de las principales conjugaciones entre las reacciones enzimáticas de la fase II para convertir en compuestos hidrosolubles muchas moléculas endógenas y exógenas, con el fin de facilitar su excreción a través de la orina o de la bilis. Suele tener lugar sobre estructuras que contienen oxígeno, tales como fenoles; ácidos carboxílicos; aquellos alcoholes secundarios y terciarios que resultan poco apropiados para una rápida degradación oxidativa; compuestos aromáticos que tienen nitrógeno bajo las formas de amina o carbamil, tales como anilina y meprobamato; compuestos con azufre, como algunos tioles; etc. En todos los casos aparecen estructuras que son tan solubles en el agua como el mismo ácido glucurónico con el que se conjugan [23].

(alcoholes... R-OH)	→	(O-éteres)	
(ácidos...R-COOH)	→	(O-ésteres)	[23]
(aminas...R-NH ₂)	→	(N-glucurónidos)	
(tioles...R-SH)	→	(S-glucurónidos)	

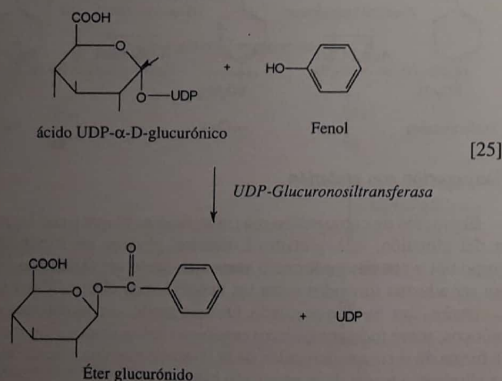
La reacción exige la intervención del ácido uridín difosfato glucurónico (AUDPG), formado a partir de la glucosa-1-fosfato, UTP y NAD [24], que con el grupo funcional del xenobiótico forma el glucuronilconjugado con liberación de UDP. Catalizada por la enzima *UDP-glucuronosiltransferasa*, esta reacción requiere que la molécula de glucurónico cedida sufra una inversión de Walden, es decir, pase de su configuración α a la configuración β .

a) Formación del ácido glucurónico a partir de Glucosa-1-fosfato



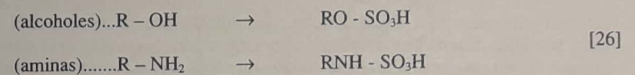
A diferencia de otras enzimas que intervienen en las reacciones de la fase II, su actividad está localizada en el retículo endoplásmico del hígado principalmente, aunque también en riñón, intestino, piel, cerebro y bazo. Se sospecha la existencia de varias formas de esta enzima, aunque se ignora todavía el número de ellas. Entre los ejemplos típicos caben citar: anilina, fenol, p-nitrofenol, ácido benzoico, meprobamato, sulfotiazol, tiofenol, etc. [25]

b) Reacción de conjugación del ácido glucurónico con el fenol



Conjugación con el anión sulfato

El proceso de incluir en una molécula el anión sulfato se denomina sulfatación y constituye en los mamíferos una importante reacción de conjugación aplicable a las estructuras con grupos hidroxilos. La reacción de transferir aniones sulfato a los grupos OH de fenoles y alcoholes alifáticos es catalizada por una serie de enzimas solubles, conocidos como *sulfotransferasas*, localizadas de modo primordial en el hígado, aunque también se encuentran en riñones, tracto intestinal y pulmones, para dar lugar a ésteres sulfatos. En algunas ocasiones, también pueden actuar sobre grupos aminos aromáticos y sobre hidroxilaminas, con la correspondiente formación de sulfamatos y N-O-sulfatos [26].



El agente donador de los grupos sulfatos es el compuesto conocido como 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato, un cofactor que es sintetizado a partir de sulfato inorgánico y ATP [27]. La fuente de radicales sulfatos suele ser la cisteína, a través de una secuencia de reacciones oxidativas y la activación del anión sulfato tiene lugar con la intervención de enzimas *sulfurilasas*. Como la concentración de cisteína libre suele ser limitada, la disponibilidad del cofactor representa un elemento determinante de la dimensión que puede alcanzar esta vía de conjugación.

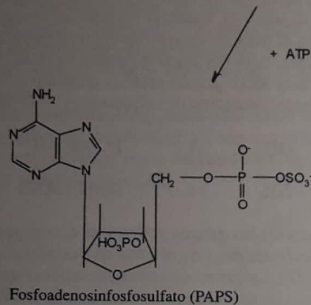
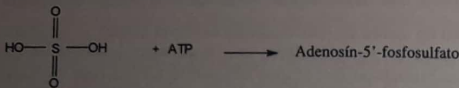
En la práctica representa una excelente vía que tiene el organismo para la destoxicación de algunas estructuras, puesto que la incorporación del radical sulfato hace que la excreción sea más fácil que la del metabolito hidroxilado; de este modo, se reduce la actividad tóxica de muchos compuestos. Es un proceso que suele tener lugar sobre una gran cantidad de compuestos endógenos de bajo peso molecular, como catecolaminas, hidroxi-esteroides, ácidos biliares y etanol [28].

