



Salud Pública de México

ISSN: 0036-3634

spm@insp.mx

Instituto Nacional de Salud Pública
México

Schmidt, Charles W.

TOX21 Nuevas dimensiones de las pruebas de toxicidad

Salud Pública de México, vol. 52, núm. 6, noviembre-diciembre, 2010, pp. 561-567

Instituto Nacional de Salud Pública

Cuernavaca, México

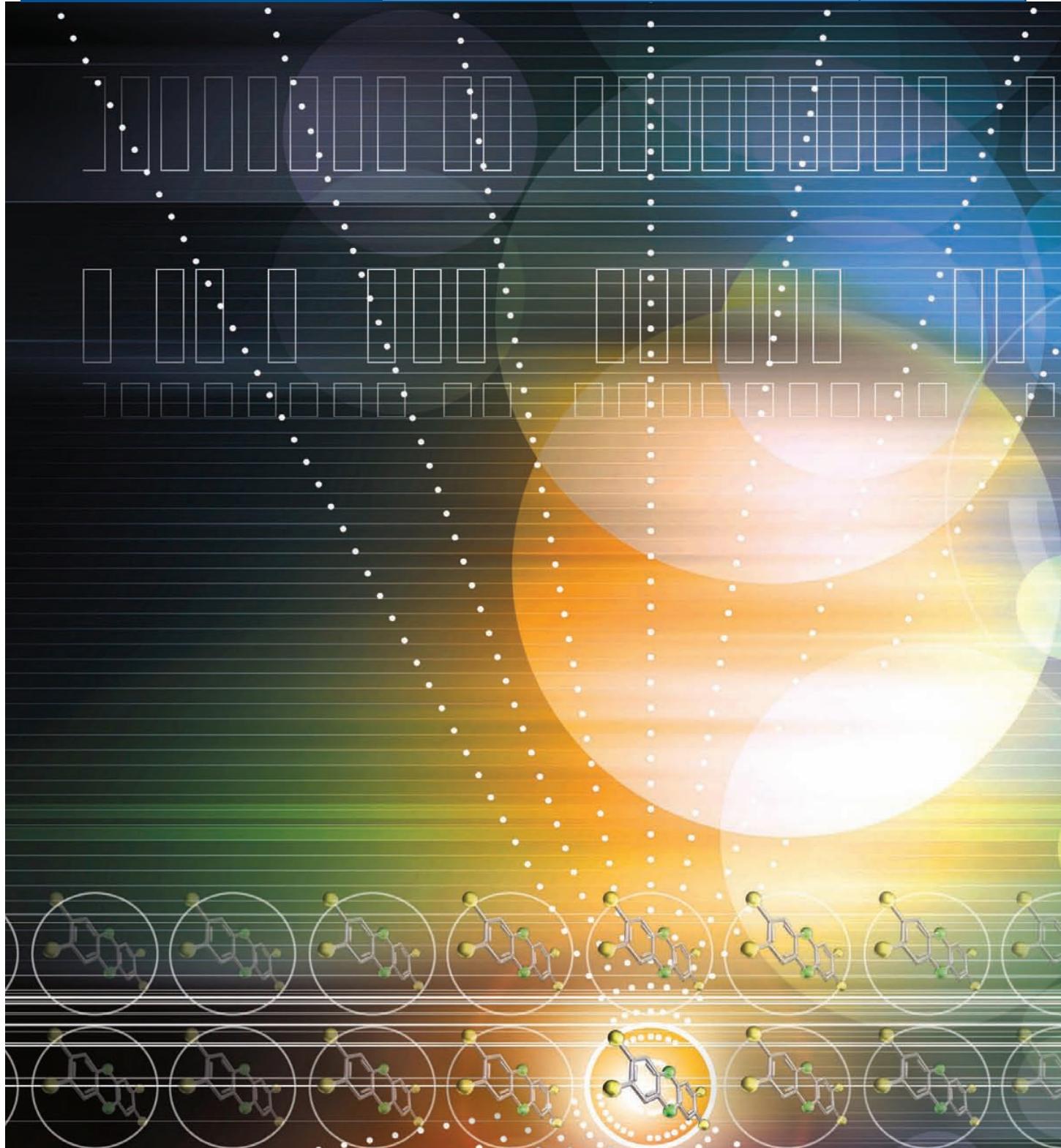
Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10618968009>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



* Publicado originalmente en *Environmental Health Perspectives*, volumen 117, número 8, agosto 2009, páginas A348-A353.



