

El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana

Palabras clave: biomarcadores, exposición, efectos tóxicos, susceptibilidad individual, revisión.

The role of biomarkers in human toxicology

Key words: biomarkers, exposure, toxic effects, individual susceptibility, review.

Fernando Gil Hernández

Departamento de Medicina Legal y Toxicología
Facultad de Medicina de la Universidad de Granada
Avda. Madrid 11
18071- Granada
Tel.: 958 24 99 30 / 958 24 35 46
Fax.: 958 24 61 07
E-mail: fgil@goliat.ugr.es

Abstract: The use of biological markers in the evaluation of disease risk has increased markedly in the last decade. Biomarkers are observable end points that indicate events

in the processes leading to disease. They are particularly useful in the evaluation of progressive diseases that manifest their symptoms long after exposure to initiating factors. Biomarkers are generally classified into three groups: exposure, effects or susceptibility. Biomarkers of exposure permit measuring the internal dose by chemical analysis of the toxic compound or metabolite in body fluids; biomarkers of susceptibility serves as an indicator that the individual is particularly sensitive to the effect of a xenobiotic or to the effects of a group of such compounds and biomarkers of effect reflect biochemical changes after xenobiotic exposition. In this review are considered several examples of human biomarkers.

Key words: biomarkers, exposure, toxic effects, individual susceptibility, review.

Resumen: el uso de biomarcadores en la evaluación del riesgo frente a determinadas patologías ha aumentado de forma notable en la última década. Los marcadores biológicos son variables que indican un determinado momento en el proceso conducente a la enfermedad. Tienen especial interés en la evaluación de enfermedades

progresivas donde los síntomas se manifiestan tras un largo periodo de exposición. En general los biomarcadores se clasifican en tres grupos: de exposición, efecto o susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición permiten la medida de la dosis interna mediante el análisis químico del compuesto tóxico o un metabolito del mismo en fluidos corporales; los biomarcadores de susceptibilidad sirven como indicadores de la respuesta individual frente a la agresión de un tóxico o grupo de tóxicos y los biomarcadores de efecto indican cambios bioquímicos que acontecen tras la exposición a xenobióticos. En esta revisión se consideran varios ejemplos de biomarcadores en la especie humana.

Palabras clave: biomarcadores, exposición, efectos tóxicos, susceptibilidad individual, revisión.

La presencia de un tóxico en el ambiente implica un riesgo, no obstante, para hablar de impregnación hay que detectar el tóxico en el organismo, y para que exista intoxicación debe aparecer una sintomatología o alteraciones clínicas. Por otra parte, la relación entre el nivel de tóxico presente en el organismo y la respuesta tóxica es algo complejo y difícilmente predecible ya que depende de numerosos factores

(toxicocinéticos, genéticos, etc...). Un método de cuantificar la exposición a xenobióticos y su posible impacto sobre la especie humana es el uso de procedimientos de monitorización biológica por medio de *biomarcadores*.

1. Concepto de biomarcador.-

Se podría definir, en sentido amplio, como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra [1].

Silbergeld y Davis [2] hablan de marcadores biológicos para referirse a señales fisiológicas inducidas por un xenobiótico que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas.

Evidentemente, *in sensu stricto*, la palabra biomarcador haría referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico [3] y no a la presencia de éste o algún metabolito de él en el organismo, aunque es indudable que la medida del xenobiótico en un sistema biológico o muestra es un indicador biológico de exposición, y por tanto, debería ser considerado bajo este concepto.

Sin duda, la ventaja principal del empleo de biomarcadores estriba en que considera las variaciones interindividuales (diferencias en la absorción, biodisponibilidad, excreción o en los mecanismos reparadores del ADN) e incluso, intraindividuales como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un período de tiempo determinado. Ello conlleva una evaluación de la exposición individualizada [4]. En este contexto, el organismo actúa como integrador de la

exposición y determinados factores de tipo fisiológico modulan la dosis captada por dicho organismo. En definitiva, podríamos afirmar que un colectivo no puede asimilarse a un grupo homogéneo de individuos expuestos a un xenobiótico en condiciones estándar y reproducibles.

Una de las limitaciones más importantes de los biomarcadores radica en que no pueden aplicarse a sustancias que ejercen sus efectos tóxicos de forma instantánea (por ejemplo, gases y vapores irritantes primarios) o sustancias que tienen una tasa de absorción muy pequeña [5].

2. Especificidad de los biomarcadores.-

La definición de *biomarcador ideal* [6] implica que éste debe cumplir los siguientes requisitos: a) recolección de la muestra y análisis fácil; b) específico; c) debe reflejar únicamente un cambio subclínico y reversible; d) debe permitir adoptar medidas preventivas; e) debe ser éticamente aceptable.

Está claro que si consideramos esta definición son muy pocos los que se ajustan a ella. Así, los biomarcadores se mueven en un rango muy amplio de especificidad y tenemos desde los que presentan una alta especificidad (la inhibición de la acetilcolinesterasa -AChE- por los insecticidas organofosforados y carbámicos o la inhibición de la ALA-D por el plomo) hasta los muy inespecíficos (los aductos de ADN o los marcadores de respuesta inmune) [3], de ahí que un aspecto importante a valorar sea la complementariedad entre ellos, lo que permite indudablemente aumentar el grado de especificidad.

