

# Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos de xenobióticos

Patricia Ostrosky-Wegman,<sup>1</sup> María Eugenia Gonsebatt\*

Los efectos tóxicos derivados de la exposición a factores xenobióticos pueden manifestarse a corto plazo, cuando la exposición se presenta en grandes dosis (exposición aguda), o bien, a largo plazo cuando la exposición es en bajas dosis durante un período largo (exposición crónica).

Se tiene un buen conocimiento de los efectos inmediatos de las exposiciones humanas ocupacionales, ambientales o accidentales que van desde cefaleas, irritación de las mucosas, de la piel y del pulmón, hasta el daño serio en el funcionamiento hepático, en el sistema reproductivo, en el sistema nervioso, etc.

Los efectos a largo plazo son menos conocidos, pero son los más preocupantes por ser los padecimientos hereditarios, el daño reprotóxico, el cáncer y las enfermedades crónico-degenerativas como son las cardiovasculares, el mal de Parkinson, el Alzheimer y aun la diabetes (Figura 1). De todas ellas la carcinogénesis producto de la exposición a sustancias químicas es de la que más información se tiene. Se sabe que existe un período de latencia muy largo entre la exposición y la aparición de los primeros síntomas del padecimiento, por ejemplo en el caso de la exposición a asbesto se han reportado 55 años de latencia hasta que el paciente muestra síntomas de cáncer pulmonar. En el caso de los padecimientos hereditarios se sospecha que podrían pasar varias generaciones antes de que las manifestaciones patológicas se hagan evidentes.

La rama de la toxicología que trata de identificar y analizar los efectos derivados de la exposición a sustancias tóxicas en el material genético, así como descubrir los posibles mecanismos de acción y las consecuencias a nivel de la patología humana

es la genética toxicológica. También plantea el conocimiento de los efectos a las especies vegetales y animales, puesto que al afectar el ecosistema se afecta la salud humana.

Ante la gran cantidad de sustancias a las que podemos estar expuestos se han desarrollado diferentes sistemas de prueba en los que se realizan ensayos *in vitro* que utilizan sistemas bacterianos y líneas celulares, organismos centinelas como son la *Tradescantia* y la *Drosophila* así como pruebas en las que se exponen mamíferos *in vivo*, a todas estas pruebas se les denomina "pruebas a corto plazo". La evaluación de efectos genotóxicos en individuos expuestos por razones naturales, accidentales, laborales y médicas es una alternativa al estudio epidemiológico, el cual requiere un número muy grande de muestras, es relativamente costoso y necesita descartar un sin fin de factores de confusión. A este tipo de estudios se les conoce como epidemiología molecular y plantea el estudio de biomarcadores en las células de individuos expuestos.

Se define como un biomarcador a un indicador de la variación de componentes o procesos bioquímicos o celulares que pueden ser medidos en muestras biológicas. Se consideran tres tipos de biomarcadores: de exposición, de efecto temprano y de susceptibilidad. El biomarcador de exposición es la sustancia o sus metabolitos medidos en fluidos internos. El biomarcador de efecto temprano es un cambio en el proceso celular, bioquímico o genético que indica que ha ocurrido un daño en el organismo. El marcador de susceptibilidad está dado por la respuesta individual dependiente de las características propias del organismo. La epide-

<sup>1</sup>Departamento de Genética y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Patricia Ostrosky-Wegman, Departamento de Genética y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. A. P. 70228. Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F.

miología molecular propone el uso de estos biomarcadores para descubrir efectos tempranos previos al desenlace patológico. La detección temprana permitirá la interrupción de la exposición y por lo tanto, la prevención de la enfermedad. Se considera que la medicina del siglo XXI deberá ser preventiva y no curativa, pues es mucho menos costosa la prevención de enfermedades que su tratamiento. no solo desde el punto de vista económico, sino en cuanto a sufrimiento humano.

Cuando se habla de enfermedades producidas por tóxicos, es necesario conocer el factor causal de la enfermedad, la dosis externa y la dosis interna. Paradeterminarla dosis externa, en general cuando se refiere a un factor ingerido se puede estimarla dosis, cuando la exposición ambiental se utilizan monitores ambientales aunque lo ideal es utilizar monitores individuales. Por la variación existente entre los individuos, las dosis externas no son suficientes, por lo que se requiere medir la dosis de la sustancia de interés o sus metabolitos en fluidos biológicos, siendo los más utilizados sangre, orina saliva y aire expirado.