Imagen: Media Bakery, Matthew Ray/EHP

TOX21

Nuevas dimensiones de las pruebas de toxicidad*

En la planta baja del Centro de Genómica Química (NCGC) de los Institutos Nacionales de Salud en Rockville, Maryland, un laboratorio automatizado que costó 10 millones de dólares pasa todo el día y toda la noche investigando sustancias químicas a velocidades que ningún equipo de investigadores humanos podría igualar jamás. En una semana, dependiendo de la naturaleza del ensayo, puede arrojar hasta 2.2 millones de puntos de datos moleculares derivados de miles de sustancias químicas probadas cada una en 15 concentraciones diferentes.

¿Es éste el nuevo rostro de la toxicología? Muchos expertos opinan que la respuesta podría ser que sí. El uso de herramientas de selección de alto rendimiento como el sistema robótico del Centro Nacional de Genómica Química (NCGC), en combinación con una creciente variedad de ensayos *in vitro* y de métodos computacionales, están revelando la manera en que las sustancias químicas interactúan con blancos biológicos. Los científicos opinan cada vez más que estas herramientas podrían generar evaluaciones más exactas de riesgos de toxicidad humana que los que se predicen actualmente mediante las pruebas realizadas en animales.

Es más, se considera que los enfoques analíticos *in vitro* son la mejor esperanza para el enorme atraso en las pruebas de sustancias químicas en el mercado. Las evaluaciones varían, pero se emplean decenas de miles de sustancias químicas en productos de consumo sin conocimiento alguno sobre su toxicidad potencial. Mientras tanto, se requieren años y millones de dólares para evaluar los riesgos de una sola sustancia química utilizando pruebas en animales.

“En casi todos los aspectos, esto tiene la apariencia de un cambio de

paradigma en el campo”, dice John Bucher, director adjunto del Programa Nacional de Toxicología (PNT). “Constituye un gran cambio el pasar de utilizar estudios en animales, con los cuales nos sentíamos a gusto, a descansar sobre todo en los resultados de los ensayos bioquímicos o basados en células para tomar decisiones sobre las políticas de salud. Este es un enfoque totalmente diferente que proporciona un tipo diferente de información.”

La agrupación Tox21

Con el apoyo de la nueva tecnología, el PNT, el NCGC y la Agencia de Protección al Ambiente de EUA (EPA) se están asociando para lograr que avance el estado de las pruebas de toxicidad. Específicamente, los socios buscan identificar nuevos mecanismos de actividad química en las células, priorizar las sustancias químicas que aún no han sido probadas para realizar evaluaciones más amplias, y desarrollar mejores modelos para predecir la respuesta humana a las sustancias tóxicas. Esta agrupación, conocida como Tox21 y formalizada el año pasado en un Memorándum de Entendimiento, responde a un reto