Al contrario del ácido glucurónico, este proceso con aniones sulfatos se caracteriza por poseer un elevado grado de afinidad para los sustratos, pero en cambio su capacidad para formar conjugados es más bien escasa, por lo que esta vía puede quedar agotada enseguida. Esto da lugar a que sea la primera vía a utilizar por el organismo cuando recibe dosis reducidas de compuestos fenólicos, mientras que en el caso contrario de dosis elevadas, el organismo también ha de acudir a su excreción en forma de conjugado glucurónico.

Conjugación con grupos metilos

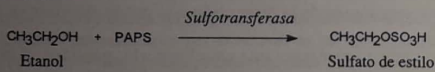
Aunque la metilación represente una reacción bioquímica muy común para la biotransformación de moléculas endógenas, como la histamina, sin embargo

a) Síntesis de fosfoadenosínfosulfato (PAPS)



[27]

b) Reacción de conjugación

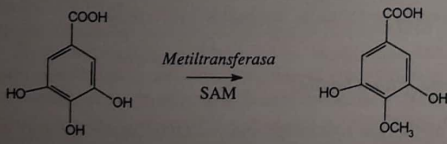


[28]

no significa un camino cuantitativamente importante en la biotransformación de xenobióticos.

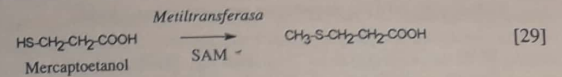
Los grupos funcionales principalmente implicados en este tipo de conjugación son las aminas aromáticas (feniletanolamina), los fenoles (adrenalina, serotonina) y los compuestos tioles (dimercapto-propanol), para formar los correspondientes N-, O- y S- metil conjugados.

Los grupos metilos son transferidos por un cofactor rico en energía, la S-adenosil-metionina (SAM), y son diversas las enzimas *metiltransferasas* que pueden intervenir en la metabolización de los distintos xenobióticos [29].



Ac. 3,4,5-trihidroxibenzoico

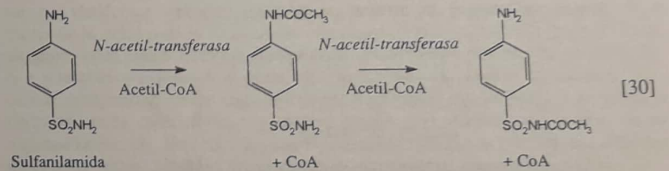
[29]



A diferencia de las otras vías de conjugación se produce un enmascaramiento de los grupos funcionales, con la posible disminución de la hidrosolubilidad.

Conjugación con grupos acetilos

Una importante ruta de biotransformación de las aril aminas en diversas especies es el de la acetilación de la función amina. Muchas aminas xenobióticas (RNH_2) son acetiladas por una serie de *N-acetiltransferasas*, que utilizan como cofactor acetil-coenzima A, para dar lugar a un conjugado aminado (RNHCOCH_3) y liberar coenzima A [30]. Se trata de enzimas citosólicas, que han sido detectadas en las células de varios tejidos: hígado, bazo, mucosa intestinal y pulmón. Los principales sustratos sobre los que actúan son aminas primarias aromáticas, hidrazinas, hidrazidas, sulfonamidas y algunas aminas primarias alifáticas. La capacidad para acetilar xenobióticos se encuentra relacionada con un polimorfismo genético que, unido a factores de desarrollo y diferencias de especies, explican la lentitud del proceso en unos casos y su rapidez en otros. Así por ejemplo, los recién nacidos poseen bajos niveles de estas enzimas, niveles que se incrementan durante el desarrollo del individuo.



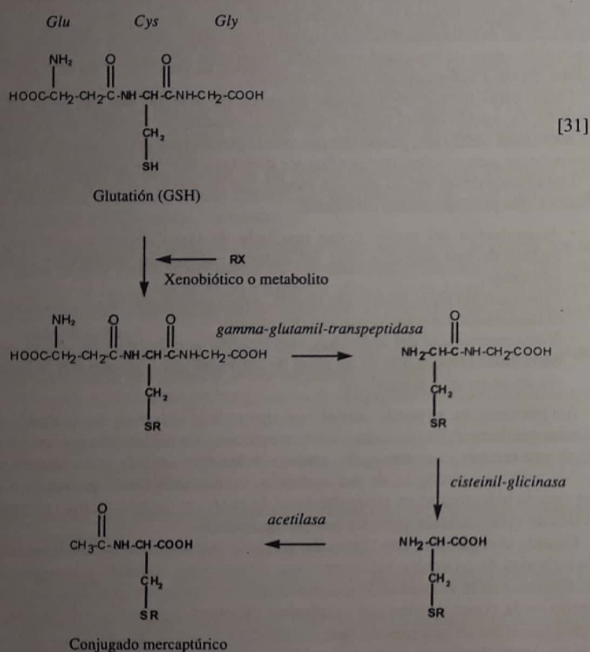
[30]