La determinación de sustancias y sus metabolitos no es un proceso sencillo, puesto que requiere de métodos bien estandarizados y con un control de calidad adecuado. Aun dosis internas similares interaccionan de manera diferente con el material biológico de ahí que se haya propuesto el uso de marcadores de dosis biológicamente activas, para ello se mide la formación de aductos con el DNA o con las proteínas. La evaluación de aductos es un proceso complejo que requiere de la utilización de postmarcaje con <sup>32</sup>P y de la síntesis de nucleótidos con aductos de la sustancia que se piensa evaluar y que son usados como estándares.<sup>1,2</sup>

Los marcadores de daño temprano se han asociado en su mayoría con procesos que miden el daño al DNA. La mayoría de estos biomarcadores no son específicos, sin embargo, en muchos casos pueden cumplir funciones aun de biomarcadores de exposición como en los casos de individuos expuestos a sustancias de vida media corta, por lo que al tratar de evaluar dichas sustancias en los fluidos biológicos, pasado cierto tiempo éstas no pueden ser detectadas. Sin embargo, el daño al

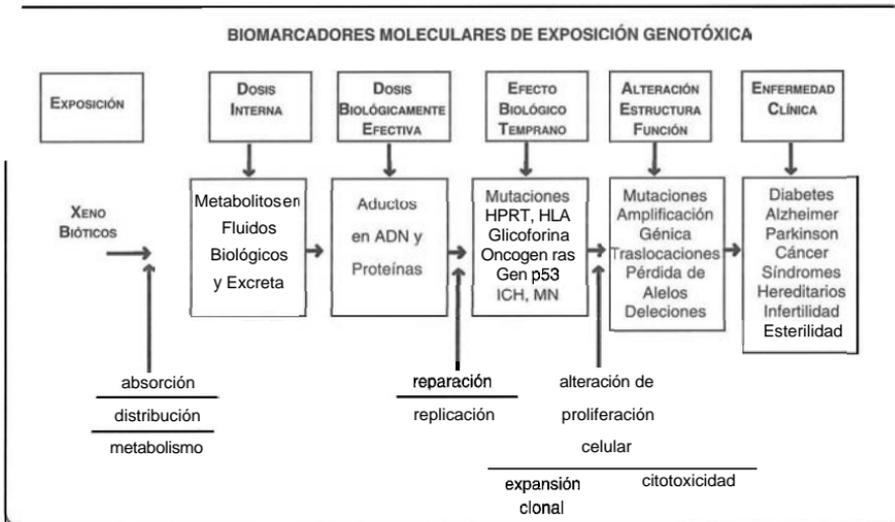


Figura 1. Biomarcadores utilizados para evaluar individuos expuestos a sustancias genotóxicas

DNA puede ser detectado hasta varios meses después.<sup>3</sup>

Existen diferentes pruebas para medir el daño temprano como son la determinación directa de daño al DNA por electroforesis unicelular o "prueba del cometa",<sup>4</sup> la síntesis no programada de DNA,<sup>5</sup> la determinación de intercambio de cromátidas hermanas y de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales.<sup>6-8</sup> En tiempos recientes se ha propuesto la evaluación de micronúcleos (MN) mismos que se originan ya sea por fragmentos de DNA o por cromosomas rezagados; utilizando anticuerpos específicos contra el centrómero, puede determinarse si el MN contiene un fragmento o un cromosoma concentrómero,<sup>5</sup> además de que la evaluación de MN es menos compleja que la de aberraciones, su evaluación puede realizarse en células que se han dividido con anterioridad y no requieren ser cultivadas, lo que permite la evaluación en células epiteliales descamadas de la mucosa bucal así como en las células descamadas de la vejiga y que se obtienen en muestras de orina.<sup>8</sup>

Nuevos métodos moleculares han sido propuestos para la evaluación de aberraciones cromosómicas, mediante el uso de sondas moleculares acopladas a fluorocromos de diferentes colores pueden identificarse cada uno de los pares cromosómicos, permitiendo identificar con rapidez translocaciones en células en metafase, lo que se hace al encontrarse un cromosoma con más de un color; este método se conoce como "cromosomas pintados".<sup>9</sup> Mediante sondas específicas de ciertas regiones cromosómicas acopladas también a fluorocromos y conocidas como "FISH" hibridación fluorescente *in situ*, pueden identificarse tanto en metafase como en interfase aneuploidias cromosómicas y también amplificaciones y deleciones de genes.<sup>10,11</sup>

