

RADICALES LIBRES Y TOXICOLOGIA*

Dr. P. ETIENNE FOURNIER

Profesor de Medicina Legal y Toxicología, Decano de la Facultad de Medicina.
Lariboisière - St. Louis (París) (Francia)

Me cabe el honor de presentar a ustedes una gran figura de la Toxicología europea: el doctor Etienne Fournier, profesor de Medicina legal y Toxicología, Decano de la Facultad de Medicina Lariboisière St. Louis, de París. Ha sido uno de los organizadores de la Asociación Europea de Centros de lucha contra las intoxicaciones y su primer Secretario General. Es Director científico de la Unidad de Investigaciones de Toxicología experimental, tiene hechas numerosas publicaciones sobre la materia: alrededor de 150, entre las que debemos destacar el manual sobre "Diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones humanas".

Su doctorado en Ciencias lo hizo sobre "Radicales libres en Toxicología".

También ha estudiado el "desarrollo de los Centros Anti-tóxicos y de la investigación en Toxicología humana".

Va exponernos un resumen sobre su estudio de los radicales libres en relación con la toxicología. Trabajo muy cuidadoso y elevado efectuado al amparo de las nuevas técnicas y aunque sus resultados no son muy contundentes, abren nuevos caminos para la identificación de los radicales libres, estudiando las propiedades magnéticas en Biología y el papel de los hetero-átomos en las moléculas que poseen acción fármaco-química.

Mon cher ami et Collègue: Nous vous remercions très vivement d'avoir venu pour honorer la tribune de cette Royal Académie centenaire, pour lequel ont passé autants grands hommes. Et nous vous remercions aussi d'avoir élu pour nous le thème si nouveau et très intéressant que vous allez a nous exposer. Merci.

A. BERTRÁN CAPELLA

GENERALIDADES

El término "radical libre" ha entrado actualmente en la teoría toxicológica y no peligró confundirlo con los fragmentos de moléculas o radicales químicos aislados por los químicos, al generalizar ciertos estudios: el *radical libre* es una forma físico-química, bajo la cual pueden existir átomos o moléculas cuando éstos lleven un *electrón aislado*, cuyas características magnéticas (spin) permiten su señalización si el radical es suficientemente abundante y tiene una vida suficientemente larga.

En varias publicaciones hemos precisado los principales modos de formación de los radicales libres a partir de las moléculas y constatado que existía una verdadera gama de radicales, según su estabilidad expresada por la energía necesaria para su formación y la duración de su vida.

Así, se pueden descubrir *radicales libres estables*, fácilmente medibles por la espectrografía E.P.R. y *radicales inestables*, más difícilmente accesibles e incluso no medidos por este método.

A la inversa, los radicales estables no tienen, en general, una reactividad química fuerte, mientras que los radi-

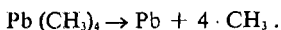
* Conferencia pronunciada el día 12-II-73. Presentación del Académico Correspondiente Nacional Dr. Alejo Bertrán Capella.

cales inestables se fijan, con frecuencia de manera muy brusca, sobre diferentes zonas resultando estructuras típicas cuya cualidad define la toxicidad del radical.

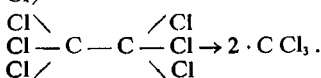
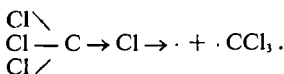
Recordaremos las principales reacciones de los radicales libres: *reacciones de formación* a partir de moléculas estables:

b) *Electrón sobre C*

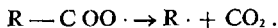
Organometálicos



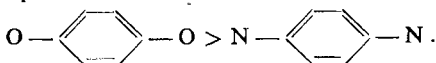
Organohalogenados



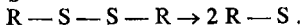
Peróxidos



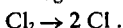
Semiquinónicos por resonancia



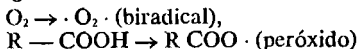
c) *Electrón sobre S*



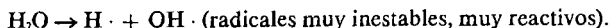
d) *Electrón sobre halógeno*



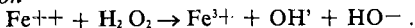
e) *Electrón sobre O*



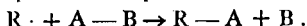
y sobre H



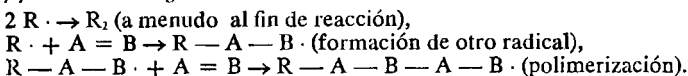
Oxidorreducción



Reacción de desplazamiento por un iniciador



Reacciones de fijación radicalógena



Función del medio reactivo

Las *reacciones radicalógenas* de recombinación son, en realidad, de complejidad variable.

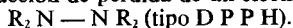
Si dos radicales acaban de formar-

a) *Electrón sobre N*

Hidrazinas sustituidas



reacción de pérdida de un electrón:



Rotura:



Azoícos

Rotura:



Diazoícos

se inmediatamente a partir de una sola molécula, pueden recombinarse íntegramente porque los dos *spins* electrónicos son antiparalelos, lo que explica la *curación* de lesiones debidas a radiaciones ionizantes.

Por el contrario, si los dos radicales proceden de *moléculas diferentes* A y B, la probabilidad de reformación de una molécula AB no es más que de una sobre cuatro colisiones, porque el estado triple formado por colisión es tres veces más probable que el singular. El estado triple formado no puede originar una unión sin volver a pasar por el estado singular (lo cual requiere un tiempo bastante prolongado y el radical puede tener un tiempo de riesgo de reacción bastante elevado).