3. Clasificación de los biomarcadores. Ejemplos.-

En general todos los autores distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de susceptibilidad y de respuesta (o efecto) [2,3,7,8].

3.1 Biomarcadores de exposición

Puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente) o incluso aire espirado [8,9]. En el caso de tóxicos acumulativos, la *dosis interna* puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Por ejemplo, la concentración de bifenilos policlorados (PCBs) en sangre refleja la cifra acumulada en los principales órganos de depósito (tejido graso). Bernard y Lauwerys [10] dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (p. ej. plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (p.ej. tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas).

3.2 Biomarcadores de susceptibilidad.

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas [8].

Podemos distinguir dos tipos [9]: marcadores de polimorfismos de sistemas

activadores y marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores. Los marcadores de polimorfismos de sistemas activadores permiten la medida de actividad de los enzimas del citocromo P-450. Las hemoproteínas conocidas como citocromos P450 (CYP) están implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos. El sistema isoenzimático microsomal del citocromo P450 humano está constituido por un mínimo de 30 genes diferentes, que se agrupan en distintas familias (en función de la semejanza de secuencias aminoacídicas) de las cuales las más importantes son las familias I, II, III y IV [11-13] que a su vez, se agrupan en subfamilias (A, B, C, D,.....) constituidas por genes polimórficos, de los cuales los más importantes son el CYP1A1 de la familia I (representa la actividad de la arilhidrocarburo hidroxilasa) y el CYP1IC8 y CYP1ID6, de la familia II.

Se han realizado estudios tratando de asociar algunos de ellos con enfermedades sobre todo de tipo canceroso, sin embargo las conclusiones han sido aún poco definitivas. Sin embargo, las implicaciones toxicológicas de los polimorfismos del citocromo P450 que afectan al uso terapéutico de determinados fármacos se conocen relativamente bien (Tabla 1).

Los marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores son medidas de actividad de enzimas tales como la glutatión-S-transferasa, la acetiltransferasa, la sulfotransferasa, la glucuroniltransferasa o la paraoxonasa. Por el momento, la predisposición al cáncer ha sido correlacionada con polimorfismos genéticos de las N-acetiltransferasas, enzimas implicados en la inactivación de aminas aromáticas. Después de la acetilación hay una excreción urinaria aumentada. En este sentido los acetiladores lentos con exposición a aminas aromáticas presentan un mayor riesgo de desarrollo de cáncer de vejiga que la población control que era acetiladora lenta. Otro

ejemplo es la glutatión-S-transferasa μ , enzima implicado en la detoxificación de metabolitos reactivos que se ha relacionado con el cáncer pulmonar de células escamosas. La mitad de la población no posee alelos funcionales para este enzima o su actividad es baja o incluso inexistente, lo que hace que se incremente el posible riesgo de dicho cáncer [9].

Finalmente, comentaremos el papel de la paraoxonasa sérica (PON) en la hidrólisis (inactivación) de varios compuestos organofosforados. Ésta presenta un importante polimorfismo, habiéndose detectado en humanos 3 genotipos: individuos homocigotos para el alelo de baja actividad, individuos homocigotos para el alelo de alta actividad e individuos heterocigotos, hecho que permite proponer dicha actividad enzimática como biomarcador de susceptibilidad [14-17].

3.3 Biomarcadores de respuesta (o efecto) .-

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc...) [8].

A continuación vamos a considerar algunos de los ejemplos más significativos de biomarcadores de respuesta o efecto.

3.3.1. Sistema respiratorio.

Varios estudios han sugerido que proteínas de bajo peso molecular específicas del pulmón podrían servir como marcadores de toxicidad pulmonar. Recientemente [18] se ha identificado un marcador de toxicidad pulmonar aplicable no sólo a líquido broncoalveolar (BAL) sino también a suero o esputo que se corresponde con la proteína CC16 (15.8 kDa de peso molecular), denominada proteína de las células Clara (CC16) [19,20]. Numerosos indicios permiten evidenciar que la CC16 es un inmunorregulador natural comportándose como un agente antiinflamatorio, al inhibir la actividad fosfolipasa A2 citosólica, enzima clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. La fosfolipasa A2 es un enzima limitante de la producción de ácido araquidónico, sustrato en la síntesis de prostaglandina y leucotrienos, mediadores de respuesta inflamatoria [21]. Al inhibir la fosfolipasa A2, la CC16 podría también prevenir la degradación fosfolipídica en el surfactante pulmonar [22].

La CC16, secretada en el aparato respiratorio, difunde pasivamente por transudación al plasma desde donde es rápidamente eliminada por filtración glomerular antes de ser catabolizada en las células del túbulo proximal. Estudios llevados a cabo por el equipo del profesor Bernard sugieren que el análisis de CC16 en suero o esputo puede ser un test sensible y relativamente específico de detección precoz de efectos agudos o crónicos de tóxicos sobre el árbol traqueobronquial.

