



Perspectivas y tendencias de la Toxicología hacia el siglo XXI

Manuel Repetto

Instituto Nacional de Toxicología, Sevilla y Area de Toxicología, Universidad de Sevilla

Recibido 29 de mayo 1995 / Aceptado 16 de junio de 1995

Introducción

Considero extraordinariamente arriesgado intentar predecir cómo será cualquier parcela científica en el siglo próximo. Ya decía Kuhn (1962) [1] que frecuentemente se tiene la falsa impresión de que las materias científicas siguen un curso progresivo constante y rectilíneo, pero la Historia de la Ciencia demuestra que el avance científico es un proceso sumamente complejo, con flujos, reflujos, errores y rectificaciones.

Sin embargo, para Robert Jungk [2, 3], el futuro ha comenzado, y el tratar de conocerlo no pretende una anticipación, profecía o adivinación, ha escrito Calvo Hernando (1995) [4], sino establecer escenarios o alternativas razonables, lo que ha sido llamado por Castilla (1985) la previsión tecnológica.

Si admitimos un llamado fatalismo científico, considerado por Martínez Moreno (1992) [8], y que presupone que los fenómenos existen y más pronto o más tarde serán descubiertos por alguien más o menos genial, así calificable porque fuese capaz de utilizar un nuevo paradigma o sólo se limitara a relacionar conocimientos ya existentes, podríamos atrevernos a vislumbrar cómo puede ser la Toxicología, al menos al comienzo, del Tercer Milenio.

Enseñanza de la Toxicología

Recordemos que cuando en el S XIII, se iniciaron las universidades, éstas se creaban mediante una bula papal, lo que les proporcionaba una lengua común, el latín, y el escolasticismo como método, y les confería gran autonomía de los gobernantes junto con una extraordinaria facilidad de relación entre ellas; el Renacimiento supuso un enorme cambio conceptual, y la universidad española, enfrentándose a la inglesa y a la alemana, se acoge a las ideas de la contrarreforma, desentendiéndose de los adelantos cientí-

cos y técnicos y estimulándose el espíritu reaccionario y la división compartimental de que aún adolece, frente al espíritu de universidades.

En el S XIX se diferencian tres modelos de universidad: el alemán, que concede prioridad a la investigación y se configura como una comunidad de investigadores que imparte enseñanzas; el francés, caracterizado por el espíritu imperial napoleónico, que se dirige a la formación de profesionales y funcionarios; y el modelo inglés, exponente de la época victoriana, dirigido a conformar un determinado tipo de sociedad. Con el paso del tiempo estos modelos han ido difuminándose y tendiendo hacia uno único. España no consiguió definir su modelo propio ni sintetizar los otros conforme los tiempos requerían y el futuro exige.

Ha escrito Mayor Zaragoza [10] que hay que inventar el porvenir con imaginación, audacia y entrega. Pero ante los vertiginosos procesos de cambio a que estamos asistiendo en los finales de este Segundo Milenio, parece muy arriesgado deducir cual será la situación en, al menos, la primera mitad del tercero. Sólo podríamos atrevernos a considerar la situación actual, el "estado del arte", y definir las tendencias.

Hemos visto que el desarrollo "normal" de la Ciencia, así como el de su enseñanza, tiene lugar por la sucesión de grandes etapas que, como ondas, van haciendo surgir materias o actividades que, con cierta lentitud, desplazan o barren a otras previas. En este momento, y en lo que a la Toxicología se refiere, queremos ser optimistas, pues su presencia diversificada en los nuevos planes de estudio de pregrado en distintas licenciaturas y otros de postgrado, parece haber roto moldes y encarar el nuevo milenio con apertura y entusiasmo; también creemos que se mantendrán las áreas fundamentales de la Toxicología actual: básica, analista, experimental y clínica, junto con el creciente desarrollo de la Toxicología Ambiental y de la Ecotoxicología, de las que esta última puede desglosarse pronto como ciencia independiente (Repetto, 1987a) [11].

La Toxicología se verá consolidada por la previsible evolución de los programas de estudio de pregrado que, incluso en España a pesar de su estructura docente de tiempos napoleónicos, está orientándose a incluir asignaturas de Toxicología General, Toxicología Clínica, Bioquímica Toxicológica, etc., además de las tradicionales de Toxicología Forense y de Toxicología Analítica [12].

Preferimos fijarnos en los estudios de pregrado, a pesar de que desde hace años se imparten docencias y especialidades toxicológicas de tercer ciclo, porque creemos que para la extensión y cristalización de la ciencia es más importante su estudio en la licenciatura, ya que los estudios de postgrado son de especialización y más orientados hacia las ramas de aplicación práctica. Así lo entiende también la Asociación Española de Toxicología que viene insistiendo en la necesidad del estudio de una Toxicología básica en todas las carreras de las ciencias de la salud y en todas las científicas y técnicas que contemplan alguna forma de uso de las sustancias químicas. El contenido de esta Toxicología básica o fundamental sería de tipo conceptual, mecanicista, toxicocinético y toxicodinámico. Posteriormente, cada licenciatura debiera incluir una o varias asignaturas de Toxicología especial adaptadas a las características y conveniencias de los futuros titulados.

Para ello es muy conveniente que la Toxicología configure un Área del Conocimiento independiente de la Medicina Legal, de la Farmacología, del Análisis Químico o de cualquier otra, de forma que, sin ligaduras preestablecidas, pueda adaptarse a las aludidas características de las distintas licenciaturas. Y todo ello, sin olvidar que la Toxicología es, por principio, y básicamente una ciencia biológica, no química ni farmacéutica, ni forense, aunque se nutra y colabore con todas las demás; así es como se reconoce por multitud de organizaciones internacionales, que la integran entre las Ciencias de la vida y como por fin va a ser estimada en España, como Área de conocimiento de las Ciencias de la Salud.