La *reacción en cadena* necesita también algunas observaciones, porque en química orgánica define una serie de síntesis, por ejemplo, las polimerizaciones. Así, la reacción de un hidrocarburo sobre el cloro tiene una "longitud de cadena" de mil o más, es decir, que cada radical iniciador conduce a la iniciación de mil moléculas. Esta reacción, que puede ser iniciada por la luz, sería un peligro en potencia extremo, en biología, si pudiera desarrollarse.

De hecho, en el agua, en medio biológico, los radicales libres quedan bloqueados en su iniciación por un efecto de jaula donde los radicales no pueden difundirse entre las moléculas polares del solvente. El fenómeno puede mejor producirse en medio lipídico, no polar donde veremos esbozarse las reacciones radicalógenas.

pectrografía EPR no han permitido hasta el presente más que raras observaciones y el único resultado actualmente adquirido es la presencia normal de centros paramagnéticos en los tejidos vivos.

1 a. El método de COMMONER ilustra sobre todo el hecho de que los aparatos más modernos no pueden utilizarse más que al límite de sus posibilidades para los registros de este género y que el riesgo de un error experimental importante no está jamás excluido: la más mínima impureza puede hacer aparecer una señal superior a la que se desea medir. Hemos, en principio, preferido registrar directamente la señal de la "célula en blanco" (dentro del cuadro particular muy plano y no reproducido en la escala elegida) después de la señal EPR, no siendo utilizado el analizador multicanales más que para materializar una raya ya bastante ostensible en la zona $G = 20$. Nos ha parecido casi imposible establecer un espectro muy manifiesto sobre 1.000 G, ya que las variaciones de absorción de la célula provocan perturbaciones muy importantes con relación a la señal investigada.

$g = 2,00$	↗	Hígado
↓	H	H 3389 G
	←	N 9520
		200 mW
		Bal 100 G en 30 sec
		Mod 15
		ADS 5 mV
		6 = 0,1 sec 10 pasados

Las recientes investigaciones sobre tejidos vivos estudiados con los métodos más modernos, han confirmado toda la presencia de radicales libres indiscutibles y cuyo número es diferen-

RADICALES LIBRES DE LOS TEJIDOS

1. Radicales libres y tejidos vivos

Las posibilidades técnicas de la es-

te según se trate de uno u otro órgano; los tejidos más ricos son: el hígado, el corazón y el riñón, mientras que los músculos y la sangre contienen muy pocos.

1 b. El espectro EPR de las mitocondrias aisladas de tejidos como el hígado es bastante análogo, pero los resultados no pueden discutirse por la ausencia de detalles unidos a la técnica misma de la espectrografía RPE, cuya sola noción muy probable será el reconocimiento de por lo menos dos tipos de radicalógenos:

- *Orgánicos*: flavínicos y semiquinónicos, caracterizados con un coeficiente $g = 2,00$.
- *Metaloprotéinicos*: hierro no hemínico en particular $g = 2,03$.

Los estudios de microsomas, a la temperatura del N líquido que permite la observación de pequeñas cantidades de radicales, han demostrado su presencia y su aumento bajo el efecto del O y del NADPH. Este efecto es inhibido por los tóxicos que bloquean el citocromo P450, lo que ha conducido a una hipótesis que vamos a desarrollar: la aparición de radicales libres sobre los núcleos aromáticos de la proteína del citocromo P450. Esta noción de una activación radicalógena reversible de las proteínas portadoras de restos aromáticos tiene un gran interés en toxicología y se opone a la desnaturalización proteínica que desarrollaremos también y que corresponde a una embestida o acceso sobre los aminoácidos no aromáticos.

1 c. La formación de radicales

tiene lugar para ciertas enzimas, en particular las enzimas de forma semiquinónica derivados de las flavinas (transportadoras de hidrógenos) o los derivados de la ubiquinona o coenzima Q y que es fácil observar los trazados EPR a partir de las mitocondrias donde se encuentra esta cadena metabólica y el hierro no hemínico. No obstante, las mitocondrias no contribuyen más que a una parte de los radicales celulares. Esquemáticamente, las células más ricas en sistema de oxidación de sustancias extrañas tienen la máxima señal EPR y este fenómeno estaría sobre todo ligado a los fenómenos de oxidación microsomal probablemente por transferencia directa de electrones del substrato al O y reducción del O en peróxido de H, normalmente destruido por las peroxidasas que protegen la célula.

Otras reacciones directas y reversibles sobre las proteínas son aquí posibles. Los hechos toxicológicos, para ser significativos, deben corresponder a los fenómenos normales exagerados o inhibidos y a alteraciones específicas.

2. Efectos del tratamiento FD

2 a. La misión de la desgasificación del O ha sido señalada, pero modifica muy débilmente el contenido aparente en radicales libres. Nosotros hemos mostrado, por el contrario, la correlación constante existente entre la aparición brusca de centros paramagnéticos en el tejido congelado en curso de deshidratación cuando los tejidos encierran menos de un dos por ciento de agua. Numerosos lípidos ti-

sulares, en particular los de las mitocondrias, están en un estado de verdadera "solubilidad en agua" (BASFORD, R. E., y GREEN, D. E., 1969).

Este estado se debe a los grupos polares que permiten la estabilidad de las micelas, que en algunos casos pueden estar próximas a las dimensiones moleculares. La congelación cancela el estado de orientación molecular "soluble en agua" y vuelve las estructuras tisulares mucho más insolubles.

El método de "freezing - drying", tal como lo hemos utilizado nosotros, provoca mecánicamente por el simple hecho de la micro - cristalización una rotura entre las zonas hidratadas, en particular proteínicas, y las zonas lipídicas. La supresión del agua por evaporación a baja temperatura impide la reformación de una estructura lipoproteínica fisiológica.