La disminución de CC16 en suero es un indicador del número e integridad de las células Clara. Así, por ejemplo, se ha encontrado una reducción del 15% respecto de la media de las concentraciones séricas de CC16 en pacientes fumadores de 10 cartones/año [23]. También se han encontrado niveles de CC16 séricos disminuidos en trabajadores asintomáticos con un funcionalismo pulmonar normal expuestos de forma crónica a sílice cristalina, polvos de fundiciones y humos metálicos procedentes de

soldaduras, así como en individuos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y cáncer de pulmón [24].

Por otra parte, el aumento de CC16 sérica permite constatar una alteración en la integridad de la barrera existente entre la sangre y la zona broncoalveolar. De hecho, una exposición aguda a humos provoca una elevación transitoria de dicha microproteína en suero debido a un incremento en la transudación de CC16 procedente del tracto respiratorio al suero. En pacientes con síndrome de distress respiratorio del adulto (ARDS) también presentan una marcada elevación de la CC16 sérica mostrando una grave alteración en la barrera sanguínea/broncoalveolar. Estudios experimentales llevados a cabo en ratas tratadas con agentes neumotóxicos específicos (la α -naftiltiourea [ANTU], la ciclofosfamida, el 4-ipomeanol o la bleomicina) muestran como a medida que aumenta el paso de CC16 al suero, procedente del tracto respiratorio, aumenta la albúmina en BAL proveniente del plasma.

3.3.2. Sistema sanguíneo.

Sin duda, los biomarcadores de respuesta más estudiados han sido los implicados en alteraciones en la síntesis de hemoglobina. En primer lugar citaremos la actividad eritrocitaria del enzima ácido delta-amino levulínico deshidratasa (ALA-D), altamente sensible y específico en la exposición al plomo.

Otro ejemplo lo constituyen las porfirinas. Un gran número de compuestos organoclorados afectan la síntesis de hemoglobina originando un acúmulo de porfirinas altamente carboxiladas que pueden detectarse en hígado, sangre, orina o heces.

Los aductos de hemoglobina constituyen otro ejemplo de biomarcador de efecto sobre el sistema sanguíneo. Estos aductos se forman a partir de la exposición a numerosos compuestos entre los que podemos citar a la acrilamida, el óxido de etileno,

el 3-amino-1,4-dimetil-5 H-pirido-indol, 4-aminobifenilo, 2,6-dimetilanilina, etc...

En el caso particular de la acrilamida (importante agente químico neurotóxico que además de ser un cancerígeno potencial, ocasiona neuropatía periférica) se ha confirmado que la tasa de conversión de acrilamida a glicidamida (metabolito epóxido reactivo responsable de la neurotoxicidad) es directamente proporcional a la formación de aductos de hemoglobina, pudiendo emplearse éstos como biomarcadores de efectos neurotóxicos periféricos inducidos por la acrilamida [25]. Además, permiten integrar un período de exposición importante si tenemos en cuenta que la vida media de los eritrocitos humanos (4 meses) es relativamente larga.

3.3.3. *Sistema nervioso*

Las medidas neuroquímicas para la detección de neurotoxicidad están limitadas por la inaccesibilidad del tejido diana, de ahí que para identificar y caracterizar la neurotoxicidad sea necesario buscar parámetros en tejidos periféricos que puedan reflejar el comportamiento del mismo parámetro en tejido nervioso [26].

Quizás el ejemplo más significativo de biomarcador específico de neurotoxicidad lo constituya la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) por los pesticidas anticolinesterásicos (organofosforados y carbámicos). Aún cuando dicha actividad está presente en muchos tejidos, su inhibición es determinada generalmente a partir de muestras de sangre (sangre total o plasma) y cerebro (especialmente en Ecotoxicología) [27-30].

Varios parámetros involucrados en la neurotransmisión constituyen la base bioquímica de la interacción sobre dianas en una gran variedad de xenobióticos neurotóxicos. La investigación de estos parámetros ha de llevarse a cabo necesariamente en tejidos periféricos de fácil obtención; entre las células más

empleadas se encuentran las plaquetas, los eritrocitos, los linfocitos y los fibroblastos [26,31].

La MAO es un enzima implicado en la inactivación de catecolaminas. Posee dos isoenzimas caracterizados por diferencias en la especificidad de sustrato: la MAO-A, encargada esencialmente de la desaminación de noradrenalina y serotonina y la MAO-B, implicada en la desaminación oxidativa de dopamina y de otras aminas biógenas (actúa sobre un amplio espectro de feniletilaminas). La MAO-B es un enzima microsomal y la secuencia del enzima procedente de la corteza cerebral humana y de las plaquetas es idéntica por lo que la actividad MAO-B en plaquetas ha sido propuesta como biomarcador de respuesta neurotóxica. La actividad MAO-B en plaquetas posee una aplicación clínica como biomarcador de los efectos farmacológicos de los inhibidores de la MAO empleados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y frente a la exposición a estireno y percloroetileno [31-33].

Otro ejemplo de biomarcador de efectos neurotóxicos, en este caso retardados, lo constituye la esterasa neurotóxica o esterasa diana de la neuropatía (NTE). Algunos compuestos organofosforados (mipafox, metamidofós,...), tras una dosis única y un intervalo de latencia de 1-3 semanas son capaces de inducir una polineuropatía retardada, consistente en una degeneración axonal distal simétrica, que no implica la inhibición de la AChE sino de la NTE [34-36]. A nivel experimental se ha ensayado la determinación de NTE en linfocitos como biomarcador de respuesta, encontrando que existe una buena correlación entre la actividad NTE en cerebro y en linfocitos determinada 24 horas después de una exposición aguda a compuestos organofosforados neurotóxicos.