Conjugación con glutatión

El proceso de conjugación más complejo es el que tiene lugar con la molécula del glutatión, la L-glutamil-L-cisteinil-glicina, un tripéptido que porta un grupo tiol y por ello su fórmula abreviada suele ser GSH. Sus conjugados resultan ser aductos formados entre los xenobióticos electrofílicos y su componente L-cisteína, que ha sido acetilado. De este modo, un número importante de xenobióticos, sobre todo compuestos orgánicos halogenados, son metabolizados bajo la forma de mercaptoderivados de la N-acetil-cisteína o ácido mercaptúrico, que se eliminan a través de la excreción biliar [31].

La biosíntesis de estos derivados mercaptúricos es bastante compleja, con diversos pasos catalizados por sus correspondientes sistemas enzimáticos. El proceso global puede ser esquematizado del modo siguiente:

- Conjugación de los xenobióticos portadores de centros electrofílicos con la forma reducida del glutatión (GSH), catalizada por la enzima *glutatión-S-transferasa*.
- Transferencia del grupo glutamato, con la intervención de la enzima *gamma-glutamyl-transpeptidasa*.
- Pérdida de la molécula de glicina, con la participación de la enzima *cisteinil-glicinasa*.
- Acetilación final del componente L-cisteína, con la ayuda de una enzima *acetilasa*.



Aunque la conjugación inicial con el glutatión reducido no necesita de un intermediario rico en energía, sin embargo la acetilación del conjugado con la cisteína sí requiere la intervención del ATP.

Puede decirse que el papel desempeñado por las enzimas glutatión-transferasas al conjugar compuestos electrofílicos tóxicos es el de proteger a relevantes compuestos nucleofílicos endógenos, aunque no siempre resulta así. Como detoxificante actúa sobre los hidrocarburos monohalogenados, al formar con facilidad un complejo de buena excreción. Sin embargo, a los hidrocarburos dihalogenados, los convierte en compuestos sulfonio, que son genotóxicos. Así mismo, con los epóxidos alifáticos y aromáticos forma un conjugado intermedio, capaz de atacar las zonas nucleofílicas de moléculas biológicas importantes, como ADN y proteínas.

Este proceso de conjugación mercaptúrica puede tener una cierta trascendencia toxicológica al rebajar de modo significativo la concentración de glutatión en el hígado. De este modo provocaría en el organismo una mayor susceptibilidad frente a cualquier efecto tóxico derivado de una exposición adicional a otros xenobióticos.

Conjugación con aminoácidos

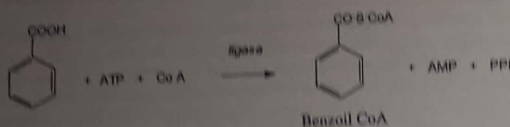
Los xenobióticos que contienen grupos carboxílicos pueden ser conjugados con una gran variedad de aminoácidos. En este proceso importante para la biotransformación de estas estructuras, se forma un enlace amida (tipo péptido) entre el citado grupo carboxílico y el grupo amino del aminoácido. Aunque lo más frecuente es que intervenga la glicina, también en los seres humanos y en algunos monos puede participar la glutamina, mientras que en aves y reptiles lo hace la ornitina.

La formación del enlace amida tiene lugar a través de dos reacciones copuladas catalizadas por enzimas diferentes. En la primera reacción, se produce una activación del ácido bajo la forma de un derivado tioéster de la coenzima A, con el aporte energético del ATP. Intervienen enzimas dependientes del ATP, que reciben el nombre de *ácido-CoA-ligasas*. En la segunda, tiene lugar una transferencia de la parte acil al grupo amino aceptor, mediada por una *N-acil-transferasa* [32].

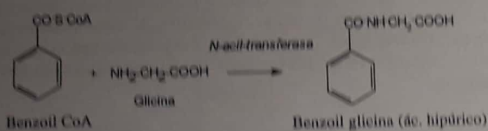
Los conjugados aminoacídicos de los ácidos aromáticos se eliminan de modo primario por la orina y, desde el punto de vista cuantitativo, puede ser considerada como una reacción bastante importante en un gran número de especies animales. Un ejemplo muy característico suele ser el ácido benzoi-co, que conjugado con la glicina aparece en orina bajo la forma de ácido hipúrico.