Por ello no carece de interés notar que todos los trabajos biológicos recientes sobre la cadena de transporte de los electrones, insisten sobre el carácter lipoproteico de los citocromos A y C₁, de la DPNH flavoproteína (FD) y la succínica Q reductasa y acerca del papel propio de los lípidos cuyo tenor es:

- 22 % del peso seco para el citocromo a (GRIFFITHS, D., y WHARTON, D. C., 1960).
- 50 % para el citocromo c (GREEN, D. E.; JARNEFELT, J., y TOISOALE, H., 1959).
- 85 % para el FD (ZIEGLER, D. M.; GREEN, D. E., y DOEG, K. A., 1959).

— 22 % para la succínica Q reductasa (ZIEGLER, D. M., y DOEG, K. A., 1959).

2 b. El concepto bioquímico actual hace desempeñar un papel muy particular a los lípidos enzimáticos (95 % de fosfolípidos sobre todo en forma de cefalina o de plasmalógeno, tiene un gran contenido en ácidos grasos no saturados) en el transporte de electrones.

Estudios complementarios han demostrado que las sustancias liposolubles no se distribuyen uniformemente en la mitocondria, lo que supone zonas de concentración preferencial esquematizadas por una localización "entre las dehidrogenasa succínica y el citocromo". Pero los lípidos no forman por tanto una emulsión; su estado físico es "soluble en agua", permitiendo una orientación perimicelar cuya fase polar se dirige hacia el exterior.

La congelación provoca la rotura del estado micelar "polarizado", la coalescencia de las micelas y su insolubilidad. También facilita, al mismo tiempo, la difusión del agua y su evaporación, pero el efecto obtenido es irreversible. Esta hipótesis de trabajo de GREEN, D. E. y afianzada por numerosos autores, ha entrado en la fase de confirmación detallada y no parece exagerado considerarla como uno de los puntos esenciales de la discusión. En efecto: las estructuras quinónicas tisulares, además de las melaninas, están esencialmente constituidas por la ubiquinona presente en las mitocondrias en forma liposoluble e hidratada.

La espectrografía EPR a temperatura ordinaria nos ha parecido un medio indirecto de mostrar la aparición en los tejidos de radicales libres lipotrópicos en el momento de la deshidratación, después de la destrucción micelar por congelación ,cerrando esta afirmación en límites experimentales.

En tanto que la estructura mitocondrial permanece hidratada, el radical se extingue más o menos completamente. El valor cuantitativo de la medida depende, pues, estrechamente de la cualidad de deshidratación.

MODIFICACIONES METABOLICAS

Aspectos indirectos sobre tejido liofilizado

Los primeros ensayos de anoxia aguda en cortes de hígado o de intoxicación de la citocromoxidasa por el cianuro de potasio, no ha provocado ninguna modificación, lo cual tiende a demostrar que los radicales estables desenmascarados por la liofilización no están ligados a los últimos estadios del metabolismo general.

Hemos efectuado nosotros un número limitado de experiencias orientadas en función de los datos actuales sobre la formación de melaninas y la relación verosímil entre los productos quinónicos, flavínicos y el espectro EPR de los tejidos, sobre la iniciación radicalógena posible a partir de moléculas susceptibles de degradarse en el organismo, con producción de radicales libres.

Salvo indicación particular, todas las intoxicaciones han sido efectuadas por sonda gástrica (per os) a dosis de 500 mg/kg y la muestra de los órganos se ha extraído 45 minutos después de la intoxicación, habiendo sacrificado al animal por decapitación. El término "intoxicación" se ha elegido para no autorizar ninguna interpretación de los *fenómenos fisiológicos normales* a partir de estos datos y aunque los animales no hayan presentado ninguna alteración.

El signo □ indica: tasa elevada igual o superior a dos veces la tasa media.

El signo ● indica: tasa rebajada igual o inferior a la mitad de la tasa media.

La interpretación de los resultados se ha hecho sobre tres grupos de ratas sacrificadas a 6 meses de distancia: la exigüidad de los lotes se debe al tiempo de preparación y de mediciones. Hemos tenido en cuenta los aumentos y las disminuciones evidentes. Esta prudencia nos ha parecido justificada por los resultados contradictorios obtenidos en el curso de ciertas intoxicaciones. No mencionaremos, pues, aquí más que los resultados claramente homogéneos.

Quinonas

La intoxicación por quinonas importantes en toxicología y en farmacología o por derivados precursores de estructuras quinónicas no ha provocado más que débiles variaciones.

La hidroquinona ,reductor potente,

ha aumentado el contenido en radicales libres en los tejidos como el cerebro, el corazón, las suprarrenales.

Las quinonas (oxidantes potentes) y los derivados nitrados por el contrario, las han rebajado.

La elevación marcada del contenido en radicales al nivel del hígado y sobre todo del corazón de animales intoxicados por la fenil - indanodiona (anticoagulante) es considerable y tiende a confirmar el carácter particular de la estructura indánica, reconocido en las melaninas y la posibilidad de acciones directas distintas del fenómeno de inhibición de la síntesis proteica a partir de la vitamina K. La acción sobre las suprarrenales es también muy curiosa. Elevación por la hidroquinona, disminución por la fenil - indano - diona del contenido en radicales libres.

Reductores biológicos

Hemos investigado para verificar si las modificaciones observadas se debían simplemente a perturbaciones del equilibrio de oxidorreducción.