En relación con las ramas aplicadas, es de advertir cómo actualmente trabajan, investigan y publican sobre temas toxicológicos profesionales de las más distintas titulaciones, generalmente sin una iniciación básica previa, lo que puede dificultar el rigor conceptual. En ayuda a obviar este inconveniente ha venido el Glosario de Términos Toxicológicos, recomendado por la IUPAC, cuya versión española ha sido realizada por varios de nosotros, bajo los auspicios de la Asociación Española de Toxicología [13].

Toxicología Forense

Si nos retrotraemos al inicio de la Toxicología médico-legal en España, Pedro Mata, que consolidó hacia 1843 la enseñanza de la medicina legal y la toxicología, llega a decir que "el ánimo se aflige al contemplar que en el S XIX nos encontramos a la altura de Francia en el S XVI".

El gobierno español nombró en 1855 una comisión para elaborar un proyecto de cuerpo de médicos forenses, en tanto que para las peritaciones de laboratorio, especialmente las que requerían análisis químicos, disciplina muy poco desarrollada aún, se designaba en 1858 al Catedrático de Medicina Legal y Toxicología de Madrid junto con el Catedrático de Química y Física Médicas o el de Historia de la Medicina.

Posteriormente, en 1862, se autoriza a los jueces de primera instancia a encargar los análisis a los farmacéuticos, y en su caso, consultar a las Cátedras de Medicina Legal o de quinto curso de Farmacia, de cualquiera de las universidades españolas. Pero los catedráticos y los farmacéuticos llegaron a negarse a realizar los análisis sin remuneración, entrando la administración de justicia en una situación caótica, que trató de resolverse en 1886 con la creación de los Laboratorios de Medicina Legal, posteriormente (1911) denominados Instituto Nacional de Toxicología, dedicados a "la enseñanza de la Toxicología y la ilustración de los Tribunales de Justicia".

Este Instituto, dependiente del Ministerio de Justicia, con tres departamentos regionales y la posible creación de otros, ha evolucionado al cabo de los años, superando embestidas de algunos y procurando cubrir las necesidades nacionales en la materia, hasta alcanzar un apreciable reconocimiento científico y técnico dentro y fuera de España. En el futuro se verá aliviado de la carga funcional por las nuevas delegaciones de este Instituto y los proyectados laboratorios de los Institutos de Medicina Legal.

Consecuentemente, es previsible una mejora del servicio a la administración de justicia; el peligro puede venir de los que aún confían en métodos analíticos caducos (reacciones coloreadas, por ejemplo), en la infalibilidad de los métodos inmunoenzimáticos o en la suficiencia de contar con instrumentación último modelo, sin disponer de antemano de personal altamente capacitado no ya para manejarlo, sino para distinguir entre el método y la técnica.

Es de esperar que se acierte en una apropiada clasificación de laboratorios según su nivel de complejidad y capacidad, su distribución geográfica y su coordinación y homogeneización metodológica, así como la implantación de serios programas de garantía de calidad.

Toxicología del futuro

¿Pero cómo será la Toxicología del próximo siglo?

Pienso que debe tenerse en la mente el tema del congreso de Eurotox, celebrado en Basilea en 1994, que fue de "Toxicología en transición" [14].

Para Calvo Hernando (1995), la química seguirá siendo la base de los progresos en biología molecular, medicina y demás ciencias de la vida, así como para la defensa del medio ambiente y la obtención de nuevos materiales. El plás-

ico y el silicio han sido los materiales más importantes del Segundo Milenio (SM), y gracias a ellos se inició la revolución informática, que en realidad "apenas ha comenzado". Nos invaden los sistemas expertos, programas que reúnen todos los conocimientos sobre un tema, y son capaces de barajarlos y considerarlos al analizar una materia.

Pero esto nos presenta un nuevo problema: el exceso de información; cuando a finales de la primera mitad de este siglo nosotros nos iniciábamos en Toxicología, teníamos grandes dificultades en obtener libros y revistas a ella dedicados, y debíamos recurrir a publicaciones de Medicina Legal y de Ciencias de los Alimentos, pero ahora estamos en una situación inversa y paradójica. Al disponer de mejores y más numerosos medios de comunicación (creciente número de revistas, multiplicación de libros y de congresos, acceso informatizado a bancos de datos, correo electrónico, etc., etc.), se plantea con fuerza la necesidad de la superespecialización: se hace preciso reducir el campo de actuación de cada uno para poder profundizar suficientemente y mantenerse en un nivel digno, y para que sea factible acceder a la información más relevante que incesantemente se produce, y continuamente se renueva, en cada tema. Es decir, son necesarias las subespecialidades.

Según el físico americano Freeman Dyson, del Instituto de Estudios Avanzados, de Princeton, USA, y su criterio lo comparten otros muchos autores, el área de conocimiento que más se desarrollará en el próximo futuro lo formarán la biología molecular, la fisiología celular a nivel molecular y la genética. Y se ha dicho que la revolución biológica es una revolución molecular, iniciada en los años 40 por los físicos que se interesaron por la biología.

Se piensa (Sanz, 1995) que la Biología actual está dedicada frenéticamente a acumular datos e información, gracias a los avances analíticos e informáticos (por ejemplo, el proyecto genoma). Quizás en esto se parece a la actividad descriptiva de la época de Linneo, aunque ahora las nuevas "unidades biológicas" son las secuencias de genes y de nucleótidos, en lugar de ser las especies.

En este sentido, creemos que la Toxicología ya ha superado la etapa de ciencia descriptiva, de acumulación de datos, de listados de sustancias y de sus dosis tóxicas agudas y letales.