En la práctica, puede haber una cierta competencia entre esta vía y la conjugación glucurónica para la excreción de los ácidos carboxílicos. No obstante, el grado de formación para uno u otro tipo de conjugados dependerá tanto

a) Reacción de activación



b) Reacción de conjugación



de la estructura del ácido como de la especie animal. Así por ejemplo, en las ratas y los monos, el conjugado principal para el ácido fenilacético resulta ser el formado con los aminoácidos, mientras que para el ácido difenilacético sólo se forma el conjugado con el glucurónico. Sin embargo, podría ocurrir una saturación en la conjugación con los aminoácidos cuando la cantidad de ácido a conjugar resulta alta; en este caso el organismo acude a otras vías de conjugación.

Factores biológicos y ambientales que influyen en la cinética de la biotransformación

La transformación metabólica de un xenobiótico puede dar lugar a tres situaciones bien distintas con respecto a su posibilidad de provocar un efecto tóxico:

1. la modificación a una estructura fácilmente eliminable;
2. la conversión en una molécula inocua, desde el punto de vista biológico, o al menos con una actividad tóxica más reducida (se trata de un proceso de detoxificación);
3. la formación de metabolitos cuyas estructuras químicas poseen un poder tóxico superior (proceso de biotoxicación o bioactivación).

En definitiva, la biotransformación del tóxico desempeña un papel importante en los resultados relacionados con la acción tóxica de una sustancia química. Nor-

malmente, un xenobiótico se metaboliza a través de posibles vías diferentes y con ello puede ser transformado en distintos tipos de metabolitos. La velocidad a la que se desarrolla cada reacción, así como su importancia relativa, pueden verse afectadas por una gran variedad de factores capaces de alterar el patrón metabólico y modificar la toxicidad propia del xenobiótico. Estos factores suelen ser en su mayor parte biológicos, tanto *genéticos* como vinculados al *estado fisiológico* de cada individuo, a los que pueden sumarse algunos *factores ambientales*.

Genéticos

Puesto que los sistemas enzimáticos implicados en las reacciones de las fases I y II de la biotransformación están regulados genéticamente, cualquier modificación que afecte a los genes de los individuos de una población tiene que repercutir en la actividad tóxica de algunas estructuras químicas concretas. Esto explica los casos de toxicidad específica, observada solamente en algunos individuos, frente a determinados agentes tóxicos.

Como estas formas de toxicidad aparecen de acuerdo con las leyes de la genética, es posible que el propio tratamiento estadístico, aplicado para evaluar los resultados obtenidos, pueda enmascarar la posibilidad de reconocer aquellas desviaciones individuales, que pueden ser debidas a defectos genéticos.

Los efectos de un tóxico que son modulados de modo genético, pueden responder a tres planteamientos diferentes:

- *Acumulación* del tóxico como resultado de una deficiencia genética, o incluso de una ausencia total del sistema enzimático metabólico correspondiente.
- *Prolongación* de la acción del tóxico, como secuela de una deficiencia en el mecanismo de transformación del mismo.
- *Hipersensibilidad* del individuo, que implica la existencia de una enzima defectuosa responsable de un nivel de actividad que equivale a la deficiencia de un sistema enzimático.

Así por ejemplo, se puede citar el caso típico de la hidrazida del ácido nicotínico: en los individuos normales, sufre un proceso de acetilación por la actividad de una enzima, cuya formación está controlada por un gen, que elimina todo tipo de actividad biológica de esa sustancia. En los individuos que carecen de este gen, la hidrazida se va acumulando en la sangre y cuando alcanza elevados niveles de concentración provoca una polineuropatía.

Cuando el organismo con alteración genética responde con menos intensidad a la actividad de un agente tóxico presenta el fenómeno conocido como *tolerancia*. Cambios en la velocidad de metabolización dan lugar a una reducción significativa de la concentración del metabolito tóxico en sangre y, en definitiva, el organismo actúa de una manera más refractaria a la acción del tóxico, o como si hubiera desarrollado una cierta inmunidad.

No obstante, el concepto de tolerancia se suele reservar en Toxicología a los casos en los que la reducción del poder tóxico de un agente determinado aparece como consecuencia de anteriores exposiciones a dosis más elevadas.

La especie

La toxicidad de un agente tóxico está determinada por la especie sobre la que actúa como resultado de peculiaridades relacionadas con los procesos de absorción, distribución, metabolización y excreción. Las variaciones vinculadas a la especie, observadas en la metabolización de un xenobiótico, corresponden a dos tipos de diferencias: *cualitativas y cuantitativas*.

Las de carácter cualitativo están relacionadas con las vías metabólicas que actúan sobre el xenobiótico: unas veces aparecen como consecuencia de algún defecto en una actividad enzimática; otras veces son producidas por una reacción enzimática, que es peculiar de esa especie.