La comparación con tres reductores biológicos nos ha demostrado que su comportamiento era muy diferente. El ácido ascórbico ha provocado una elevación considerable de la señal al nivel del corazón y del hígado, sin ninguna variación en su forma.

A la inversa, el hiposulfito de sodio ha provocado una reducción general de la intensidad de las señales, allí aun sin variación de forma.

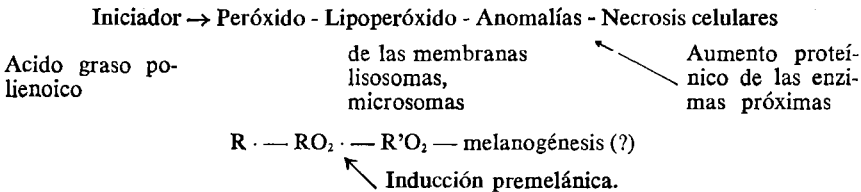
Este resultado puede interpretarse como una demostración del efecto de formación de radicales libres por el ácido ascórbico en presencia de peroxidasa, siendo, por el contrario, el ion tiosulfato inhibidor de la reacción radicalógena por su fuerte reactividad sobre los radicales formados, en particular quinónicos.

Fotosensibilización y radicales libres

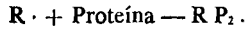
Las reacciones de fotosensibilización son la pauta en las reacciones físico - químicas en las que la activación por energía fotónica determina el fenómeno. Como la luz, sobre todo la ultravioleta, es uno de los activadores clásicos de las reacciones radicalógenas, es tentador el hacer desempeñar un papel esencial en la fototoxicidad a los radicales iniciadores formados por irradiación.

1. Según el caso, se observará:

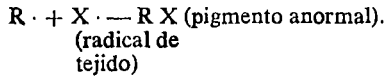
1 a. Una modificación en las reacciones fotoquímicas normales que determinan eritema, edema, descamación y melanogénesis y que notaremos sin afirmación de una secuencia bioquímica obligatoria:



1 b) Una reacción anormal de tipo alérgico: eczema y a veces urticaria:



1 c) Una reacción anormal unida al producto de fotosensibilización, pigmentación por ejemplo, o fijación sobre las melaninas.



El tipo de energía de activación juega un papel importante y los dermatólogos separan la acción de la luz visible (hasta 4.000 Å) y que no provoca más que raras foto-alergias y reacciones especiales con un cuerpo como el bitional, o sobre sujetos particulares porfíricos, critropoyéticos: un sector A hacia 3.200 Å de ultravioleta cercano atravesando el vidrio, pigmentógeno y determinante de dermatitis, produce una sensibilidad al proraleno, al alquitrán: un sistema B hacia 2.800 Å más característica del eritema solar y reacciones francamente alérgicas, un sistema C de ultravioleta lejano.

2. ¿Pueden explicarse estos fenómenos?

Actualmente las explicaciones son aún incompletas, no obstante, los fenómenos de fotosensibilización se ligan a dos factores que las favorecen.

2 a. *La no formación de melaninas.* — Substancias acerca de las cuales hemos indicado el papel probable de tampón radicalógeno y cuya formación está ligada al metabolismo de las catecolaminas. Este es el caso de las fotosensibilidades de los sujetos albinos o rojos.

Una anomalía de formación de melaninas se reconoce probablemente el escleroderma pigmentosum de Kaposi, pero se puede tratar de una reacción anormal hacia arriba.

2 b. *La formación de substancias radicalógenas o iniciadoras de radicales.* — Bien sea endógeno como las porfirinas o de origen exógeno: entonces encontramos los cuerpos señalados como formados o fácilmente transformados en radicales libres por una activación ligera; los hidrocarburos policíclicos: antraceno, alquitrán. Los derivados aminados cíclicos y policíclicos: acridina, fenotiacina. Los derivados pseudoquinónicos:

Derivados de paraminas aromáticas (sulfamidas).

Derivados fenólicos.

Derivados oxigenados (psoralenos)

Derivados halogenados de ciertos hidrocarburos:

Dimetil.

Clortetraciclina.

Bitional.

Hexaclorofeno.

2 c. La reacción en sí depende del fenómeno físico - químico realizado.

Si el radical o la molécula activada transmite su energía a intermediarios normales de la reacción cutánea a la luz se comportará como una acción regular anotada como dermatitis fototóxica; cuando el radical formado actúa directamente, de manera análoga a un cuerpo sensibilizante como DNFB que se fija sobre los residuos aminados de las proteínas, aparecerá un eczema y se hablará de dermatitis fotoalérgica.

El análisis de situaciones muestra aquí la ausencia de límites ciertos entre los fenómenos tóxicos y alérgicos, puesto que la reacción precisa sobre los lugares moleculares privilegiados muy característica del mecanismo tóxico sobrevive ante todo al curso de la reacción alérgica.

Radicales libres y toxicología pulmonar

1. El efecto es aquí directo: los radicales libres se producen en la atmósfera respirada y reaccionan sobre el revestimiento bronquiolo - alveolar.

1 a. Las particularidades físico-químicas conservan el estado gaseoso del tóxico, su tipo de solubilidad, la presencia de oxígeno que favorece las reacciones de peroxidación y la presencia de un verdadero film protector en el alveolo, film lipoproteico necesario para el equilibrio de la tensión superficial o superficiante.

Todas las condiciones están, pues, colmadas para hacer de los radicales

libres un elemento esencial de la agresión tóxica pulmonar.