Efectivamente, podemos ver que la tendencia de la Toxicología en los últimos 15 años es la comprensión de los fenómenos en términos de Toxicología bioquímica o Toxicología molecular. Esa es, para nosotros, la línea más potente del desarrollo de la Toxicología hacia el Tercer Milenio (TM): el mejor conocimiento de las interacciones entre los xenobióticos y las biomoléculas y, aún más entre las moléculas exógenas y los mediadores intracelulares, todo ello interpretado a la luz de los progresos en genética, polimorfismos enzimáticos (por su variabilidad bioquímica) y de los estudios poblacionales. Esto requerirá una mayor atención de los toxicólogos a la Bioestadística, que se ha establecido como importante ciencia auxiliar; solamente con la experta aplicación de esta herramienta podrán establecer-

se adecuadamente los límites máximos permitidos de contaminación ambiental urbana y en el medio laboral y en los alimentos, así como se podrán encontrar las causas de algunas enfermedades, como ciertos trastornos mentales y neurológicos, cuya incidencia está creciendo insistentemente sin que aún conozcamos su etiología, y en definitiva considerar más ajustadamente que ahora los grupos de riesgo.

Tendencias mecanicistas

Como acabamos de ver, y manifestó Bentley [14] en Basilea, en agosto de 1994, la toxicología es una ciencia que se va haciendo menos descriptiva y va dando cada vez mayor importancia a los mecanismos subyacentes a los efectos tóxicos.

Ya en 1981, Aldrich había escrito que al estudiar el mecanismo de toxicidad de una sustancia, lo principal es detectar y clasificar las alteraciones bioquímicas, fisiológicas o morfológicas que son trascendentes y diferenciarlas de las que no lo son, para el efecto tóxico estudiado.

Ello puede suponer una activación del xenobiótico absorbido y la unión (reversible o covalente) del compuesto activo a biomoléculas dianas, que quedan modificadas; esta alteración inicial es la fase de cambios bioquímicos y fisiológicos que, posteriormente podrán manifestarse o no mediante signos, síntomas o síndromes tóxicos [15].

Los estudios sobre las reacciones moleculares químico-biológicas proporcionarán (Bridges, 1985) [16] mayor información para:

1. establecer bases válidas para considerar el "nivel sin efecto observable"
2. extrapolar datos entre los modelos experimentales y el hombre
3. encontrar nuevos indicadores de exposición/efectos
4. identificar grupos de riesgo entre la población
5. predecir verosímiles antidotos y antagonistas
6. desarrollar ensayos más simples, económicos y predictivos
7. identificar sustancias que pueden producir efectos similares y, a su vez, las modificaciones químicas estructurales que podrían eliminar los efectos tóxicos.

Hacia el conocimiento de estos objetivos será necesario un mayor desarrollo, y nuevos métodos, para el estudio de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) ya que los procedimientos actuales, incluso los que utilizan sistemas informatizados, no pasan de ser prometedores.

Será preciso investigar más en la toxicidad especie-específica, que comenzó por distinguir los efectos tóxicos en plantas y animales, y que después ha proporcionado explicaciones de carácter bioquímico y genético a los distintos efectos de un mismo tóxico en diferentes especies animales y el hombre.

Además, se ha visto que los procesos fisiológicos de biotransformación, tanto de activación como de inactivación de los xenobióticos, como los procesos de excreción presentan una gran variabilidad interespecies e interindividuos, y esto se debe a los polimorfismos enzimáticos; será preciso insistir en el estudio de éstos, tal como se viene haciendo para los cit P-450, colinesterasas, alcoholdehidrogenasas, acetiltransferasas, etc.

Por comparación de las secuencias de genes que codifican la síntesis de las enzimas biotransformadoras en individuos caracterizados como metabolizadores rápidos o lentos, se puede ya identificar la clave polimórfica que determina la susceptibilidad o resistencia a los distintos xenobióticos.

También se deberán producir avances en el conocimiento de los polimorfismos moleculares de la diana biológicas, que nos expliquen diferencias toxicodinámicas interespecies e interindividuales.

Por la orientación que llevan los estudios mecanísticos de toxicidad, se observa que en lugar de utilizar parámetros bioquímicos y morfológicos, se emplearán más otros "puntos finales" o indicadores como las respuestas hormonales, segundos y terceros mensajeros, modificaciones en los ARN, factores de crecimiento, cambios en la diferenciación celular y muerte celular por apoptosis.

El actual conocimiento de la importancia fisiopatológica de los radicales libres y las formas activas del oxígeno han de conducir a nuevos estudios sobre formas de captación de los radicales y de moléculas antioxidantes; el japonés Niki acaba de demostrar que los efectos de los antioxidantes en disolución pueden diferir de sus efectos en modelos de membrana *in vitro*, y ha comprobado que la eficacia del antioxidante viene determinada por su movilidad en las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También se ha visto (Cameje, 1994) que los proteoglicanos presentes en el espacio subendotelial de los vasos sanguíneos aumentan la sensibilidad de las LDL a la oxidación *in vitro* (especialmente la inducida por sales de cobre), con producción de lo que se ha llamado un "agujero negro" en la íntima. Sin embargo, deberá aclararse la discusión sobre si la dieta vegetariana y las vitaminas C y E juegan realmente algún papel protector en las patologías radicalarias.