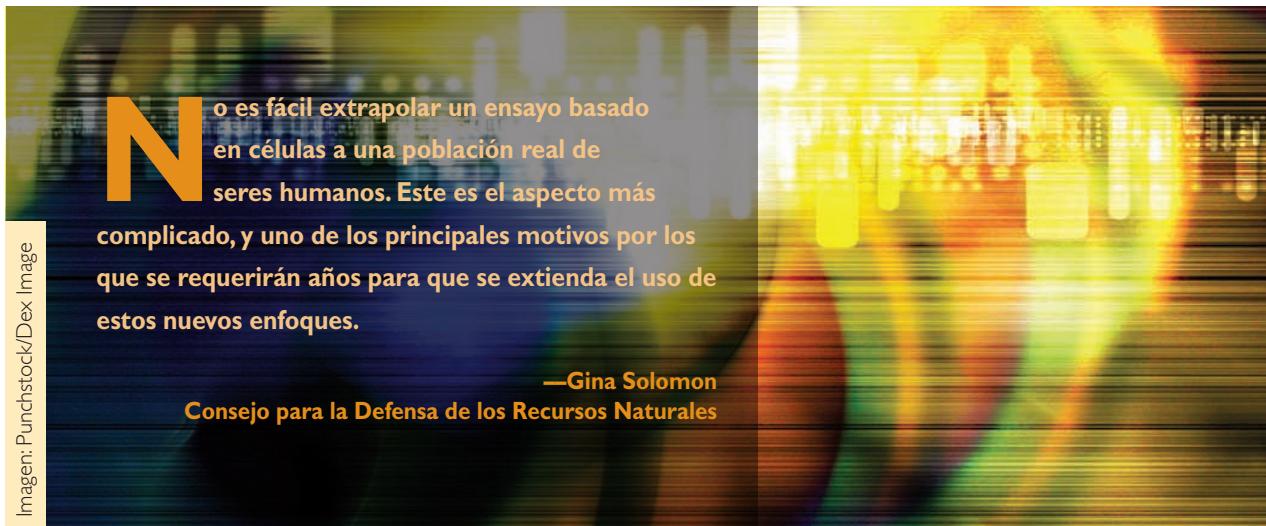
planteado por el Consejo Nacional de Investigación (en inglés, NRC) en su informe del año 2007 *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy* [Pruebas de toxicidad en el siglo XXI: Una visión y una estrategia]. Este informe demanda una toxicología transformadora para pasar “de un sistema basado solamente en pruebas completas en animales a uno basado principalmente en métodos *in vitro* que evalúe los cambios en los procesos biológicos utilizando células, líneas celulares o componentes celulares, preferiblemente de origen humano.” En marzo de 2009, la EPA publicó su propia agenda de Tox21, *The U.S. Environmental Protection Agency's Strategic Plan for Evaluating the Toxicity of Chemicals* [Plan estratégico para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas de la Agencia de Protección al Ambiente de EUA], la cual afirma que “la explosión de nuevas herramientas científicas en las ciencias de la computación, de la información y moleculares ofrece una gran promesa para... fortalecer las pruebas de toxicidad y los enfoques de la evaluación de riesgos.”

El concepto de añadir más datos mecanísticos a la evaluación de riesgos no es nuevo. Antes de Tox21, los

s un cambio importante pasar de utilizar los estudios en animales, con los cuales nos sentimos cómodos, a basarnos principalmente en resultados de ensayos bioquímicos o basados en células para tomar decisiones saludables sobre las políticas. Este es un enfoque totalmente diferente que proporciona un tipo distinto de información.

—John Bucher
Programa Nacional de Toxicología

Imagen: Punchstock/Dex Image



modelos de farmacocinética basada en la fisiología (en inglés, PBPK), la toxicogenómica y otros enfoques relacionados ya estaban llevando a cabo evaluaciones de riesgos con bases más mecanísticas. Pero esa investigación no necesariamente se traducía en cambios en las políticas de regulación que gobiernan la exposición humana, argumenta Lorenz Rhomberg, director de la Corporación Gradient, compañía asesora de evaluación de riesgos con sede en Cambridge, Massachusetts. Pese a que cuentan con datos mecanísticos, los funcionarios de salud de la EPA se han mostrado reacios a utilizar esos datos al establecer las normas de exposición, debido a que en muchos casos justificarían límites más elevados de exposición permisible que los que sugieren los supuestos más conservadores. En cambio, es más frecuente que la EPA se base en supuestos conservadores sobre el modo en que las sustancias químicas afectan a los seres humanos. "La EPA se atiene a los precedentes y hace las cosas tal como las ha hecho en el pasado para no ser arbitraria", explica Rhomberg. "De modo que hay mucha inercia en el sistema".

Robert Kavlock, director del Centro Nacional de Toxicología Computacional de la EPA, dice que la principal diferencia entre Tox21 y la investigación toxicológica molecular anterior radica en la escala. Los científicos generalmente se han enfocado en investigaciones basadas en hipótesis, por ejemplo, sobre el modo en que una sustancia química interactúa con un objetivo celular específico que supuestamente desempeña un papel en la toxicidad, explica. Tox21, por otra parte, se basa en métodos de selección no sesgados que no suponen ningún conocimiento previo sobre lo que una sustancia química podría llegar a hacer en la célula. Idealmente, esas investigaciones revelarán redes moleculares completamente nuevas que coordinan la toxicidad, dice. Kavlock hace énfasis en que con su nueva estrategia la EPA está demostrando que está dispuesta a tomar en serio los datos mecanísticos. "Tox21 se produjo con una aportación de los miembros directivos de todas las oficinas de la EPA", señala. "Existe un reconocimiento explícito del hecho de que estamos en una transición científica y de que la parte de negocio de

la agencia necesita avanzar al parejo de ella."