3.3.4. Aparato renal.-

Existen numerosas sustancias potencialmente nefrotóxicas entre las que cabría destacar los metales pesados, los disolventes orgánicos, los hidrocarburos halogenados y determinados agentes terapéuticos (aminoglucósidos, anfotericina B, paracetamol, AINEs e inmunosupresores). La nefrotoxicidad de estos compuestos puede manifestarse de forma rápida o lo que es más frecuente, de forma insidiosa permitiendo una adaptación funcional del riñón. La detección de alteraciones subclínicas como paso previo a los cambios clínicos irreversibles requiere el uso de biomarcadores de nefrotoxicidad [37-41], los cuales se recogen en la tabla 2.

En la práctica, una recomendación usual es la determinación en orina de, al menos, dos proteínas derivadas del plasma, una de alto peso molecular como la albúmina capaz de detectar en estadios iniciales un defecto en la barrera glomerular, y una de bajo peso molecular que suele ser la proteína de unión al retinol (RBP) o β_2 -microglobulina capaces de detectar precozmente daños sobre el túbulo proximal [42,43]. El daño renal también puede ser valorado mediante la medida de componentes derivados del riñón. Entre los enzimas propuestos se encuentra la determinación en orina del enzima lisosomal β -N-acetil-D-glucosaminidasa (NAG), importante en la detección de daños sobre el túbulo proximal. Además el valor diagnóstico de la β -NAG puede ser mejorado mediante la determinación del isoenzima B (forma liberada en caso de lesión junto a fragmentos de membrana celular)[44]. La destrucción del tejido renal puede ser cuantificada por métodos inmunoquímicos mediante la medida en orina de componentes renales que actuarían como antígenos. Entre ellos se encuentran la alanina aminopeptidasa para el túbulo proximal, la fibronectina para el glomérulo y la glicoproteína de Tamm-Horsfall para el asa de Henle [44-49].

3.3.5. Sistema inmune

Los efectos directos de determinados xenobióticos (dioxinas, PCBs, HCB, inmunosupresores,...) sobre el sistema inmune pueden originar una alteración en el normal funcionamiento del mismo, una disminución de la resistencia a infecciones o tumores, una respuesta autoinmune e incluso una reacción de hipersensibilidad [50,51].

Entre los ensayos recomendados y más frecuentemente utilizados como marcadores biológicos de inmunotoxicidad en humanos tenemos: hemograma completo que incluya el recuento linfocitario, un estudio de la inmunidad mediada por anticuerpos (Ig en suero), el análisis fenotípico de linfocitos (marcadores de superficie) mediante citometría de flujo, el estudio de la inmunidad celular, la medida de autoanticuerpos y marcadores de respuesta inflamatoria y finalmente, la medida de la inmunidad inespecífica [52].

3.3.6. Biomarcadores de daño sobre el ADN

Las innovaciones más recientes permiten la detección de interacciones covalentes entre xenobióticos y proteínas u otras macromoléculas. Muchos de los metabolitos reactivos originados a partir de compuestos orgánicos, forman aductos con proteínas o ADN. Éstos se pueden emplear como marcadores del daño derivado de la exposición a xenobióticos que originan un incremento en el desarrollo de procesos carcinogénicos [3,53,54].

En la tabla 3 se exponen algunos ejemplos de tóxicos capaces de formar aductos de ADN humano. Entre ellos destacan las *N*-nitrosaminas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas aromáticas, las aminas heterocíclicas, las micotoxinas y otros agentes alquilantes quimioterápicos [55,56].

La monitorización biológica se realiza mediante la detección con radioisótopos

como ^{32}P o mediante inmunoensayos (con antisueros específicos frente a aductos de ADN). En la actualidad se están intentando cuantificar estos aductos por medio de anticuerpos [57,58]. Las determinaciones se realizan en sangre (linfocitos), en orina o bien en homogenados de tejidos que puedan obtenerse a partir de biopsias.

3.3.7. Biomarcadores de expresión génica.

El desarrollo de numerosos tumores relacionados con xenobióticos están asociados a expresiones aberrantes de genes que codifican proteínas implicadas en el crecimiento celular, entre las que se encuentran los factores de crecimiento y las oncoproteínas (receptores frente a los factores del crecimiento, otras proteínas oncogénicas y proteínas génicas supresoras de tumores). No obstante, conviene dejar muy claro que estos biomarcadores no sólo se alteran como consecuencia de la exposición a agentes tóxicos. En la tabla 4 se muestran los principales biomarcadores de expresión génica [57,59,60].

Estos biomarcadores han sido estudiados en muestras de plasma o suero mediante ELISA, RIA o inmunotransferencia. También se han detectado en orina o líquido broncoalveolar.