Este tipo de diferencias se producen principalmente en las reacciones propias de la fase II y pueden ser debidas a las causas más diversas: capacidad de la especie para sintetizar y/o activar al cofactor necesario; naturaleza y cantidad de la enzima transferasa; cantidad presente del agente conjugante; naturaleza del xenobiótico involucrado; etc.

Existen especies que carecen de un proceso de conjugación adecuado para una estructura concreta, o bien desarrollan una reacción peculiar, fenómenos que se han de reflejar en las respuestas:

- La conjugación con ácido glucurónico suele ser una de las reacciones de fase II con cierta importancia en los mamíferos. Sin embargo, hay que señalar la excepción de gatos y especies afines, que la desarrollan con cierta dificultad, o incluso no tienen capacidad de llevarla a cabo con los derivados fenólicos.
- El perro es incapaz de acetilar los derivados aminos aromáticos porque carecen de la isoenzima N-acetil-transferasa apropiada.
- El cerdo es deficiente en los procesos de conjugación con los radicales sulfatos.
- La conjugación con aminoácidos viene determinada de modo filogenético: los primates utilizan para ello la glicina y la glutamina, mientras que algunas aves utilizan la ornitina.

En cambio, las diferencias cuantitativas pueden ser debidas a una de las dos causas siguientes:

- Variaciones en los niveles enzimáticos, que afectan al equilibrio entre las distintas vías.
- Presencia de inhibidores naturales, que inciden en la magnitud de reacciones competitivas.

Por lo general, este tipo de diferencias conciernen casi siempre a las reacciones de la fase I, posiblemente por disparidad en el perfil de las isoenzimas del citocromo P₄₅₀, que suelen presentar una cierta especificidad para determinadas zonas de las estructuras moleculares.

La raza

La raza dentro de cada especie, también puede originar ciertas diferencias en aquellos procesos de biotransformación, que están controlados de un modo genético. De este modo cabría explicar los resultados encontrados para las respuestas biológicas en algunas experiencias toxicológicas. Es decir, los defectos genéticos propios de los individuos de una raza concreta y que originan alteraciones en alguna actividad enzimática, pueden ser los responsables de la aparición de respuestas tóxicas anormales. Por ello, los estudios toxicológicos deberán ser realizados con grupos de animales que pertenezcan a razas homocigóticas, para evitar posibles deducciones erróneas que pueden provenir del empleo de animales heterocigóticos.

En este sentido, se han encontrado cinéticas desiguales en la oxidación de hexobarbital en función de la raza de rata empleada en la experiencia: Wistar, Sprague-Dawley y Holtzman. Marcadas diferencias en las actividades enzimáticas de sus sistemas citocromos P₄₅₀ repercute sobre la duración del sueño provocado por dicha sustancia en cada raza de ratas. También en el ser humano se han detectado variaciones genéticas en lo que respecta a las biotransformaciones de estructuras como el propranolol, la fenacetina y otros fármacos. Así mismo, la raza también puede dar lugar a modificaciones en las reacciones de fase II, como ocurre con la formación de glucurónidos, cuyas variaciones suelen tener un origen genético asociado a una reducción en la actividad de la glucuronosil-transferasa.

El sexo

En las respuestas toxicológicas a xenobióticos se puede observar una marcada diferencia cuando se comparan individuos de sexos diferentes. Así, dosis equivalentes de hexobarbital provocan un sueño considerablemente menos prolongado en las ratas machos que en las ratas hembras. También en esta línea, se ha visto que el insecticida organofosforado, paratión, es dos veces más tóxico para las ratas hembras que para las machos.

La mayoría de las veces, la influencia de este factor está relacionada con la capacidad hepática para la biotransformación, bien porque incida sobre la vida media del xenobiótico, que al ser más prolongada tiene mayor probabilidad de ejercer su efecto nocivo, bien porque la estructura activa es alguno de sus me-

tabolitos hepáticos. En este sentido, se ha visto que las ratas machos son más susceptibles a las injurias hepáticas provocadas por el CLC o por el halotano, debido a la mayor velocidad con que pueden transformar tales sustancias en estructuras intermediarias reactivas.

Igualmente, cabe señalar la incidencia del sexo en los procesos de biotransformación que tienen lugar en tejidos extrahepáticos. Así, los microsomas renales de ratas machos transforman el cloroformo en fosgeno de un modo diez veces más rápido que los microsomas renales de las ratas hembras. Con ello se ha demostrado la influencia del sexo en la nefrotoxicidad del cloroformo.