Un nuevo enfoque en las vías de ingreso

La premisa esencial de Tox21 es que los científicos pueden inferir daño humano de las sustancias químicas con base en la manera en que activan las vías de ingreso de toxicidad en las células. El término "vía de ingreso de toxicidad" se refiere a una cadena de sucesos químicamente inducida que conduce a un efecto adverso como la formación de tumores, explica Raymond Tice, jefe de la División de Investigación Biomolecular del PNT. Tice hace énfasis en que estas vías de ingreso comúnmente coordinan procesos tales como la señalización hormonal o expresión genética. Sólo cuando se ven alterados por sustancias químicas u otros factores estresantes ocurre un daño, señala. "Estamos hablando de vías de ingreso que ocurren todo el tiempo bajo circunstancias típicas", explica Tice. La señalización de los receptores de estrógeno, por ejemplo, es un rasgo distintivo de la biología celular

normal, "pero si se regula inadequadamente a la alza o la baja", dice Tice, "puede provocar problemas de desarrollo".

Actualmente los científicos están intentando identificar y trazar un mapa de las vías de ingreso de toxicidad y las maneras en que las sustancias químicas interactúan con los procesos bioquímicos que intervienen en la función celular, en la comunicación y en la capacidad de adaptarse a los cambios del medio ambiente. Idealmente estos esfuerzos identificarán "nódulos" moleculares vulnerables a la exposición a las sustancias químicas. Un ejemplo de este tipo de nódulos podría ser una proteína que –al ligarse químicamente– bloquea o amplifica la señalización de los receptores de estrógenos, alterando la función normal de la vía de ingreso. A esto se le llama "perturbación de la vía de ingreso".

Después de identificar una perturbación, los científicos tienen que colocarla en un contexto más amplio de toxicidad en animales vivientes. Esto requiere la extrapolación de

una dosis de sangre o tejido tóxico de una respuesta basada en células, que puede lograrse con el modelo PBPK y métodos de computación basados en los circuitos celulares humanos, señala Gina Solomon, científica decana del Consejo para la Defensa de los Recursos Naturales, organización sin fines de lucro. Los ensayos basados en células ofrecen algunas ventajas a este respecto. A diferencia de las pruebas realizadas en animales, que están limitadas por el costo y otros recursos a apenas unas cuantas dosis, los ensayos *in vitro* pueden probar las sustancias químicas en un amplio rango de dosis que podrían proporcionar mejor información sobre los efectos de las dosis bajas en los seres humanos, afirman los científicos.

Todo el proceso requiere de un acto de fe en que las perturbaciones y los esfuerzos de modelado asociados a éstas predecirán con precisión los efectos de la exposición a las sustancias químicas en los seres humanos, dice Solomon. "Y por esto los evaluadores de riesgos de la EPA tienen tanta dificultad con este tipo de datos",

explica. "No es fácil extraer de [los resultados] un ensayo basado en células a [los efectos de la exposición] en una población real de seres humanos. Este es el aspecto más complicado de la evaluación de riesgos basada en las vías de ingreso, y éste es uno de los principales motivos por los cuales se requerirán años para que se extienda el uso de estos nuevos enfoques."

El camino que se vislumbra

Los expertos prevén que Tox21 se desplegará en dos fases. En la primera, las perturbaciones podrían guiar la selección de sustancias químicas para pruebas ulteriores en animales. Con este enfoque, se les podría dar un rango de alta prioridad a las pruebas de aquellas sustancias químicas que, por ejemplo, provocan estrés oxidativo (el cual puede conducir a la inflamación) o impiden la reparación del ADN (incrementando potencialmente el riesgo de cáncer), mientras que aquellas que no inducen estos efectos inmediatamente preocupantes podrían ser relegadas a la catego-

Ahora estamos priorizando las sustancias químicas con base en otros criterios, tales como producción, volumen, la probabilidad de que los seres humanos se vean expuestos a ellas, o la semejanza de su estructura con la de otras sustancias químicas con inconvenientes conocidos. Consideramos que al incorporar más biología a la priorización podemos seleccionar mejor las sustancias químicas adecuadas para realizar pruebas en animales.

—Robert Kavlock
Centro Nacional de Toxicología Computacional

Imagen: Punchstock/Dex Image

ría de una inquietud menor. La EPA, a través de su programa ToxCast^{MR}, ya está explorando cómo pueden utilizarse los sistemas de alto rendimiento para la priorización, como el PNT, de acuerdo con su propio programa de investigación para el siglo XXI: la Hoja de Ruta del PNT que se introdujo en el año 2004.