Los principales gases iniciadores son los vapores nitrosos, el ozono y el oxígeno a presión, de acción mucho más débil.

Las radiaciones solares son también iniciadoras importantes que determinan la toxicidad de ciertas atmósferas industriales en regiones soleadas.

1 b. El ozono, los óxidos de nitrógeno, son formadores, en agua, de radicales libres susceptibles de actividad biológica extremadamente intensa con destrucción total de las estructuras celulares. En dosis muy débiles, los radicales formados son aún los iniciadores de lipoperoxidación, con formación de lípidos (ceto o aldodiénicos) y de proteínas anormales polimerizadas cuyas características participan de la explicación de formaciones patológicas como la membrana hialina y las figuras mielínicas. El conjunto de estas reacciones pasa por intermediarios múltiples que explican las reacciones tóxicas debidas, por ejemplo, a la acroleína o a peróxidos de hidrocarburos y los fenómenos clínicos como el retraso en el desencadenamiento de ciertas intoxicaciones. La protección contra los radicales libres es difícil por razón del carácter directo de la agresión. Ciertos derivados orgánicos azufrados, la vitamina D, etc., desempeñarían un papel teórico favorable.

2. Mecanismos

Notemos que el mecanismo radicalógico esquematizado por FARMER y WITTING:

cuando una irradiación provoca una ruptura en una molécula de agua:



La desnaturalización proteínica por los lipoperóxidos no es idéntica para todas las proteínas:

Para el citocromo C, por ejemplo, los aminoácidos proteínicos que ejercen su acción sobre los radicales peróxidos están en este orden:

Histidina - serina - prolina - arginina - metionina - cistina; mientras que para las radiaciones el orden es:

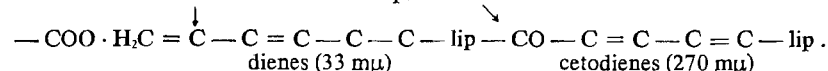
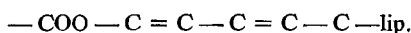
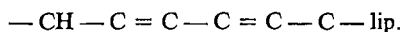
Metionina - histidina - cistina - fenilalamina - serina.

Pero el resultado "invitro" es una mezcla de dímero, de tetrameropolímero y de productos de ruptura, demostrando la potencia de la reacción.

1 b. Los protectores más eficaces "in vitro" son para las reacciones peroxidicas, los antioxidantes lipídicos como vitamina E, los aminoácidos azufrados (y seleniados), mientras que para las radiaciones, son sobre todo los derivados sulfhidrilo. "In vivo" la vitamina E es el único elemento fisiológicamente activo.

La peroxidación lipídica se observa sobre todo a nivel de las membranas

ROO



Estos lípidos anormales están ciertamente formados en el momento de la intoxicación por los derivados halo-

de las mitocondrias y del retículo endoplásmico y las hemoproteínas son potentes catalizadores de peroxidación.

El ácido ascórbico, el glutatión y los iones ferrosos son buenos iniciadores "in vitro". "In vivo", su acción es ciertamente más compleja por razón de su lugar en las cadenas de transporte de hidrógeno, de su metabolismo y de la necesidad de ciertos iones; el ácido ascórbico tiene una fuerte dosis, aumentando, no obstante, considerablemente el contenido en radicales libres del hígado (liofilizado) de conformidad con la teoría.

Degradación lipídica

2 a. La desnaturalización proteínica no es el único fenómeno tóxico ligado a la peroxidación de lípidos. Esta reacción corresponde a una compaginación molecular con conjugación diénica de los dobles enlaces. El ataque radicalógeno sobre los puentes metilénicos se haría dentro de las zonas de resonancia y la formación de peróxidos orgánicos se acompañaría de la liberación por escisión de trozos de lípidos portadores de conjugación diénica, por consiguiente, anormal.

genados de los hidrocarburos hepatotóxicos y el test descrito por RECKNAGEL, R. O., y GHOSHAL, A. K. de ex-

tracción cloroformometanólica de los microsomas y a medida que se efectúa la absorción UV de los lípidos en la zona de 235 m μ debería hallar su lugar en toxicología experimental de rutina.

2 b. No conocemos la toxicidad peculiar de este tipo de ácidos grasos simples o cetónicos, pero no es un desatino formular la hipótesis que explique los fenómenos más generales de toxicidad de ciertos lípidos alimenticios y ciertas anomalías de la insuficiencia hepática grave.

3. Esquema de Slater

El carácter centrolobular de la necrosis hepática al CCl₄ ha conducido a SLATER a emitir observaciones de muy grande interés. Este autor se ha maravillado de:

- Que la necrosis sea centrolobular cuando el tóxico llega por la vía porta.
- Que la lesión predomina sobre el retículo endoplásmico durante las horas del inicio de la intoxicación.
- Que otros órganos más ricos en lípidos no sufran la misma agresión.
- Que la rata recién nacida sea menos sensible que la adulta.
- Que la necrosis no sea paralela a la esteatosis.

En un texto muy importante demuestra él, en 1966.

1. Que el tetracloruro de carbono

marcado en el C¹⁴ se fija sobre las proteínas del hígado y no sobre los lípidos y no puede prolongarse la duración del tiempo de iniciación antes de la reacción más brusca de necrosis celular que sobreviene entre las duodécima y la décimo - octava horas.

2. Que la localización centrolobular no está ligada a una protección periférica para una mejor oxigenación (aún si el oxígeno bajo presión protege en cierta medida experimentalmente contra la intoxicación por el CCl₄), pero tiene una heterogeneidad del lóbulo, siendo la zona centrolobular, por ejemplo, más rica en flavino - coenzimas.