Igualmente es de prever que en los próximos años se incrementará el conocimiento de los mecanismos de activaciones y de inducción enzimática, de gran participación en los procesos tóxicos; se deberán explicar otras cascadas de activaciones como las hoy conocidas en que intervienen proteasas, Ca-calmodulina, fosfolipasas, óxido nítrico, tioles reactivos, AMP-c, GMP-c, etc. Se dispone actualmente de tecnología informática para la cuantificación simultánea de más de 1.000 proteínas que sirven de indicadores de mecanismos de toxicidad en términos moleculares, y que permiten abordar estudios de estructura-actividad de efectos complejos, por ejemplo, a través de la proliferación de peroxisomas o en las inducciones enzimáticas de I y II fase. Igualmente se están desarrollando ecuaciones estadísticas

con "puntos finales" de modelos de toxicidad, que permitirán postular hipótesis sobre los mecanismos de acción e identificar los elementos estructurales que contribuyen a potencial tóxico de las sustancias, lo que a su vez, posibilitará modificar aquellos para el diseño de nuevos fármacos.

También es posible que alcance, al menos, a los primeros años del TM el interés por diferenciar la necrosis tóxica de la apoptosis, entendiendo por este término el mecanismo fisiológico de eliminación de células viejas o dañadas pero que puede ser activado por los tóxicos. La apoptosis es regida por un conjunto de genes que actúan como sensores de las primeras lesiones celulares; se desprenden fragmentos de ADN de alto peso molecular, que pueden aparecer por acción de la topoisomerasa, posteriormente se produce una escalera nucleosómica de 50-200 fragmentos liberados por la endonucleasa; inicialmente tiene lugar un retracción celular y pérdida de contactos superficiales y, finalmente, digestión intrafagosómica, fagocitosis y desintegración extracelular.

Los mecanismos de iniciación y regulación de la apoptosis y sus bases bioquímicas parecen deberse a características celulo-específicas y estímulo-específicas posiblemente a partir de muy diversas señales extracelulares que regulan diferencialmente el metabolismo intracelular. Además se ha demostrado, hasta ahora, que en la regulación y expresión de la apoptosis participan varios oncogenes y genes oncosupresores.

En este sentido, se sabe que las quinasas dependientes de ciclina (CDK) forman una familia de enzimas que regulan la división celular; cuando se activan participan en las fases de la mitosis como la condensación cromosómica, rotura de la envoltura nuclear y formación del huso. Tras exposición a xenobióticos se observa una sobreexpresión de las CDK, que estimulan la transformación y proliferación celular, y al propio tiempo se ve la iniciación de una sucesión de señales dirigidas a detener el crecimiento de la célula; consecuentemente, la célula recibe un conjunto de señales proliferativas o inhibitorias, que le crean un conflicto el cual se resolverá hacia la transformación o hacia la apoptosis.

Por otra parte, se ha descrito que se producen alteraciones en la expresión genética por la acción de muy diversas sustancias externas como factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, situaciones desencadenantes de estrés oxidativo, perturbaciones físicas (temperatura, excitación etc.). Todos estos estímulos desencadenan una cascada de acontecimientos, que incluyen señales intracelulares o segundos mensajeros y la consecuente activación o inhibición de proteinquinasas o fosfatasa, que afectan los niveles o actividades de algunas proteínas que enlazan e controlan la transcripción de elementos de genes y, consecuentemente, regulan su expresión.

También es tema a investigar la susceptibilidad genética a los tóxicos, que puede explicar muchas carcinógenesis; trastornos de la reproducción y el desarrollo. En la evaluación del riesgo de cáncer se consideran cada vez más la

sustancias activadoras de oncogenes o las inactivadoras de genes supresores de tumores; posiblemente el análisis molecular de los tejidos tras exposiciones agudas o subcrónicas podrán eliminar la necesidad de los bioensayos de carcinogénesis a largo plazo.

Igualmente se seguirá investigando en los mecanismos de activación de la transcripción genética que conducen a la promoción tumoral, y métodos para evitarla.

En los últimos años se ha considerado que algunos tóxicos actúan introduciendo perturbaciones en la señal de transducción que regula la expresión genética, lo que produce un cambio dramático en el espectro de funciones activas de la célula afectada; la comprensión de estos mecanismos sólo es posible (Puga, 1995) a través de la biología molecular, y concretamente mediante el análisis de las relaciones estructura-actividad en los procesos genéticos. Ejemplos de estos mecanismos son las alteraciones de la comunicación intercelular, el estrés oxidativo, la proliferación de peroxisomas, etc.

Otra de las líneas de investigación en toxicología genética ya iniciadas, y que han de rendir importante información sobre mecanismos de acción, en el futuro, será el estudio de las secuencias de reconocimiento ("cognate") de enzimas que intervienen ordinariamente en la duplicación o reparación del ADN, y que sirve de órgano diana en la acción de algunos tóxicos; en este sentido, se conoce ya el mecanismo de algunos hidrocarburos aromáticos, especialmente la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), que se une a una proteína intracelular, denominada receptor de AH; se forma así un complejo nuclear que se enlaza al "cognate" o secuencia genómica. El complejo receptor nuclear es un factor de transcripción inducible por ligandos, que puede inducir o reprimir la transcripción de genes.

Un mejor conocimiento de los procesos fisiopatológicos de etiología tóxica deberá incidir, en los próximos años, en el estudio de las modificaciones o las estabilizaciones de la membrana celular y de la distribución o localización de las enzimas activantes o tóxicas, dentro de cada órgano, para explicarnos el por qué de lesiones tóxicas focalizadas, aún no bien comprendidas. Un magnífico ejemplo de ello lo tenemos en los diferentes efectos hepáticos zonales de la cocaína, según la exposición previa a diferentes inhibidores o inductores enzimáticos y la posible formación de distintos metabolitos reactivos; se sabe que la cocaína produce una necrosis coagulativa en la zona intermedia lobulillar, que se incrementa por exposición previa al organofosforado diazinón, el cual al inhibir esterasas, aumenta la vida media de la droga. Pero si se produce inducción con fenobarbital, la necrosis aparece en la zona central, perivenular, mientras que bajo inducción con beta-naftoflavona, la lesión aparece en la zona periférica del lobulillo (Roth et al., 1992) [20].