Kavlock señala que existe una necesidad crucial de priorizar las sustancias químicas sobre una base más biológica. "Ahora estamos priorizando las sustancias químicas con base en otros criterios, como el volumen de producción, la probabilidad de que los seres humanos se vean expuestos a ellas, o la semejanza de su estructura con la de otras sustancias químicas con inconvenientes conocidos", añade. "Consideramos que al incorporar más biología a la priorización podemos seleccionar mejor las sustancias químicas correctas para probarlas en animales. También podríamos llevar a cabo estas pruebas de una manera más eficiente."

En la segunda fase de Tox21, que según algunos colaboradores puede prolongarse varias décadas a partir de ahora, las perturbaciones de las vías de ingreso podrían remplazar a las pruebas en animales para la fijación de las normas de seguridad de las sustancias químicas. En comparación con la priorización, esta es una meta más desafiante y difícil de alcanzar. Los toxicólogos han basado las normas humanas en los resultados de las pruebas en animales durante más de 50 años. Las normas para las sustancias químicas no cancerígenas, por ejemplo, se definen por la dosis máxima que no provoca daños a los animales en un estudio de toxicidad, dividida entre diversos factores numéricos para reflejar la incertidumbre de los datos. En teoría, los seres humanos pueden tolerar esta "dosis de referencia" diariamente, sin riesgos, durante toda una vida.

Por otra parte, los cancerígenos son regulados con un "factor de la

pendiente de cáncer" que los científicos extrapolan matemáticamente a partir de dosis que provocan tumores en los roedores. Es frecuente que aparezcan tumores únicamente cuando se administran dosis elevadas durante un periodo de hasta dos años. Aun así, los reguladores de la EPA tienen el cuidado de suponer una linealidad de la dosis para los cancerígenos, lo cual significa que, en teoría, incluso una sola molécula de la sustancia podría interactuar con el ADN y provocar cáncer. En otras palabras, hasta que queden convencidos de lo contrario, los reguladores de la EPA dan por sentado que no existe un umbral de dosis para los cancerígenos por debajo del cual el riesgo de cáncer sea insignificante. Por ende, el factor de la pendiente de cáncer tiene como fin limitar el número de cánceres esperados en la población expuesta a no más de 1 en un millón de personas.

El hecho de que las pruebas realizadas en animales se basan en dosis mucho más elevadas que las que se encuentran en el medio ambiente plantea algunas preguntas difíciles de responder sobre qué tan relevantes son para los seres humanos. "Me he pasado casi 40 años como toxicólogo intentando relacionar los estudios en animales a dosis elevadas con el riesgo de las dosis bajas para los seres humanos", dice Melvin E. Andersen, director del Programa de Ciencias de Seguridad Química de los Institutos Hammer de Ciencias de la Salud, organismos sin fines de lucro. "Ahora considero que eso es imposible de lograr."

Pero los expertos están divididos en cuanto al grado en el que las pruebas *in vitro* pueden remplazar por completo a los animales en la evaluación de riesgos. Anderson opina –con el respaldo, dice, del informe de la NCR– que llegar a remplazar las pruebas en animales con las pruebas de las perturbaciones de las vías de ingreso de toxicidad debe ser una

meta fundamental. "La EPA y el PNT quieren utilizar los resultados de las pruebas *in vitro* para predecir los resultados de la aplicación de dosis elevadas en animales", dice. "Pero es al revés: necesitamos identificar objetivos celulares y predecir entonces qué les ocurrirá a las personas con concentraciones relevantes para el medio ambiente. Los métodos *in vitro* proporcionarán mejor información para tal evaluación de los riesgos para la salud que los estudios en animales. Necesitamos mantenernos al día con el rumbo que está tomando la biología moderna. De lo contrario, mucho de lo que hacemos en las pruebas de toxicidad será considerado irrelevante."

Daniel Krewski, director del Centro de Evaluación de Riesgos para la Salud de la Población R. Samuel McLaughlin de la Universidad de Ottawa y presidente del panel de la NCR que elaboró el informe del año 2007, comparte esta opinión. "Déjenme decirlo claramente", dice. "El incentivo de nuestra visión, y también su belleza, consiste en que nuestras regulaciones ya no tendrán que basarse en evitar lo que vemos en los animales sino en evitar las perturbaciones que observamos en las pruebas basadas en células."