También el equilibrio entre las hormonas sexuales masculinas y femeninas resulta de importancia como determinante de la actividad de las enzimas citocromo P₄₅₀. Parece que las ratas machos superan a las hembras en un 20-30 % en la actividad y concentración de los sistemas citocromo P₄₅₀ y NADPH-citocromo reductasa de los microsomas hepáticos. La castración de ratas machos reduce su facultad para metabolizar xenobióticos, mientras que el tratamiento de ratas hembras con testosterona incrementa esta capacidad.

En el ser humano se han observado diferencias atribuibles al sexo en las respuestas relacionadas con las actividades tóxicas de algunas sustancias: ácido acetilsalicílico, nicotina, heparina, etc.

La edad

Un hecho bien conocido es la influencia de la edad en la capacidad de las funciones fisiológicas y metabólicas propias del ser humano y de los animales, como ocurre con la facultad de transformar los xenobióticos, normalmente, más acusada en los jóvenes que en los individuos geriátricos. Posiblemente también con la edad se pierde capacidad de enlace en las proteínas plasmáticas. Sin embargo, los recién nacidos la suelen tener más limitada, porque los sistemas enzimáticos no han alcanzado su pleno desarrollo, aunque en estos casos se puede observar una mayor eficacia de los agentes inductores de enzimas. Como consecuencia de todo ello, puede afirmarse que en los organismos más viejos se obtienen respuestas más tóxicas con aquellas estructuras cuya actividad biológica se deba a la molécula inicial, pero en cambio resulta menor cuando dicha actividad se debe a sus metabolitos.

La gestación

Durante el embarazo se reduce la actividad de numerosas enzimas, entre las que destaca la responsable de la conjugación glucurónica, por un marcado efecto de la actuación de la progesterona.

La dieta

Se ha comprobado que un factor determinante de la actividad metabolizadora en los animales de experimentación es su estado nutricional. En este sentido se ha comprobado cómo ciertas deficiencias en algunos nutrientes minerales (Ca, Cu, Fe, Mn o Zn) reduce tanto las reacciones de oxidación catalizadas por el sistema citocromo P₄₅₀, como las de reducción. Además, esta pérdida de actividad se recupera cuando se procede a una ingesta adecuada.

También ocurre lo mismo con las deficiencias en algunas vitaminas (C, E y complejo B), posiblemente porque de modo directo, o indirecto, están involucradas en la regulación de ese sistema enzimático. En este caso de las vitaminas, también la deficiencia puede alterar la energía y el estado redox de las células y obstaculizar, en consecuencia, la producción de los cofactores ricos en energía que se requieren para las reacciones propias de la fase II. Esta anomalía también se corrige cuando se suministra la ingesta adecuada.

Las dietas hipoproteicas suelen provocar un marcado incremento en la toxicidad de aquellos xenobióticos directamente activos, aunque la reducen cuando la toxicidad depende de la formación de algún metabolito activo. Tal es el caso de la hepatotoxicidad de la dimetilnitrosamina, posiblemente porque está reducida la capacidad de originar la N-desmetilación del compuesto, considerada como la etapa previa esencial para que se convierta en un agente alquilante cancerígeno.

Algo parecido ocurre con las toxicidades del cloroformo o del heptacloro, que necesitan de una biotransformación para ser activos. En realidad, las dietas hipoproteicas actúan reduciendo la actividad de los sistemas enzimáticos microsomales implicados en el metabolismo de las ratas, de modo especial aquellos que hacen referencia a los contenidos enzimáticos en citocromo P₄₅₀ y NADPH-citocromo c reductasa.

Efectos semejantes se observan en relación con la incidencia del nivel de lípidos en la dieta sobre las actividades de ciertas enzimas enlazados a las membranas, donde los lípidos son componentes importantes de sus estructuras. Se ha demostrado que la fosfatidilcolina es un componente esencial para el sistema enzimático microsomal hepático. Un aporte rico en ácidos grasos poliinsaturados aumenta el riesgo de peroxidaciones y puede conducir a una reducción de la actividad del sistema citocromo P₄₅₀, con la correspondiente pérdida en la capacidad de hidroxilar a los xenobióticos.

Así mismo, un aumento en la ingestión de carbohidratos puede provocar una reducción de la actividad tóxica de los xenobióticos, también asociada a una pérdida de actividad de los enzimas ya citados.

Una práctica común en los estudios toxicológicos es privar de alimentos a los animales durante la noche para reducir el volumen de materias en el tracto intestinal y favorecer la absorción del xenobiótico administrado por vía oral. Sin embargo, en el caso de trabajar con roedores esta práctica puede resultar inapropiada al ser animales de hábitos alimentarios nocturnos; en este caso, los anima-

les pueden verse privados de alimentos durante un período de tiempo demasiado prolongado, que puede traer como consecuencia una alteración de la actividad de algún tipo de sistema enzimático.