Esta profundización requerirá un mayor desarrollo de la Patología toxicológica que, a su vez, está cambiando métodos histológicos tradicionales por análisis de ARN y técnicas de PCR *in situ*.

Será prioritario el investigar más sobre los efectos crónicos de la exposición a bajas concentraciones, en lugar de los efectos tóxicos agudos, que han sido hasta ahora los más estudiados; hay importantes ejemplos de procesos degenerativos de tejidos parenquimatosos en hígado, pulmón, riñón, etc., así como de trastornos inmunitarios, de neoplasias y de anomalías genéticas en posteriores generaciones. Este tipo de estudios seguirán requiriendo modelos animales, aunque estos se aplicarán después de estudios *in vitro*.

Un problema reciente, que debería estar resuelto antes de principios de siglo, es el "síndrome de sensibilidad química múltiple" que ha aparecido entre los soldados norteamericanos que intervinieron en la guerra de Irak (Guerra del Golfo Pérsico) y que se teme afecte también a sus hijos; aún no se sabe si es un trastorno inmunitario o una enfermedad retardada, consecuente a la exposición múltiple a sustancias químicas.

En este sentido, debemos señalar que aún queda por dilucidar el mecanismo fisiopatológico del síndrome del aceite tóxico, y el del síndrome de eosinofilia-mialgia producido por un derivado del triptófano.

Por otra parte, el TM se encontrará con el problema, aún no resuelto, de los efectos fisiopatológicos de la exposición a mezclas de tóxicos; hasta ahora sabemos algo de interacciones entre medicamentos, entre estos y el alcohol, entre medicamentos y algunos contaminantes, entre algunos medicamentos y ciertos nutrientes, etc., pero queda mucho por clarificar en cuanto a los efectos tóxicos o letales de dosis subtóxicas de medicamentos y/o contaminantes absorbidos conjuntamente. Es preciso conocer más acerca de la acción de mezclas de tóxicos sobre el mismo o diferentes órganos diana, así como de la modulación de la respuesta de las dianas a la presencia simultánea de bajas concentraciones de diversas sustancias.

Igualmente queda mucho que investigar en Toxicología de la reproducción, del desarrollo y del comportamiento, materias que deberán ser abordadas más intensamente en el próximo futuro, con el desarrollo de nuevas baterías de ensayos.

La Inmunotoxicología es otra de las ramas de nuestra disciplina que previsiblemente seguirá desarrollándose a velocidad progresivamente acelerada dentro del TM, en sus tres vertientes de procesos debidos a aumento o disminución de la respuesta inmunitaria o a los fenómenos autoinmunitarios inducidos por las sustancias químicas o los agentes físicos; el incremento del número y la proporción de las sustancias en nuestro medio está produciendo importantes alteraciones en el sistema inmunitario, que deben ser mejor conocidas y controladas. De acuerdo con Gelbke (1993) [21], será preciso introducir nuevos parámetros (biomarcadores) y pruebas funcionales para reconocer las afectaciones inmunitarias, una vez determinada la sensibilidad y la especificidad de aquéllos; también deberemos aprender a diferenciar entre efectos inmunotóxicos primarios de los secundarios y de otros efectos tóxicos.

Nos tememos que una tarea pendiente que quedará a la medicina forense y a la biología legal para el próximo siglo será el diagnosticar en el cadáver la muerte debida a shock anafiláctico, porque hasta el momento sólo disponemos de aproximaciones incompletas, cuando debemos presumir que los casos no son infrecuentes.

Ian Kimber (1994) ha informado que la dermatitis ocupacional cuesta en USA un billón de dólares al año, y aproximadamente 1/3 de ellos tiene base alérgica. Igualmente se está viendo un importante incremento en la alergia respiratoria y los trastornos autoinmunitarios.

Es de esperar un mejor conocimiento de los mecanismos inmunotóxicos que permitan una mejor terapéutica; últimamente se han realizado grandes avances en el conocimiento de cómo las células de Langerhans presentan antígenos a los linfocitos T, y dan lugar a la liberación de una cascada de mediadores que intervienen en la respuesta inflamatoria. La activación primaria de los linfocitos T por pequeñas citoquinas inducibles conduce a una multiplicación clonal de linfocitos alérgeno-específicos, que pueden persistir indefinidamente (Scheper, 1994) y entonces ya no puede conseguirse la desensibilización. Se sabe ahora que la administración de anticuerpos contra las moléculas específicas de adhesión, conocidas como selectinas e integrinas, producen inhibición de la acumulación de las células activadas, modulación de la producción de citoquinas y la activación de linfocitos T.

Toxicología Clínica

La toxicología clínica tiene pendiente, aparte de una mejor formación específica de médicos y veterinarios, la búsqueda de nuevos paradigmas toxicológicos para el abordaje terapéutico, así como una ampliación del escaso arsenal antidótico, junto con un mejor conocimiento de los riesgos y los beneficios del uso de los antidotos y de las modificaciones toxicocinéticas y toxicodinámicas introducidas por ellos en el paciente intoxicado.

Una cuestión de interés, que relaciona la Toxicología Clínica, el consumo de drogas de abuso, la Toxicología Ocupacional, la Toxicología Reguladora, y que en definitiva es un problema de Toxicología Social, es el diagnóstico del consumo de drogas de adicción en los medios laboral y familiar (Finkle, 1990) [22], frente al arduo problema de la legalización del consumo.

Prefiero creer que la moda del consumo masivo de sustancias con fines hedonistas pasará y este abuso se reducirá a los límites cuantitativos que tuvo en otras épocas históricas. Sería preciso para ello, en primer lugar, que desaparecieran los ilusos o interesados apóstoles de estas sustancias, especialmente de las de nueva síntesis que con irresponsable desconocimiento presentan y defienden como "drogas recreativas", y los que intentan responsabilizar de los efectos nocivos a los compuestos adulterantes y a las presuntas "sobredosis".