Sin embargo, el enfoque de la EPA es más conservador y se enfoca en priorizar las sustancias químicas para investigaciones ulteriores en animales, más que en eliminar por completo el uso de animales. Kavlock subraya que si las nuevas tecnologías ayudan a los científicos a seleccionar las sustancias químicas adecuadas para probarse en animales, se avanzará mucho en la eficacia y eficiencia del proceso. "No es fácil predecir el futuro", señala Kavlock. "De modo que yo no admitiría ni descartaría que algún día se puedan hacer [pruebas de toxicidad] sin animales. Pero por lo que toca al futuro previsible, el estado de la ciencia sencillamente no toma en cuenta esa posibilidad."

Superación del status quo

Lo que tienen a su favor las pruebas en animales –aparte de su larga historia en la toxicología y del hecho de que se ha construido una estructura reguladora en torno a sus resultados– es que integran las respuestas a diferentes sistemas fisiológicos. Algunas veces la toxicidad no es causada por un compuesto “madre” –la sustancia química en sí a la que se ve expuesto un animal o un ser humano– sino por un metabolito de ese compuesto. Es más, algunas sustancias químicas, incluyendo ciertos compuestos que afectan el desarrollo y neurotóxicos, no resultan tóxicas en el punto exposición sino en otras partes del cuerpo. John Doull, profesor emérito del Centro Médico de la Universidad de Kansas, da el ejemplo de ciertas sustancias químicas que se concentran en determinadas regiones del cerebro cuyos efectos tóxicos se reflejan en otras partes, tal vez en el andar o en la visión.

Sin embargo, los ensayos basados en células podrían no detectar estos efectos metabólicos u otros subsiguientes. Un estudio realizado, digamos, en hepatocitos aislados del hígado, podría perder de vista la toxicidad que ocurre únicamente en el hígado entero, donde las células contiguas pueden metabolizar sustancias químicas madres convirtiéndolas en formas tóxicas, por ejemplo, mediante lo que se conoce como una activación mediada por el citocromo P450.

Christopher Austin, director del NCGC concede que la activación plantea a la investigación *in vitro* un reto difícil, pero no insuperable. “Es un problema muy difícil con el cual lidiar”, señala Austin. “Y lo estamos abordando por medio de una importante iniciativa de desarrollo tecnológico en la que intervienen coculturas de hepatocitos y células sensibles al citocromo P450. De este modo solamente vemos la respuesta

mediada por el citocromo P450 si el compuesto madre es metabolizado.”

Otro inconveniente de las pruebas *in vitro* atañe a la integridad del compuesto. La mayoría de los laboratorios almacenan las sustancias químicas en dimetil sulfóxido (DMSO), un solvente popular que puede disolver compuestos tanto polares (es decir, miscibles en agua) como no polares. Pero el DMSO también puede absorber agua de la atmósfera y por ende degradar los compuestos almacenados en él, explica Adam Yasar, un investigador adjunto del NCGC. “El agua absorbida puede hacer que los compuestos se precipiten, lo que interfiere con el análisis”, señala. “Uno podría no saber exactamente qué es lo que está probando.”

Yasar añade que el NCGC sortea este problema probando compuestos en muchas concentraciones diferentes. La redundancia de este proceso lleva a la obtención de datos más confiables, dice. Pero los laboratorios que se fían de los análisis de dosis únicas podrían encontrarse con problemas, añade. Kavlock señala que Tox21 planea llevar a cabo una caracterización química de las soluciones que se están probando para confirmar la identidad de la sustancia química, su pureza y su estabilidad en DMSO, un paso costoso pero necesario, dice, para generar confianza en los datos resultantes.