3.3.8. Otros biomarcadores

** Marcadores de daño oxidativo*

Algunos contaminantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados, metales pesados, herbicidas y disolventes) son capaces de originar un daño oxidativo en el organismo. En respuesta a dicho estrés oxidativo, se desencadenan mecanismos adaptativos a través de sistemas de protección cuantificados habitualmente en plasma

que incluyen la razón glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) y las actividades glutatión reductasa, catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa. Las macromoléculas que pueden resultar afectadas incluyen a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [61-63].

** Metalotioneínas*

Las metalotioneínas son unas proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína y capaces de unirse a iones metálicos (Cd, Cu, Hg, Zn, Co, Bi, Ni y Ag). Están implicadas en la regulación del metabolismo de los iones Zn y Cu, permitiendo que éstos puedan ser utilizados por la célula cuando sea necesario. Además actúan almacenando el exceso de grupos tiol con objeto de prevenir el estrés inducido por los radicales libres. Clásicamente se han propuesto como bioindicadores frente a dichos iones metálicos, dado que los niveles de metalotioneínas pueden aumentar significativamente tras la exposición a metales pesados. Sin embargo, además de ser inducibles por estos agentes tóxicos, también lo son por otros entre los que se incluyen los glucocorticoides o incluso determinadas condiciones fisiológicas (cambios nutricionales y embarazo).

Otra limitación que presentan es la relativa a los procedimientos de detección ya que a menudo son más lentos y costosos que el análisis del metal o ión metálico propiamente dicho. No obstante, el desarrollo actual de métodos basados en la detección de anticuerpos frente a estas proteínas o de ensayos de medida de ARN-m constituye un futuro esperanzador [52,64].

** Proteínas de estrés térmico (HSP)*

Constituye un grupo importante de proteínas dependientes de ATP que funcionan como chaperoninas o proteínas tutoras que se unen a proteínas nacientes

evitando que el plegamiento tenga lugar al azar. Inicialmente se les dió este nombre puesto que aparecían como respuesta a situaciones de shock térmico, no obstante, se ha comprobado que éstas aumentan también en respuesta a determinados xenobióticos entre los que merecen especial mención los metales y metaloides (principalmente arsenitos) [65-68]. Vamos a considerar 4 tipos:

* hsp 90 (o estrés -90): localizada en el retículo endoplásmico.

* hsp 70 (o estrés-70): se encuentra en el citosol y muestran una respuesta muy intensa al daño proteico.

* hsp 60 (chaperoninas 60): localizada selectivamente en la mitocondria.

* hsp_s de bajo peso molecular : muestran una homología importante con las proteínas α del cristalino y parece que estan implicadas en la estabilización de los microfilamentos de actina de ahí que puedan constituir biomarcadores de efectos sobre dianas tales como el citoesqueleto.

El *Western Blotting* constituye el método analítico de elección para evaluar dichas proteínas en homogenados tisulares o cultivos celulares.

A modo de conclusión, los biomarcadores constituyen un futuro importante en el campo de la Toxicología por tres razones principales:

1) permiten estimar el efecto biológico sobre un tejido diana;

2) sirven de marcadores de alteraciones preclínicas y de indicadores sensibles de patología siendo, por tanto, de gran utilidad en las estrategias diagnósticas y preventivas;

3) consideran las variaciones interindividuales en la respuesta a xenobióticos así como la susceptibilidad y mecanismos de acción.

Las circunstancias anteriores han hecho que el uso de marcadores de toxicidad

haya aumentado notablemente en la última década, y muy especialmente, en la evaluación de enfermedades progresivas que manifiestan sus síntomas a largo plazo, lo que permite el diagnóstico de la exposición antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente y, a veces, de forma irreversible [69].

BIBLIOGRAFÍA

1. ENTOX/TIWET (The Faculty of the Department of Environmental Toxicology and The Institute of Wildlife and Environmental Toxicology-Clemson University) (1996). Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology. In: Klaassen CD (ed). Casarett and Doull's Toxicology. McGraw-Hill, USA, pp. 883-905.
2. Silbergeld EK, Davis DL (1994) Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. Clin Chem 40: 1363-1367.
3. Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM y Peakall DB (1996) Biomarkers. In: Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM y Peakall DB (eds). Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, London, pp.175-194.
4. Lauwerys RR (1993) Introduction. In: Lauwerys RR, Hoet P (eds). Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. 20 ed. Lewis, USA, pp. 1-13.
5. Lauwerys RR (1991) Occupational Toxicology. In: Amdur M, Doull J, Klaassen C (eds). Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of Poisons. 40 ed. Pergamon, New York, pp. 920-916.
6. Grandjean P, Brown SS, Reavey P, Young DS (1994). Biomarkers of chemical exposure: State of the art. Clin Chem 40: 1360-1362.
7. Derosa CT, Stevens Y-W, Wilson JD, Ademoyero AA, Buchanan SD, Cibulas W, *et al* (1993). The agency for toxic substances and disease registry's role in development and