Otras pruebas permiten la evaluación de mutaciones génicas en locus específicos como el de glicoforina, el de HLA y el de hprt. De estas pruebas la más validada es la del hprt.<sup>12-13</sup>

La proliferación de las células tiene un papel importante, pues se sabe que el daño producido en el DNA debe ser transmitido a las células hijas, incrementándose el número de las mismas por procesos de promoción y propagación que son indispensables para que la mutación resulte en un proceso patológico. Por otro lado, la disminución

de la proliferación puede alterar la regulación homeostática causando un desequilibrio en ciertos tejidos. La proliferación de las células se evalúa utilizando biomarcadores de citotoxicidad, entre los más conocidos se encuentran los índices de marcaje, mitótico y de cinética de proliferación.<sup>14</sup> La regulación de la proliferación de las células está dada por una cascada de protooncogenes, algunos estimuladores como "myc, fos y jun" otros represores como p53 (antioncogenes). Los protooncogenes son modulados por citoquinas y hormonas que tienen receptores ya sea en la membrana o en el citoplasma. Los xenobióticos pueden modular la actividad de los protooncogenes deteniendo o estimulando la producción de las respectivas proteínas, inhibiendo o incrementando así la proliferación de las células portadoras de mutaciones. Los protooncogenes tienen otras funciones importantes como el "chequeo de la integridad del DNA", activando los sistemas de reparación apropiados o induciendo la muerte programada ya sea por apoptosis o por muerte mitótica. Los protooncogenes también se han visto involucrados en los procesos de diferenciación celular.<sup>15-17</sup> Los métodos señalados aplicados a grupos de individuos considerados de "riesgo" han demostrado su utilidad en la determinación de exposición a sustancias genotóxicas; sin embargo aún falta demostrar su utilidad en la determinación del riesgo de padecer ciertas enfermedades. Estudios en animales y en pruebas de mutagénesis de corto plazo, así como en ensayos de transformación han encontrado asociaciones positivas con padecimientos como el cáncer y arteriosclerosis.<sup>18-19</sup> Es indispensable que estas asociaciones puedan confirmarse en el ser humano y que se desarrollen marcadores de susceptibilidad, como son los genotipos de metabolismo y los marcadores de inmunotoxicidad.

Cabe mencionar que nuestro grupo realiza estudios de biomarcadores comparando grupos de alta y baja exposición: a) a arsénico al ingerir agua contaminada con este metaloide en la Comarca Lagunera en el estado de Torreón,<sup>8,20-21</sup> b) a plomo en el aire de la ciudad de México. c) a ozono en la ciudad de México d) antes y después del tratamiento con medicamentos antiparasitarios y antimicrobicos (nicosamida, praziquantel, metronidazol y ketacozazol).<sup>5-7,23,24</sup> e) desechos industriales peligrosos y

pesticidas. Los datos obtenidos indican que los biomarcadores de citotoxicidad como los de genotoxicidad son útiles en la identificación de factores tóxicos para el material hereditario así como para estudiar *in vitro* los efectos dosis-respuesta y el o los mecanismo(s) por los cuales los diferentes xenobióticos actúan.