Toxicología Preventiva

Quizás la rama aplicada de nuestra ciencia que habrá de tener un mayor protagonismo en el TM será la Toxicología Preventiva, que nutrirá de base científica a la Toxicología Reglamentaria, en creciente implantación, pues, a su vez, proporciona fundamento para las normativas y legislaciones relativas a la comercialización, uso y presencia en cualquier medio de las sustancias químicas.

La Toxicología Preventiva, en sus facetas de ambiental, ocupacional, alimentaria, medicamentosa, y en definitiva, social, se fundamenta en la identificación y la evaluación del riesgo consecuente a la exposición a las sustancias químicas y a los agentes físicos.

Esta evaluación del riesgo ha venido haciéndose mediante la aplicación de modelos animales y subsiguientes intentos de trasposición de los resultados al género humano. Motivos éticos, los códigos de Buenas Prácticas de Laboratorio, las presiones de las asociaciones protectoras de los animales y el deseo de profundizar más en la reacción químico-biológica, o estudios mecanísticos de toxicidad, han impulsado el desarrollo de métodos alternativos al empleo de los animales de laboratorio (Repetto, 1987a) [23].

Sin llegar al extremo de algunos que parecen dispuestos a utilizar sobre sí mismos sustancias que no han sido previamente ensayadas con animales, estamos convencidos de la importancia actual y, más aún, de la futura, de los métodos alternativos, especialmente de los métodos *in vitro* con células humanas, y de que se lograrán grandes avances en la interpretación de los resultados y su correlación con los efectos en el hombre, en lo que se conoce como extrapolación de los datos al ser humano.

Un problema que ha de resolverse en los años futuros, en relación con los métodos alternativos, es la validación de cada uno de ellos, su aceptación por la comunidad científica y su posterior inclusión en las normativas internacionales sobre evaluación de la toxicidad.

Por otra parte, la evaluación del riesgo de la exposición a las sustancias químicas, conocimiento básico para el desarrollo de la Toxicología Preventiva, adolece según Purchase (1994) [29] de una armonización internacional que comience por los conceptos y definiciones y abarque los estándares y métodos científicos para valorar e interpretar el riesgo de forma reproducible, transparente y libre de sesgos sistemáticos, así como con clara conciencia de lo que es la actuación científica y la policial; el objetivo final de la primera son propuestas para la Toxicología Reguladora, normalmente, para la reglamentación de las sustancias químicas (Repetto, 1987b, 1989, 1995 y 1995) [24-27].

La evaluación del riesgo es un proceso continuo (Bass, 1986) [30] que se debe efectuar antes y después de comercializar las nuevas sustancias. Hasta ahora se realiza por protocolos establecidos tras numerosas reuniones interna-

cionales, pero habrá que esforzarse más en la posterior Toxicovigilancia de los efectos.

En el futuro será preciso insistir en los estudios de extrapolación al hombre, y especialmente de los efectos de dosis bajas, a menudo no ensayados con animales.

También será necesario abordar mejor las decisiones sobre el binomio riesgo-beneficio. Así mismo, se deberá insistir en la "epidemiología molecular" como medio de desarrollo de la monitorización del riesgo en humanos.

Por otra parte, deberán introducirse nuevos métodos para la evaluación de futuros productos, especialmente de los aditivos alimentarios y los producidos por biotecnología y para resolver algunas de las incertidumbres ahora existentes (Kroes, 1986) [31].

Los procedimientos toxicológicos rutinarios pueden no ser aplicables, o incluso resultar inapropiados, para los productos de biotecnología, porque muchos de estos son especie-específicos y pueden presentar distintos efectos en las diferentes especies; además pueden introducirse contaminantes o impurezas en los procesos de fermentación o aislamiento, y dar lugar a la formación de productos inmunógenos; todo ello exigirá nuevos métodos inmunotoxicológicos.

Toxicología y medio ambiente

Mayor Zaragoza ha escrito que los científicos llevan años advirtiendo a los políticos de la gravedad de determinadas amenazas que se ciernen sobre nuestro medio ambiente, como son, el efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono, la lluvia ácida, la contaminación acuática, incluida la marina por fertilizantes y plaguicidas, etc., que ya no son meras amenazas, sino realidades, y añade: "los avances del último siglo nos han proporcionado una imprevisible capacidad para envenenar el futuro".

Se ha dicho que si la solución a la contaminación que se proponía en los años 80 era la dilución, el lema de los 90 es la reducción, lo cual resulta más difícil y más caro, y va en contra del desarrollo y el consumismo (basta ver el fracaso de la Conferencia de Berlín de este año); por tanto, no sabemos cual será el lema del S XXI en relación a esto.

En estos momentos se ha reducido la contaminación por SO_x, Pb y Cd y está disminuyendo la de materia orgánica en las aguas en cuya depuración se está avanzando; se está generalizando la recogida de residuos sólidos, reglamentando los tóxicos y peligrosos, aunque se originan aún graves conflictos en su destrucción.

Pero, por el contrario, se prevé el aumento de la contaminación por NO_x, Mn (del nuevo supercarburante sin Pb a base de ciclopentanodieno tricarbonilo de manganeso) y no parece que vaya a disminuir el CO₂. Continúa el mal uso y abuso de plaguicidas y fertilizantes y su presencia en alimentos y aguas que, por causa de los fertilizantes nitrogenados y de los sequestrantes del calcio, difícilmente con-

siguen su eutrofización. En las aguas de consumo público, cada vez más escasas, se está viendo un alarmante incremento de los halometanos, de reconocida capacidad carcinogénica.