- application of biomarkers in public health practice. *Toxicol Ind Health* 9(6): 979-995.
8. Repetto M (1997). Diagnóstico de la intoxicación. En: Repetto M (ed). *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 327-333.
 9. Van Cauteren H, de Kok MCM, Van Schooten FJ (1996). Cancer risk evaluation. In: Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (eds). *Toxicology. Principles and applications*. CRC, New York, pp. 384-413.
 10. Bernard A, Lauwerys R (1986). Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J Occup Med* 28: 559.
 11. Tukey RH, Johnson EF (1990). Molecular aspects of regulation and structure of the drug-metabolizing enzymes. In: Pratt WB and Taylor P (eds). *Principles of drug action. The basis of Pharmacology*, 30 ed. Churchill Livingstone, New York, pp. 423-468.
 12. Paine AJ (1995). Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance. *Hum Exp Toxicol* 14: 1-7.
 13. Sanz P (1995). Los polimorfismos genéticos como causa de variabilidad individual de la toxicidad. En: Repetto M (ed). *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 87-116.
 14. Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diepgen TL (1988). The human serum paraoxonase-polymorphism and specificity. *Toxicol Environ Chem* 18: 79-196.
 15. Smolen A, Eckerson HW, Gan KN, Hailat N, La Du BN (1991). Characteristic of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metabol Dispos* 19: 107-112.
-
16. Brealey CJ, Walker CH and Baldwin BC (1980). A-esterase activities in relation to differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. *Pestic Sci* 11: 546-554.
 17. Li WF, Furlong CE, Costa LG (1995). Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 76: 219-226.
 18. Hermans C, Bernard A. (1996). Clara cell protein (CC16): characteristics and potential applications as biomarker of lung toxicity. *Biomarkers* 1: 3-8.
 19. Bernard A, Roels H, Lauwerys R, Witters R, Gielens C, Soumillion A, Van Damme J and De Ley M (1992). Human urinary protein 1: evidence for identity with the Clara cell protein and occurrence in respiratory tract and urogenital tract secretions. *Clin Chim Acta* 207: 239-249.
 20. Boyd MR (1977). Evidence for the Clara cells as a site of cytochrome P-450 dependent mixed-function oxidase activity in lung. *Nature* 269: 713-715.
 21. Mantile C, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Kaytal S and Mukherjee AB (1993). Human Clara cell 10 kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem* 268: 20343-20351.
 22. Guy J, Dhanireddy R and Mukherjee AB (1992). Surfactant-producing rabbit pulmonary alveolar type 2 cells synthesize and secrete an antiinflammatory protein, uteroglobin. *Biochem Biophys Res Com* 189: 662-669.
 23. Bernard A, Roels H, Buchet JP, Lauwerys R (1994). Serum clara cell protein: an indicator of bronchial cell dysfunction caused by tobacco smoking. *Environ Res* 66: 96-104.
 24. Bernard A, Gonzalez-Lorenzo JM, Siles E, Trujillano G, Lauwerys R (1994). Early decrease of serum Clara cell in silica-exposed workers. *Eur Res J* 7: 1932-1937.
 25. Bergmark E, Calleman CJ, Costa LG (1991). Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*

111: 352-363.

26. Costa LG and Manzo L (1995). Biochemical markers of neurotoxicity: research strategies and epidemiological applications. *Toxicol Lett* 77: 137-144.

27. Fairbrother A, Bennett JK (1988). The usefulness of cholinesterase measurement. *J Wildl Dis* 24: 587-590.

28. Mineau P (1991). Cholinesterase inhibiting insecticides: their impact on wildlife and the environment. Elsevier Science, Amsterdam.

29. Peakall D (1992). Biomarkers of the nervous system. In: Peakall D (ed). *Animal Biomarkers as pollution indicators*. Chapman and Hall, London, pp. 19.

30. Hill EF (1988). Brain cholinesterase activity of apparently normal wild birds. *J Wildl Dis* 24: 51.

31. Manzo L, Artigas F, Martínez E, Mutti A, Bergamaschi E, Nicotera P, Tonini M, Candura SM, Ray DE, Costa LG (1996). Biochemical markers of neurotoxicity. A review of mechanistic studies and applications. *Hum Experim Toxicol* 15:S20-S35.

32. Checkoway H, Echeverria D, Moon JD, Heyer N, Costa LG (1994). Platelet monoamine oxidase B activity in workers exposed to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 66: 359-362.

33. Mutti A, Franchini I (1987). Toxicity of metabolites to dopaminergic systems and the behavioural and neuroendocrine effects of organic solvents. *Br J Ind Med* 44: 721-723.

34. Lotti M (1987). Organophosphate-induced delayed polyneuropathy in humans: perspectives for biomonitoring. *Trends Pharmacol Sci* 8: 175-176.

35. Hernández-Jérez AF (1989). Neurotoxicidad retardada inducida por organofosforados (OPIDN): alteraciones de la glucólisis durante la fase de desarrollo. Estudio *in vitro* e *in vivo*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

36. Lotti M (1995). Mechanism of toxicity and risk assessment. *Toxicol Lett* 77: 9-14.

37. Bernard A and Lauwerys R (1989). Epidemiological application of early markers of nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 46: 293-306.

38. Bernard A, Hermans C (1997). Biomonitoring of early effects on the kidney or the lung. *Sci Total Environ* 199: 205-211.

39. Mueller PW, Price RG, Porter GA (1997). Proceedings of the Joint US/EU Workshop: urinary biomarkers to detect significant effects of environmental and occupational exposure to nephrotoxins. *Ren Fail* 19(4): 501-504.