3. SLATER hace desempeñar un papel *iniciador* a los sistemas enzimáticos de los microsomas (NAD - ascorbato oxidasa) y (NADPH₂ - ADP - hierro de lipoperoxidación) enzimas presentes solamente a dosis débiles en el recién nacido.

4. La acción sobre el retículo endoplásmico será más importante que sobre las mitocondrias porque, para superficies equivalentes de membranas, la desorganización sobreviene con tasas de radicales sobre las membranas de una sola capa, 500 veces más pequeñas que las tasas necesarias para la desorganización de una membrana de dos capas (TAPPEL).

La idea central es, pues, la iniciación de radicales a partir de sistemas enzimáticos de intermediarios radicalógenos de oxidorreducción y la fijación de estos radicales sobre las proteínas vecinas, probablemente, las proteínas enzimáticas mismas.

El radical CCl_3 que tiene una reactividad cercana a los radicales peroxi y la adulteración proteínica reduce los afectos focales de las enzimas.

Los radicales CCl_3 difundidos fuera de la zona de iniciación provocarían una fuerte activación de los lípidos y su peroxidación, así como la formación de lípidos diénicos anormales, que se acumulan en la célula y reemplazan la mayor parte del retículo endoplásmico.

La adulteración proteínica más difusa, el acceso de los radicales a los lisosomas, por exceso o por defecto de protectores biológicos, como la vitamina E, provocarían la necrosis celular.

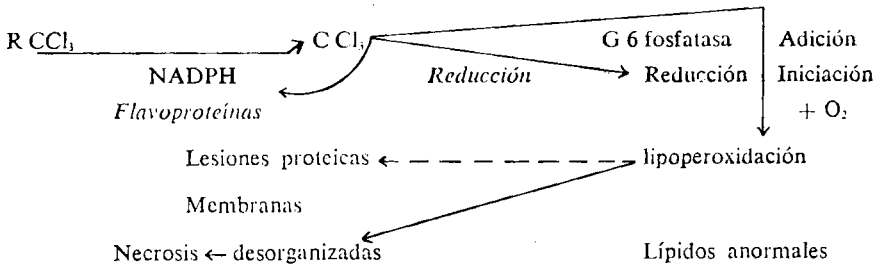
Las fenotiazinas, la vitamina E, el oxígeno a presión, la cisteamina, tienen un efecto protector si se les administra con el CCl_4 . El resultado parece, sobre todo, un efecto temporal de inhibición de la reacción necrótica, probablemente reduciendo la activación del CCl_4 por el sistema de peroxidación lipídica que una fenotiazina

como el fenergán, inhibe "in vitro". Pero el efecto no es más que parcial:

En un texto más reciente, SLATER y SAWYER (1970), recuperan la hipótesis de la activación de la hipoperoxidación con un modelo diferente, comprendiendo siempre el NADPH, pero con el citocromo P450.

Con los microsomas, estos autores, demuestran que la estimulación de la lipoperoxidación, figurada por la producción de malonaldehído es función de la raíz cuadrada de la concentración de CCl_4 , lo que supone un efecto iniciador directo del CCl_4 y no solamente una fijación en zona lipófila. Otra noción importante es la reducción del efecto tóxico por las moléculas trampa de radicales libres, su aumento por la reducción de estas últimas durante la iniciación, por ejemplo.

En fin, una relación aproximada entre la energía de disociación de los radicales CCl_3 de grupos $\text{R} \cdot \text{CCl}_3$ y el efecto tóxico permite examinar un comienzo de aproximación físico - químico cuantitativo del fenómeno:



Este esquema modifica poco el primer esquema de SLATER (1965) y viene a explicar por qué la esteatosis y la necrosis hepática toman un cariz irre-

versible a los tratamientos cuyo efecto preventivo es por tanto evidente sobre el animal y muy tentador en el hombre.

**PROTECCION EXPERIMENTAL CONTRA EL EFECTO DE SUSTANCIAS
RADICALOGENAS O GENERADORAS DE RADICALES**

	<i>PULMON (O₂)</i>	<i>HIGADO (CCl₄)</i>
<i>Sistema neuroendocrino</i>	Inhibición de las vías espinocorticales. Paro del control fisiológico del eje pituitario. Tiroideo - suprarrenal.	Cordotomía. Adrenalectomía (efecto hipotermisante). Nupercaina.
<i>Inhalación a inyección preventiva</i>	Derivados azufrados (acción directa de la cisteína sobre los radicales mitroxy. T H A M	Cisteamina. Se O ₂ . O ₂ (?). Vitamina E.
<i>Antiinflamatorios</i>	Prednisolona. Prometazina. Aspirina.	Prometazina.
<i>Inhibidores de actividad microsomal</i>	Prometazina	Fenotiazinas S K F 525 A.
<i>Inhalación de modificadores fisicoquímicos</i>	Aerosoles lipídicos. T H A M	

REACCIONES DE MUTAGENESIS Y DE CANCEROGENESIS

Radical hidróxido y radiaciones

La reacción más importante proviene de la formación por radiación de OH radical hidróxilo en el que el potencial de toxicidad es muy grande, en razón de su fuerte energía.

a) DNA

Todos los radicales obtenidos por radiolisis del agua reaccionan sobre las bases de DNA. Por ejemplo, el hidrógeno reacciona sobre la tiamina formando un radical libre inestable que altera la molécula de DNA en un grado variable, a veces reversible por excisión metabólica de la zona afectada del DNA.