Esto puede ocurrir, por ejemplo, con la desalquilación de la dimetilnitrosamina y, en consecuencia, se potencia su hepatotoxicidad. También el ayuno nocturno suele reducir al glutatión hepático en un 50 %, por lo que se ve incrementada la toxicidad de todas aquellas estructuras cuya biotransformación dependa del glutatión, como puede ser el bromobenceno.

Los ritmos circadianos

Mucho se ha hablado de la influencia de la hora del día sobre la velocidad de biotransformación de un xenobiótico que ha penetrado en el organismo vivo. Tales especulaciones se basan en la frecuencia con que la cinética de la biotransformación se correlaciona con las variaciones de las funciones endocrinas, influidas muchas de ellas por los ciclos de luz-oscuridad. Así, las biotransformaciones *in vitro* de las moléculas de aminopirina o de hexobarbital, conseguidas con el sistema monooxigenasa citocromo P₄₅₀ aislado de ratas, resultan variables en función del momento del día en el que haya sido aislado de los animales dicho sistema.

También las concentraciones del glutatión hepático se caracterizan por responder a un cierto ritmo circadiano, con niveles superiores hacia los finales de los períodos de oscuridad. Esto hace pensar que se produce una acumulación de glutatión durante el tiempo propio de la alimentación de estos roedores de hábitos nocturnos, que decae después de un largo período de luz en los que los animales reposan y apenas comen.

Los factores ambientales

Se ha podido observar en la experimentación con animales, que existen varios factores ambientales capaces de influir sobre el metabolismo de los xenobióticos y, por tanto, sobre la actividad tóxica de sus estructuras químicas: temperatura, radiaciones, luz, humedad, altitud, etc.

Cabría esperar que los animales que disponen de un control homeotérmico deben presentar un metabolismo independiente de la temperatura ambiente, pero en la práctica no ocurre así. Las variaciones extremas de la temperatura se pueden traducir en un cierto estrés para los animales y provocar cambios debidos a las interacciones hormonales.

Unas veces este factor ambiental incide de modo directo sobre el metabolismo del tóxico, mientras que en otros casos lo hace sobre algunos mecanismos fisiológicos. Así, las ratas sometidas a un estrés por el frío incrementan los procesos de hidroxilación microsómica de la acetanilida.

En general, las radiaciones ionizantes reducen la velocidad metabólica de los xenobióticos, tanto *in vivo* como *in vitro*, efecto que ha sido claramente confirmado para el caso de la hidroxilación de los esteroides.

Los estados fisiológicos anormales

Puesto que el hígado puede ser considerado como el principal órgano donde ocurre la biotransformación de los xenobióticos, cualquier situación patológica que, de modo severo, interfiera con las funciones normales del mismo puede ocasionar algún tipo de alteración en los procesos metabólicos: infecciones virales, carcinomas, ictericia obstructiva, hepatitis, cirrosis, etc.

En los estudios toxicológicos hay que tener en cuenta que una sustancia tóxica puede dañar al hígado, además de ocasionar otros efectos nocivos. En consecuencia, puede afectar de modo más o menos intenso a los sistemas enzimáticos implicados en la biotransformación y dar lugar a un desajuste enzimático que ha sido relacionado con el grado del daño observado. Después de la injuria hepática, puede aparecer una fase de regeneración que, a menudo, exalta la actividad enzimática por encima de los valores mínimos normales.

Por otra parte, una deficiencia hormonal patológica, o una administración de las hormonas, también puede alterar los procesos de biotransformación en respuesta a las influencias que hormonas como las tiroideas, adrenales e insulínicas tienen sobre las actividades de muchos sistemas enzimáticos.

Implicaciones derivadas de la biotransformación de un xenobiótico

Once son las implicaciones que se derivan de los procesos de biotransformación a los que pueden ser sometidas las distintas estructuras químicas presentadas por los xenobióticos que llegan al organismo vivo:

1. En general, las transformaciones bioquímicas que sufre un xenobiótico tienen como fin primordial acentuar su solubilidad en agua, es decir, dan lugar a la formación de metabolitos cada vez más hidrófilos con el fin de facilitar una rápida eliminación por la vía renal.
2. Existen estructuras altamente ionizadas, que no necesitan de una transformación previa puesto que su carácter hidrofílico ya resulta suficiente para una buena eliminación. Tal ocurre con las bases de amino cuaternarias y los colorantes diazo que incorporan grupos sulfónicos ionizados; también cabe citar el caso de algunos ésteres, como acetilcolina y succinilcolina, que son hidrolizados por las esterasas plasmáticas.