40. Mueller PW, Lash LH, Price RG, Stolte H, Gelpi E, Maack T, Berndt WO (1997). Urinary biomarkers to detect significant effects of environmental and occupational exposure to nephrotoxins. I. Categories of test for detecting effects of nephrotoxins. *Ren Fail* 19(4): 505-521.

41. Mueller PW, Lash LH, Price RG, Stolte H, Gelpi E, Maack T, Berndt WO (1997). Urinary biomarkers to detect significant effects of environmental and occupational exposure to nephrotoxins. VI. Future research needs. *Ren Fail*; 19(4): 575-594.

42. Bernard A, Thielemans N and Lauwerys R (1994). Urinary protein 1 or Clara cell protein: a new sensitive marker of proximal tubular dysfunction. *Kidney Int* 46: S34-S37.

43. Nortier J, Deschodt-Lanckman M, Simon S, Thielemans N, De Prez E, Depierreux M, Richard C, Lauwerys R, Bernard A and Vanherweghem JL (1997). Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase and microprotein measurements. *Kidney Int* 51: 288-293.

44. Bernard A, Thielemans N, Roels H and Lauwerys R. Association between NAG-B and cadmium in urine with no evidence of a threshold. *Occup. Environ Med* 52: 177-

180.

45. Buchet JP, Lauwerys R, Roels H, Bernard A, Bruaux P, Claeys F, Ducoffre G, De Plaen P, Staessen J, Amery A, Lijnen P, Thijs L, Rondia D, Sartor F, Saint Remy A, Nick L (1990). Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* 336: 699-702.

46. Bernard A, Vyskocil A, Roels H, Kriz J, Kodl M and Lauwerys R (1995). Renal effects in children living in the vicinity of a lead smelter. *Environ Res* 68: 91-95.

47. Roels H, Bernard A, Cardenas A, Buchet JP, Lauwerys R, Hotter G, Raims I, Mutti A, Franchin I, Bundschuh I, Stolte H, De Broe ME, Nuyts GD, Taylor SA and Price RG (1993). Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. III. Application to workers exposed to cadmium. *Br J Ind Med* 50: 37-48.

48. Mutti A, Alinovi E, Bergamaschi E, Biagini C, Cavazzini S, Franchini I, Lauwerys R, Bernard A, Roels H, Gelpi E, Rosello J, Ramis I, Price RG, Taylor SA, De Broe M, Nutys GD, Stolte H, Fels LM and Herbort C (1992). Nephropathies and exposure to perchloroethylene in dry-cleaners. *Lancet* 340: 189-193.

49. Hotz P, Lorenzo J, Fuentes E, Cortes G, Lauwerys R and Bernard A (1995). Subclinical signs of kidney dysfunction following short exposure to silica in the absence of silicosis. *Nephron* 70: 438-442.

50. Van Loveren H, Steerenberg PA, Vos JG (1995). Early detection of immunotoxicity: from animal studies to human biomonitoring. *Toxicol Lett* 77: 73-80.

51. Kimber I (1995). Biomarkers of immunotoxicity in man. *Human Exp Toxicol* 14: 148-149.

52. Melancon MJ (1995). Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Allen Burton Jr, Cairns J (eds). *Handbook of ecotoxicology*. Lewis, Florida, pp. 220-240.

53. Meyer MJ, Bechtold WE (1996). Protein adduct biomarkers: state of the art. *Environ Health Perspect* 104: 879-882.

54. Shugart LR. Biomarkers of DNA Damage (1996). In: de Serres FJ, Bloom AD. *Ecotoxicity and Human Health. A Biological Approach to Environmental Remediation*. Lewis Publisher, USA, pp.123-141.

55. Poirier MC, Weston A (1996). Human DNA adduct measurements: state of the art. *Environ Health Perspect* 104: 883-893.

56. Wogan GN (1989). Markers of exposure to carcinogens. *Environ Health Perspect* 81: 9-17.

57. Poirier MC (1997). DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk. *Environ Health Perspect* 105: 907-912.

58. Chang LW, Hsia SMT, Chan P-C, Hsieh L-L (1994). Macromolecular Adducts: Biomarkers for toxicity and carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 41-67.

59. Chang LW, Hsia SMT, Chan P-C, Hsieh L-L (1994). Macromolecular Adducts: Biomarkers for toxicity and carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 41-67.

60. Brandt-Rauf PW (1997). Biomarkers of gene expression: growth factors and oncoproteins. *Environ Health Perspect* 105: 807-816.

61. Hoffman DJ, Heinz GH, Krynitsky AJ (1989). Hepatic glutathione metabolism and lipid peroxidation in response to excess dietary selenomethionine and selenite in mallard ducklings. *J Toxicol Environ Health* 27: 263.

62. Di Giulio RT, Wasburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress.

Environ Toxicol Chem 8: 1103.

63. Hogson E, Levi PE (1994). Introduction to Biochemical Toxicology. 20 ed. Appleton and Lange, Connecticut.

64. Benson WH, Baer KN, Watson CF (1990). Metallothionein as a biomarker of environmental metal contamination. In: McCarthy JF, Shugart LR (eds). Biomarkers of environmental Contamination. Lewis Publ. ,Boca Ratón, pp. 255-266.