DOV ELAD ha observado los fenómenos análogos por reacción de cier-

tas molécula, directamente o después de irradiación.

H. J. THAESE ha mostrado también una reacción del peróxido de hidrógeno, o de los radicales. OH con la adenina provocando probablemente un efecto mutágeno.

b) Proteínas enzimáticas

Otros autores han señalado la importancia de las reacciones sobre los átomos de azufre y por ejemplo, G. STERN y H. JUNG han indicado que un átomo de hidrógeno formado por irradiación se fija sobre los grupos S - S de las enzimas y que un solo átomo puede inactivar una enzima entera.

TUMORES Y RADICALES LIBRES

En ciertos tumores de hígado (me-

tástasis, carcinomas hepáticos) las tasas muy elevadas de spins $4,7 \cdot 10^{-8}$ mol/g y una absorción EPR especial con una longitud de banda de 51,8 G han sido notadas.

Por el contrario, las tasas de spin habían sido encontradas bastante más bajas en diversos tumores de origen diferente (riñón, sarcoma, ojos, seno) y en un tumor obtenido por irradiación. VITHAYATHIL, A. J.; TENBERG, J. L., y COMMONER, B. (1965) han estudiado la formación de radicales libres en el hígado según la idea, sugerida por KENSLER, J.; DEXTER, S. O., y RHOADS, C. P. (1942), que ciertos cancerígenos actuarían gracias a la formación de intermediarios radicalógenos y la idea de PULLMAN, A., y PULLMAN, B. (1955) que han demostrado que las zonas de alta densidad electrónica de ciertas moléculas aromáticas poseían el carácter de un factor de cancerización.

Ha sido demostrado por los autores precedentes que la señal EPR de $g = 2,005$, normal en el tejido vivo, no aparecería en el tejido tumoral sobreviviente, más los trabajos recientes sobre tres cancerígenos: p - dimetilaminoazobenceno, tioacetamida, 2 - acetilaminofluoreno, hacen aparecer una nueva señal de $g = 2,035$ ausente en el hígado normal.

Los trabajos complementarios de COMMONER con aislamientos de las mitocondrias del hígado para volver a hallar la señal normal en el curso de intoxicación por la p - dimetilaminoazobenceno no han permitido demostrar en tal caso que la señal principal de

$g = 2,005$ es más clara en las mitocondrias hepáticas.

Esta constatación obliga a aceptar con prudencia la afirmación de VITHAYATHIL, A. J.; TORNBORG, J. H., y CILLIBER, B. (1965), cuando afirman detectar la señal específica de $g = 2,035$ (o sea de gauss alrededor de la señal principal) cuando de su experiencia de cancerización experimental por la 2 - acetilaminofluoreno, la p - dimetilaminoazobenceno y la tioacetamida en las ratas sometidas a un régimen deficiente en riboflavina. Hemos visto que sobre tejido liofilizado la zona próxima de la señal principal y correspondiente a la banda $g = 2,03$ sobre el tejido vivo, varía de una manera bastante importante.

STIER y AL, en 1972 han demostrado la biotransformación de las sustancias carcinogénicas en carcinógenas verdad.

La formación de radicales tetrametilpiperidina nitroxidada mediante una incubación de tetrametil piperidina muestra solamente que en ocasiones, de las reacciones de oxidación, pueden formarse ciertos radicales muy estables. Pero en el curso de esta etapa los radicales nitrooxidados se acumulan en las membranas microsomales y el hecho puede tener una cierta importancia teórica y práctica.

ENVEJECIMIENTO, INTOXICACIONES Y RADICALES LIBRES

En 1969 un experimento de D. HARMAN demostró que era posible retrasar

el envejecimiento de la rata y aumentar la duración de su vida media, mediante el empleo del butil -hidroxi -tolueno (BHT), producto antioxidante, utilizado en la industria de la alimentación y que actúa capturando radicales libres que han sido liberados por los peróxidos de grasas insaturadas. Comparando este hecho con el resultado de un experimento clásico en el que la irradiación de los animales a una dosis inferior a la DL_{50} provoca un envejecimiento acelerado, se tenían datos suficientes para basar una teoría del proceso de envejecimiento, por la acción de los radicales libres. Quizá las deducciones fueran excesivas pero debe tenerse en cuenta que los derivados azufrados descritos por BACQ, como agentes protectores frente a las radiaciones —betamercapto etilamina, y principalmente la cisteamina— producen también un efecto Harman. Otras explicaciones suponen que el envejecimiento del colágeno y de otras variedades del tejido conectivo, se debe a la formación de nuevos enlaces internos, lo que aumenta su consistencia y disminuye su solubilidad. Las radiaciones no provocan la formación de nuevos enlaces internos, aun que contribuyen a estimular la síntesis del colágeno (W. F. FORBES).

Otras teorías (H. J. CURTES) tienen en cuenta el papel del DNA y explican el envejecimiento por el acúmulo de efectos de mutación genética. Esta teoría es todavía frágil porque todas las pruebas son de carácter indirecto.

Existen sustancias pigmentarias fluorescentes parduscas, que se relacionan

con el proceso de envejecimiento. Se acumulan lentamente en las células que ya no se regeneran, y se les encuentra en cerebro, corazón y pulmón. Estos pigmentos son ricos en lípidos muy oxidantes y proteínas desnaturizadas por la existencia de enlaces internos (cross linking). Estos pigmentos podrían formarse como consecuencia de reacciones en que intervienen radicales libres. Su tasa de melanina a menudo elevada apoya esta hipótesis, lo que demuestra el interés del estudio de los radicales libres en los tejidos y de sus reacciones en toxicología, aunque no pueden aceptarse generalizaciones prematuras.