La agenda actual

Los investigadores de Tox21 están realizando ahora experimentos de pruebas de constatación para demostrar que las perturbaciones de las vías de ingreso pueden predecir toxicidades ya documentadas en estudios en animales completos. Su investigación se enfoca en parte en aproximadamente 10 000 compuestos, incluyendo sustancias químicas industriales, ingredientes activos e inertes de los plaguicidas, contaminantes del agua

potable y medicamentos aprobados, entre otros. Según una reseña publicada por Richard Judson y sus colegas en el número de EHP de mayo de 2009, existe por lo menos información limitada sobre los riesgos para unos dos tercios de estos compuestos, e información toxicológica detallada para aproximadamente una cuarta parte de ellos. Los compuestos están siendo investigados tanto en la EPA –a través de ToxCast^{MR}– como en el NCGC, que está a punto de adquirir otro laboratorio de robótica dedicado exclusivamente a la investigación de Tox21. Kavlock señala que las pruebas de selección se realizan de acuerdo con un rango de criterios de valoración, tales como las interacciones con los receptores nucleares, el incremento de la regulación del gen supresor de tumores p53 y los efectos sobre los mecanismos de reparación del ADN.

Mientras tanto, los científicos están trabajando para identificar y trazar un mapa de todas las vías de ingreso posibles. No obstante, hay desacuerdos en cuanto al número de vías de ingreso que podrían participar en la toxicidad. Argumentando que la biología tiene límites definibles establecidos por el genoma, Andersen afirma que ese número es finito. “¿Cuántas vías de ingreso habría?”, pregunta. “¡No lo sé, he sugerido, un poco en broma, que hay exactamente 132! Lo principal es que la biología tiene que ser robusta, lo cual nos obliga a creer que estas vías de ingreso se conservan de una especie a otra [y a través de la evolución]. Mi opinión personal es que todas las vías de ingreso de toxicidad giran en torno a respuestas al estrés y al control de la expresión génica.” Viéndolo así, añade Andersen, múltiples clases de sustancias químicas podrían compartir las mismas vías de ingreso de toxicidad pese a las diferencias entre sus estructuras físicas.



No obstante, Katrina Waters, científica investigadora decana del Laboratorio Nacional del Noroeste del Pacífico en Richland, Washington, afirma que el número de vías de ingreso de toxicidad podría ser prácticamente ilimitado. "Cuando tomas en cuenta la diversidad de sustancias químicas que están siendo sometidas a pruebas y sus efectos potenciales, no creo que sea posible decir que un número finito de vías de ingreso predecirá todos los eventos adversos", dice. "Creo probable que cada clase de sustancias químicas tenga su propio conjunto de vías de ingreso de toxicidad para cualquier evento adverso caracterizado para esa clase."

El debate está lejos de ser semántico: el número de vías de ingreso de toxicidad refleja la cantidad de trabajo que se requiere en última instancia para alcanzar las metas de Tox21. Por ejemplo, Waters explica que si interviniieran únicamente 25 vías de ingreso en la apoptosis, o en la muerte celular programada, los científicos podrían modelar matemáticamente

esas vías de ingreso y suponer que captan eventos adversos para cada clase de sustancias químicas. "No tendrías que crear un nuevo modelo matemático para cada clase; sencillamente podrías reutilizar los mismos modelos [y aplicarlos a diferentes sustancias químicas]", señala. "Pero si tienes un número ilimitado de vías de ingreso e interacciones condicionales entre las vías de ingreso, entonces tienes que repetir el proceso de modelado para cada nueva clase de sustancias químicas [que esté siendo investigada]."

A partir de ahora, Tox21 ofrece la oportunidad de otorgar las ventajas de una investigación de alto rendimiento sobre toxicología y evaluación de riesgos. Pero su promesa se ve templada por los enormes retos de investigación que se avecinan. Los científicos apuntan nada menos que a elaborar un mapa completo de los circuitos celulares que establecen la toxicidad, a partir de incalculables millones de puntos de datos, convertidos de algún modo en algo útil. Los funcionarios reguladores tendrán

que idear maneras de remplazar las decisiones tomadas según criterios de valoración tradicionales con decisiones basadas en los hallazgos basados en células, dice Andersen.

Los funcionarios también tendrán que desarrollar nuevas estrategias para explicar estos hallazgos al público. "La persona promedio de la calle comprende que cuando algo ocasiona defectos de nacimiento en una rata, es también preocupante para los seres humanos", dice Solomon. "Pero cuando uno basa sus políticas, digamos, en las perturbaciones de la homeostasis de la hormona tiroidea, es más difícil que el público sepa qué pensar al respecto."

Charles W. Schmidt, Maestro en Ciencias, de Portland, Maine, ha escrito para las revistas *Discover Magazine*, *Science* y *Nature Medicine*. En 2002 obtuvo el Premio de Periodismo sobre la Ciencia en la Sociedad de la Asociación Nacional de Escritores Científicos.