Hacia el control de la presencia de estos y otros agentes deberían, en nuestro criterio, dirigirse especiales esfuerzos de las autoridades sanitarias, ahora y en los próximos años.

También hay que profundizar en lo que se ha llamado la "hipótesis del estrógeno", que concede gran importancia a la presencia ambiental de contaminantes de tipo estrogénico y antiestrogénico (como las dioxinas y otros hidrocarburos polihalogenados) que se han considerado responsables de una "feminización" y disminución del espermograma en animales y el hombre.

Desde su inicio, la Toxicología se interesó casi exclusivamente por el efecto de las sustancias químicas sobre el hombre y, muy secundariamente, sobre algunos animales; es decir, ha sido una Toxicología humana.

Muy recientemente, poco más de 30 años, y sólo a causa de ese mismo interés antropocéntrico, nos comenzamos a preocupar por los efectos sobre el medio; nació la Toxicología Ambiental, y posteriormente (hace sólo 20 años) la Ecotoxicología, en que el objetivo a preservar no es el género humano ni ninguna otra especie en forma aislada, sino el conjunto de elementos biológicos y no biológicos que integran un ecosistema.

Según el belga Guido Persoone (1986) [32] experto en toxicología acuática, probablemente la mayor diferencia entre la Toxicología Humana y la Ecotoxicología, al menos desde el punto de vista de la aceptabilidad del riesgo, es que para la Ecotoxicología, la desaparición de unos pocos individuos en una población de plantas o animales no se considera generalmente de crucial importancia, en tanto que se mantengan las funciones propias de la población y la de la comunidad biológica en el ecosistema.

El estudio de las características ecotóxicas de un producto se viene haciendo mediante la exposición al tóxico, durante diferentes periodos de tiempo, de determinadas especies que se consideran indicadores por su escasa o gran sensibilidad. Hay propuestos numerosos ensayos *in vivo* o *in vitro*, incluso con el empleo simultáneo de varias especies (ensayos multiespecies), que lamentablemente no consideran más que dos variables: concentración del tóxico y tiempo de exposición, a pesar de que en un ecosistema verdadero intervienen numerosas variables.

Muy pocos de los ensayos propuestos han sido validados u homologados, y de estos, pocos son los que realmente nos dan una información relevante, porque como demostraron Calamari y cols (1985) [33], hay una relación inversa entre el realismo ecotóxico y la simplicidad de los ensayos.

No es previsible que en un futuro inmediato se encuentre el modelo experimental definitivo para evaluar los efectos reales sobre el ecosistema, de una sustancia química aisladamente considerada, ni mucho menos, de una mez-

cla. Pensamos que los ecotoxicólogos seguirán persiguiendo esa meta en el próximo siglo, en el que probablemente crecerá la conciencia de protección al ambiente; posiblemente los nuevos modelos continuarán buscando las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) y los niveles o concentraciones sin efecto observable (NOEL), por supuesto con la ayuda de toda la maquinaria informática que los tiempos proporcionen.

Toxicología Analítica

La más importante revolución tecnológica en el análisis toxicológico se produjo hace 30 años con la introducción de la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta presión, por un lado, y la espectrofotometría de absorción atómica y la espectrometría de plasma, por otro. Estas técnicas permitieron identificar y cuantificar sustancias con una sensibilidad y exactitud no alcanzadas hasta entonces; ello posibilitó también, disminuir la cantidad de muestra necesaria para el análisis.

Posteriormente, el acoplamiento de la espectrometría de masas e incluso el doble equipo masas-masas a las citadas técnicas, aumentó la seguridad y capacidad de discriminación entre tantas sustancias utilizadas hoy por el hombre. Sin embargo, desde entonces, y hasta el advenimiento de la electroforesis capilar, no se ha introducido ninguna instrumentación analítica de verdadera utilidad en toxicología.

Por su carácter innovador y la extensa difusión que han alcanzado, deben citarse los métodos inmunoenzimáticos, en sus distintas variantes, de gran simplicidad de manejo y utilidad cuando se emplean en ensayos previos o de orientación (Repetto, 1987a).

Las técnicas cromatográficas, al poseer capacidad separativa, han permitido, además, simplificar considerablemente las tediosas operaciones de extracción, purificación y fraccionamiento antes requeridas, y han posibilitado la extensa aplicación de los métodos extractivos con columnas de muy diversos rellenos (fase sólida), hasta llegar a las columnas quirales, para la separación de estereoisómeros.

En los procedimientos de extracción de tóxicos y purificación de los extractos, cabe esperar una mayor presencia de las técnicas basadas en los fluidos supercríticos, de indudables ventajas.

No somos capaces de predecir otras innovaciones, y sólo nos atrevemos a presuponer la aplicación de técnicas de flujo continuo a futuros sistemas automatizados de análisis toxicológicos y, más probablemente, de la contaminación atmosférica y de las aguas.

Garantía de calidad en Toxicología

Finalmente, una característica que marcará la ciencia y la tecnología del TM es la exigencia de Garantía de Calidad, y la Toxicología no estará excluida.

La evaluación de la toxicidad de las sustancias, por métodos *in vivo* o alternativos, los estudios de toxicología molecular, los análisis toxicológicos (sean de drogas de abuso, de toxicología clínica o laboral, de monitorización forenses, de contaminación, etc.) no podrán realizarse por cualquier persona ni por cualquier laboratorio. Se impondrá la acreditación y la garantía de calidad. Se podrá pensar que esto establecerá una distinción entre laboratorios ricos y pobres, pero no es esto lo que se pretende, sino garantizar o asegurar los resultados.