## Referencias

- Reddy MV, Randerath K. Nuclease P1-mediated enhancement of aromatic DNA adducts in white blood cells from foundry workers. *Mutat. Res.* 1985;204:1543-1551.
- Baan RA, Steenwinkel M-JST, Van den Berg PTM, Roggeband R, Van Delft JHM. Molecular dosimetry of DNA damage induced by polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance for exposure monitoring and risk assessment. *Hum. Exp. Toxicol.* 1994;13:880-887.
- Gonsebatt ME, Salazar AM, Montero R, Diaz-Barriga F, Yáñez L, Gómez H, Ostrosky-Wegman P. Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in Mexico. *Env. Health Perspectives.* 1995;103:111-113.
- Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M, Ostrosky-Wegman P. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 1996;359:77-84.
- Herrera LA, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Rojas E, Gonsebatt ME, Schiffmann D. Evaluation of the carcinogenic and genotoxic potential of praziquantel in the Syrian hamster embryo cell transformation assay. *Mutat. Res.* 1994;305:175-180.
- Elizondo G, Montero R, Herrera JE, Hong E, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte proliferation kinetics and sister chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutat. Res.* 1994;305:133-137.
- Elizondo G, Gonsebatt ME, Salazar AM, Lares I, Santiago P, Herrera J, Hong E, Ostrosky-Wegman P. Genotoxic effects of metronidazole. *Mutat. Res.* 1996: En prensa.
- Gonsebati ME, Salazar AM, Montem R, Guzmán P, Blas J, Del Razo LM, García-Vargas G, Albores A, Cebrián ME, Keish M, Ostrosky-Wegman P. Clastogenicity of arsenic exposure. *Mutat. Res.* 1997: Aceptado para su publicación.
- Gebhart E, Neubaver S, Schimidt G, Bierkenhake S, Dunst J. Use of a three-color chromosome *In Situ* suppression technique for the detection of past rat ion exposure. *Rao at. Res* 1996;145:47-52.
- Swiger RR, Tucker JD. Fluorescence *In Situ* Hybridization: A Brief Review. *Env. Ron. Molecular Mutagen.* 1996;27:245-254.
- Ramírez P, Eastmond DA, Lacleite JP, Ostrosky-Wegman P. Description of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploidy cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. En preparación.
- Albertini R, Nicklas J, O'Neill P, Robison H.S. *In vivo* somatic mutations in humans: measurement and analysis. *Anne. Rev. Genet.* 1990;24:305-326.
- Montero R, Gonsebatt ME, Herrera LA, Rojas E, Ostrosky-Wegman P. The HPRT Short-term assay in monitoring individuals exposed to genotoxic agents. *Environ. Health Persp.* 1993;101:135-138.
- Gonsebati ME, Herrera L, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring: Label, mitotic and replication indices as biomarkers in environmental monitoring. In *Biomarkers and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. F.M. Butterworth, L.D., Corkum and J. Guzmán-Rincón, Eds. Plenum Press N.Y. *Environ. Sci. Res.* 1995;50:81-94. ISBN 0-306-45190-5.
- Levine AJ. Tumor suppressor genes. *Scientific American*. 1995;2(1):28-36.
- Miranda EI, Santana C, Rojas E, Hernández S, Ostrosky-Wegman P. Induced mitotic death of HeLa cells by an *in vitro* expression of c-h-ras. *Mutat. Res.* 1-396:349-373-182
- Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menéndez D, Miranda E, García-Carrancá A, Rojas E. Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. 1996: Enviado para su publicación.
- Farmer PB, Sepai O, Lawrence R, Autrup H, et al. Biomonitoring human exposure to environmental carcinogenic chemicals. UK *Environ. Mutagen. Society/Oxford University Press.* 1996; :363-381.
- Sadhu DN, Merchant M, Safe SH, Ramos KS. Modulation of protooncogene expression in rat aortic smooth muscle cells by benzo[a]pyrene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993 300(1):124-131
- Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, García-Vargas G, Del Razo LM, Cebrián M. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.* 1996;250:477-482.
- Gonsebati ME, Vega L, Montero R, García-Vargas G, Del Razo LM, Albores A, Cebrián ME, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat. Res.* 1994;313:293-299.
- López I, Sánchez I, Antuna BS, Rondán ZA, Bizarro MP, Valverde RM, Rojas E, Ostrosky-Wegman P, Fortoul TI. Daño de la célula bronquiolar no ciliada (CBNC) por inhalación crónica de acetato de plomo. Resumen V Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Biología Celular, A.C. (SMBC), México, D.F. Octubre 1996
- Ostrosky-Wegman P, García G, Arellano L, Espinosa JJ, Montero R, Cortinas de Nava C. Genotoxicity of antineoplastic chemotherapy in human lymphocytes. *Sister Chromatid Exchanges*. R.R. Tice and A. Hollaender Eds. Plenum Publishing Corporation. 1984:29-915-925.
- Ostrosky-Wegman P, García G, Montero R, Pérez Romero B, Alvarez-Chacón R, Cortinas de Nava C. Susceptibility to genotoxic effects of nicotamide in human peripheral lymphocytes exposed *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.* 1986;173:81-87.