65. Caltabiano MM, Koestler TP, Poste G, Grieg RG (1986). Induction of 32 and 34 kDa stress proteins by sodium arsenite, heavy metals and thiol-reactive agents. J Biol Chem 261: 13381.

66. Sanders BM (1990). Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. In: McCarthy JF, Shugart LR (eds). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publ, Boca Ratón, pp. 165.

67. Sanders BM (1993). Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. Crit Rev Toxicol 23: 49.

68. Ryan JA, Hightower LE (1996). Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. EXS 77: 411-424.

69. Ward JBJr, Henderson RE (1996). Identification of needs in biomarker research. Environ Health Perspect 104: 895-900.

Tabla 1. Polimorfismos del citocromo P450 que afectan al uso terapéutico de determinados fármacos.

	Isoenzima
Fármaco metabolizado	
	CYP1A2
	Fenacetina, Cafeína, Paracetamol, Teofilina
CYP1C8/C9/C18	Diazepam, Fenilbutazona, Hexobarbital, Mefenitoína, Clotrimazol, Amitriptilina, Dextrometorfano, Imipramina, Codeína, Perfenacina, Propranolol, Zuclopentixol.
CYP1D6	Cloroxazona, Halotano, Isoniazida, Paracetamol
CYP3A4	Ciclosporina, Eritromicina, Etiniloestradiol, Lidocaína, Nifedipina, Prednisolona, Triazolam

Tabla 2. Biomarcadores de toxicidad renal.

SUERO	
* Marcadores de filtración glomerular	Cretanina, β_2 -microglobulina
* Marcadores de M. Basal Glomérulo	Anticuerpos anti-MBG, laminina
ORINA	
* Proteínas derivadas del plasma	
- Alto peso molecular	Albúmina, Transferrina
- Bajo peso molecular	β_2 -microglobulina, RBP, α_1 -microglobulina, CC16, α -amilasa
* Componentes derivados del riñón	
<i>Enzimas</i>	Glutación-S-Transferasa, β -NAG
<i>Antígenos</i>	
* Glomérulo	Fibronectina, laminina
* Túbulo proximal	Antígenos del borde en cepillo (Fosfatasa alcalina), Alanina aminopeptidasa, proteína de unión a la adenosina desaminasa.
* Asa de Henle	Glicoproteína de Tamm-Horsfall
<i>Otros</i>	Glicosaminoglicanos, prostanoides
* Otros	Aminoácidos, glucosa

Tabla 3. Tóxicos capaces de formar aductos de ADN humano.

N- nitrosaminas	4-(N-nitrosometilamino-1-(3-piridil)-1-butanona
------------------------	---

	(NNK)	N-nitrosodimetilamina (NDMA) Dietilnitrosamina (DEN)
Hidroc. Aromát. Policíclicos		Benzo-a-pireno (BP) 7,12 Dimetilbenzo[a] antraceno (DMBA)
Aminas Aromáticas		2-acetilaminofluorano (2-AAF) 4- aminobifenilo (4-ABP) 4- iminobifenilo (4-IBP)
Aminas Heterocíclicas		2-amino-3,8-dimetilimidazo-quinoxalina
Micotoxinas		Aflatoxina B ₁ Ocratoxina A
Agentes Quimioterápicos		Cisplatino Mitomicina C Procarbazona Dacarbazona 8-metoxipsoraleno
Otros		Luz ultravioleta Daño oxidativo Malondialdehído (endógeno)

Tabla 4. Biomarcadores de expresión génica.

I) FACTORES DE CRECIMIENTO

* *Derivado de las plaquetas (PDGF):* cáncer de mama, varios carcinomas, sarcomas,

linfomas, fibrosis pulmonar, pneumoconiosis y arterosclerosis.

* **Transformante α (TGF α):** cáncer de mama, varios carcinomas y pneumoconiosis.

* **Transformante β (TGF β):** cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer de mama, leucemia, fibrosis hepática y pulmonar, pneumoconiosis.

* **Fibroblastos (bFGF):** cáncer de riñón, cáncer de vejiga y otros cánceres.

* **Epidérmico (EGF):** cáncer de estómago y ovario.

* **Insulínico (IGF):** cáncer de vejiga, cáncer de ovario, hepatitis y cirrosis.

* **Hepatocitos (HGF):** cáncer hepático, hepatitis y cirrosis.

II) ONCOPROTEINAS

II.a) Receptores frente a los factores de crecimiento:

* **Receptor del factor de crecimiento de transmembrana** (codificado por el oncogén *erbB-2*): cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de pulmón, otros.

* **Receptor frente al factor de crecimiento epidérmico -EGFR-** (codificado por el oncogén *c-erbB-1*): cáncer de pulmón, otros carcinomas.

II.b) Proteínas oncogénicas:

* **proteína G asociada a la membrana o p21 [21kDa]** (codificada por el oncogén *ras*): cáncer de pulmón, cáncer de colon, angiosarcoma hepático, otros tipos de cáncer.

* **proteína nuclear [64 kDa] de unión al ADN o p54 [54 kDa]** (codificadas por el oncogén *myc*): cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vejiga.

II.c) Proteínas génicas supresoras de tumores:

* **fosfoproteína nuclear p53 [53 kDa]** (codificada por el gen supresor tumoral *p53*): hepatocarcinoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon y linfomas.