Las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio se iniciaron en USA y Japón, para dar fiabilidad a los estudios de evaluación de toxicidad; las adoptaron la OCDE y la CE, se impusieron en las legislaciones nacionales y ahora se extienden a los laboratorios de análisis. La Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT) ha publicado sus códigos en 1993, que se revisarán cada dos años; que cada vez se exigirán más seriamente.

Por su parte, asociaciones profesionales americanas y europeas, como la American Board of Clinical Toxicologists, la Asociación de Químicos Analistas Oficiales de EEUU (AOAC) y la de Forensic Pathologists o la Eurotox, están promoviendo la acreditación de los toxicólogos; no será suficiente con estar titulado, habrá que demostrar la capacitación y revalidarla; será obligatorio además, participar en Programas de Garantía y de Control de Calidad, para que un centro o un profesional merezca la calificación de fiable; y esto, previsiblemente, se endurecerá en el TM.

Para terminar, quisiera insistir en que no he pretendido ser pesimista en mis prospecciones de futuro, y no hay necesidad de recalcar que, según se ve, las necesidades de la sociedad están obligando a la Toxicología a un enorme desarrollo, con nacimiento incesante de nuevas ramas aplicadas demostrativas de la vitalidad y la capacidad de servicio de nuestra ciencia.

Bibliografía

1. Kuhn TS (1962). The structure of scientific revolutions. Chicago University Press.
2. Jungk R (1991). La búsqueda de la utopía. El Correo de la UNESCO.
3. Jungk R (1953). El futuro ha comenzado. Editora Nacional, Madrid.
4. Calvo Hernando M (1995). La ciencia en el tercer milenio. McGraw Hill, Madrid.
5. Chambers PL, Gehring P, Sakai F (1986). New concepts and developments in toxicology. Elsevier, Amsterdam.
6. Chambers PL (1987). Attitudes to toxicology in the European Economic Community. J. Wiley & Sons, Chichester.
7. Chambers PL et al. (1991). Recent developments in toxicology trends, methods and problems. Springer-Verlag, Berlin.
8. Martínez Moreno JM (1992). Las modas en la investigación. Químicos del Sur, 29, 23-26.
9. Junger E (1980). Eumeswill. Seix y Barral, Barcelona.
10. Mayor Zaragoza F (1987). Mañana siempre es tarde. Espasa Calpe Madrid.

11. Repetto M (1987a). *Toxicología Fundamental*. 2ª ed. Científico-Médica, Madrid.
12. Repetto M (1985). La formación de toxicólogos clínicos. *JANO*, 19-29.
13. Repetto M, Sanz P (1995). *Glosario de Términos Toxicológicos*. versión española ampliada. glosario IUPAC, Asoc. Esp. Toxicología, Sevilla.
14. Bentley Ph (1995). Toxicology in transition. *Eurotox Newsletter*, 18, 1, 7.
15. Conning DM (1986). Toxicology. The next decade. *Arch. Toxicol. Suppl.* 2, 222-224. Springer Verlag.
16. Bridges FW (1985). Frontiers in biochemical toxicology. *FEST Bull.*, november, 11-15.
17. Butler WH (1995). Species specificity of organ toxicity. *Eurotox Newsletter* 18, 1, 17.
18. Orrenius S (1985). Biochemical mechanisms of cytotoxicity. *FEST Bull.*, 15-20.
19. Safe S (1995). Receptor-mediated toxicity. *Eurotox Newsletter*, 18, 1, 10.
20. Roth L, Hardison RD, James RC, Tobin T, Roberts SM (1992). Cocaine hepatotoxicity: influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology*, 15, 5, 934-940.
21. Gelbke HP (1993). New trends in toxicology and their impact on toxicity testing. *Human & Experimental Toxicology*, 12, 511-515.
22. Finkle BS (1990). Future trends in forensic drug testing. En J Segura y R Torre, First International Symposium, Current issues of drug abuse testing. CRC Press. Boca Raton.
23. Repetto M (1987b). Estado actual de la normativa comunitaria sobre la clasificación toxicológica de las sustancias químicas. *Rev. de Toxicología*, 4, 2, 175-186.
24. Repetto M (1989). Ética de la experimentación animal. *Rev. de Toxicología*, 6, 2, 185-193.
25. Repetto M (1990). The operation of the Directive 67/584 EC: Points of view from toxicological perspective, en: Chambers PL, Chambers MC, Registering new chemicals in Europe. JAPAGA, Ashford (Ireland).
26. Repetto G (1995). Recientes avances en la validación y aceptación de métodos alternativos in vivo e in vitro. *Rev. de Toxicología*, 12, 3-9.
27. Repetto G, Repetto M (1995). Métodos alternativos: estudios toxicológicos in vitro, en: *Toxicología Especial*. Díaz de Santos, 37-59.
28. Balls M, Ballboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, Fielder RJ, Guillouzo A, Lewis RW, Lowel DP, Reinhardt CA, Repetto G, Sladowski D, Spielman H, Zucco F (1995). Practical aspects of the validation of toxicity tests procedures. The report and recommendations of ECVAM Workshop 5. *ATLA* 23, 129-147.
29. Purshase I (1994). International harmonization of risk assessment. *IUTOX Newsletter*, 15-16.
30. Bass R (1986). Drug and risk assessment. *FEST Bull. sp. supp.* 25-28.
31. Kroes R (1986). Food additives and risk assessment, current status and future *FEST Bull. sp. supp.* 32-34.
32. Persoone G (1986). Impact on the environment. *FEST Bull. sp. supp.* 28-32.
33. Calamari D, Chiaudani G, Vighi M (1985), en: *Methods for estimating risk of chemical injury. Scope report 26* (Vouk B y cols, edit.) I Wiley. Chichester.
34. Popper K, Lorenz K (1992). *El porvenir está abierto*. Tusquets, Barcelona.
35. Repetto M y cols (1995). *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos, Madrid.