3. Existen sustancias con una liposolubilidad tan elevada que resultan metabólicamente estables y se acumulan en el tejido adiposo. Tal es el caso del DDT y algún otro insecticida relacionado.
4. Aunque las reacciones implicadas en las fases I y II tienen como objetivo primordial conseguir una inactivación biológica del xenobiótico, se pueden encontrar casos especiales en los que la biotransformación conduce a la formación de sustancias con una mayor actividad biológica. En esta contingencia, la metabolización origina una *bioactivación*.
5. Un xenobiótico puede ser metabolizado por vías bioquímicas diferentes, de tal modo que se formarán mayores cantidades de unos metabolitos que de otros, de acuerdo con la cinética de cada reacción. Así, después de la administración de ácido salicílico aparece en la orina un 50 % de la estructura primaria sin ser transformada, un 25 % en forma de complejo glucurónico y una fracción pequeña de un derivado que lleva introducido un segundo grupo OH, conocido como ácido gentísico.
6. Cambios en el pH de la orina pueden modificar la distribución porcentual de los metabolitos eliminados por la vía renal, al haberse modificado el grado de ionización de algunos de ellos y permitir su reabsorción en los túbulos renales. Esta circunstancia debe ser tenida en consideración siempre que el análisis de orina se emplee para el estudio de la metabolización y excreción de tóxicos y medicamentos, como suele ocurrir en el caso de las anfetaminas.
7. En muchas ocasiones, las reacciones de biotransformación son estereoselectivas, por lo que en el caso de administrar racematos ocurrirá una transformación más rápida en uno de ellos, que en el otro.
8. De gran interés en la investigación toxicológica es el fenómeno de la *inducción enzimática*, que se puede presentar en las transformaciones bioquímicas de los xenobióticos cuando son metabolizados por el sistema retículo endoplásmico de las células hepáticas. Así por ejemplo, la repetida administración de hexobarbital produce un incremento de la velocidad a la que suele ocurrir su transformación. Esta inducción enzimática lleva consigo una disminución de la sensibilidad del organismo frente a esa sustancia, que puede ser considerado como un cierto tipo de tolerancia.
9. También caben esperar fenómenos de *interferencias* en los procesos de biotransformación cuando un sistema enzimático tenga que actuar sobre una gran variedad de estructuras químicas, puesto que podrían interferir unas con otras. Además, aquellas sustancias que son inhibitorias de estos sistemas enzimáticos, también provocarán interferencias en la transformación metabólica de todos aquellos xenobióticos que hayan de ser metabolizados por tales sistemas.
10. Los procesos de biotransformación de un xenobiótico están muy relacionados con el tiempo de su permanencia en el organismo, circunstancia que en el ámbito toxicológico tiene importancia por dos razones:

- La magnitud del daño producido por la actividad tóxica del xenobiótico será tanto mayor cuanto más prolongada sea la exposición al mismo.
- La retención de un xenobiótico dentro del organismo puede dar lugar a una acumulación, que permitirá alcanzar los niveles tóxicos requeridos después de un tiempo más o menos largo.

El tiempo de permanencia de una sustancia en el organismo se mide en función de su *vida media biológica* ($t_{1/2}$), que representa el tiempo necesario para reducir hasta la mitad su concentración inicial en el plasma o en algún órgano.

En general, las sustancias hidrófilas, y aquellas que se transforman en metabolitos hidrófilos, suelen tener valores de $t_{1/2}$ muy reducidos; no obstante, en personas con afecciones hepáticas o una función renal deficiente, este valor de su vida media se puede alargar de modo muy significativo. También los cambios en el pH de la orina pueden influir en este dato, cuando se trata de ácidos o bases orgánicas débiles, al provocar la reabsorción de la sustancia en los túbulos renales. Por ello, la ingestión de los antiácidos que contengan bicarbonato sódico prolonga en el organismo la vida media de las anfetaminas.

En principio, toda sustancia que tenga una vida media biológica muy larga puede dar lugar a una acumulación en el organismo, siempre que haya existido una exposición prolongada, aunque sea a concentraciones muy reducidas. Esto resulta de interés para los insecticidas muy lipófilos, resistentes a la degradación metabólica (DDT, aldrin, dieldrin, derivados clorados del bifenilo, etc.).

11. Otro factor que da lugar a otro tipo de *acumulación* de algunas sustancias químicas es la velocidad de su degradación metabólica: las sustancias que resultan muy difíciles de metabolizar, dan lugar a una persistencia elevada. Este fenómeno suele adquirir cierta relevancia cuando concierne a la cadena alimentaria, como es el caso de vertidos al mar de compuestos muy lipófilos (plaguicidas, bifenilos policlorados, etc.). Son compuestos apenas solubles en el agua, aunque sí se incorporan al plasma de los microorganismos acuáticos, que sirven de alimentos al plancton (10 g de plancton son asimilados por 100 g de microorganismos), a su vez comido por otros animales, para continuar con la cadena de los respectivos depredadores. El incremento de concentración de tales compuestos que ocurre con el paso de un depredador a otro, hace que pueda resultar fatal para la salud cuando el último consumidor es el ser humano.