MARCADO DEL SPIN

El marcado del "spin", "spin -label", es una faceta distinta de la utilización de la espectrografía RPE. Se trata de una técnica muy sensible para la detección de algunos radicales estables. Es previsible la utilización de moléculas portadoras de estos radicales como trazadores biológicos. Así se ha propuesto el empleo de los nitróxidos porque se sintetizan con relativa facilidad, se les identifica bien y su metabolismo es semejante al de las aminas correspondientes.

1. El paso de estos radicales por el organismo es complejo porque su reactividad plantea a veces dificultades en la interpretación de los resultados. Además las propiedades físicas de los tejidos dificultan su detección mediante un radical muy preciso, como pue-

de ser el DPPH. Nos encontramos ante una verdadera desaparición de la molécula que se quiere detectar, que a veces solamente se identifica de nuevo después de una transformación profunda de los tejidos, principalmente por un proceso de liofilización.

En cambio es frecuente utilizar el marcado del "spin" con el fin de que reaccione *in vitro* la molécula marcada. El fenómeno más importante es la variación de la forma del signo, como consecuencia de una modificación en la molécula provocada en la periferia del radical, lo que es susceptible de una interpretación numérica.

2. Esquemáticamente la técnica del marcado del "spin" permite:

a) Reconocer si una molécula determinada está ligada a una reacción de tipo antígeno - anticuerpo. Así se pueden marcar algunas moléculas pequeñas, como la de la morfina. En presencia de un anticuerpo antimorfina la señal RPE se modifica, lo que permite una dosificación de elevada sensibilidad, comparable a la que proporcionan los métodos radio - inmunoquímicos. Sus ventajas e inconvenientes son parecidos.

b) Reconocer si una molécula se fija en determinadas zonas reactivas, por ejemplo a nivel de una membrana.

c) Observar los efectos que el paso de moléculas marcadas provocan en estructuras celulares específicas, por ejemplo, el paso a través de las capas lipoideas de la mielina se acompaña de una modificación característica del aspecto de las moléculas liposolubles marcadas.

d) Observar el efecto de estas moléculas circulantes sobre una estructura celular concreta: por ejemplo, el paso de la procaína por un axón marcado con ácidos grasos portadores de radicales nitróxidos, provoca una modificación de la distribución molecular con aumento de la movilidad de los ácidos grasos marcados.

CONCLUSIONES

1. El obstáculo más importante para el empleo de la técnica EPR en biología es su escasa sensibilidad. A pesar de la calidad y precio de los aparatos en el momento actual solamente pueden detectarse signos muy débiles en los tejidos, en el límite de la zona de sensibilidad. Es previsible que esta dificultad pueda superarse en un futuro próximo mediante el perfeccionamiento de los espectrógrafos. Es previsible también que existan dificultades para lograr registros útiles. Un tejido vivo exige la existencia de un medio acuoso con un equilibrio iónico. En estas condiciones los espectros EPR son poco característicos, no permiten una localización exacta, lo que hace dudosa cualquier interpretación fina.

Es preciso buscar nuevos caminos que faciliten el empleo de la espectrografía EPR en biología. En cada uno debe encontrarse un elemento suplementario de análisis: sea la separación de las distintas estructuras celulares, lo que ya se ha logrado en el caso de las mitocondrias y los cloroplastos y pue-

de completarse con el estudio de los núcleos del ergatoplasma y de las lisomas para las células enteras y con el estudio de fragmentos celulares, membranas de los hematíes por ejemplo.

Los primeros resultados han sido bastante modestos y nos encontramos ante la dificultad de interpretación de señales poco intensas, largas y sencillas, lo que no permite conocer todavía una estructura reactiva bien precisa. Existen también otras dificultades para una interpretación sencilla de los resultados EPR en los tejidos, en el caso de intoxicaciones agudas que teóricamente habrían podido ser muy demostrativas.

2. La *absorción del radical libre* más clásica, el DPPH no permite dosificarlo ni obtener una interpretación sencilla. Podría hablarse de un "trazador paramagnético" y paradójicamente, las cosas ocurren como si durante la absorción este carácter paramagnético desapareciese, tanto durante las fases de transporte (acuoso y lipoproteico) como en los fenómenos de óxido-reducción, tamponando los intercambios de electrones, que se hacen supersensibles con los aparatos y técnicas de que disponemos. Los tejidos vivos serían buenos captadores de radicales libres.

3. Un intento de *marcado "in vitro"* mediante un gas tóxico: la mezcla de NO y NO₂ que puede formar fácilmente radicales nítrógeno en los tejidos frescos no ha podido demostrarse en el animal vivo.

El hecho tóxico más característico, el edema agudo de pulmón causado por los vapores nitrosos, escapa a su

detección mediante la espectrografía EPR, probablemente por la escasa sensibilidad de la técnica.

4. El *análisis biológico más detenido*, mediante el aislamiento de enzimas o de grandes moléculas ha llevado a dos puntos importantes de progreso, el estudio de los metales unidos a proteínas y la estructura de las uniones; asimismo el marcado (spin label) de moléculas u organitos celulares sencillos nos muestra las propiedades de rotación o deformación de las moléculas mediante una interesante técnica sencilla.

Asimismo es posible utilizar la espectrografía EPR como un medio de identificación parcial de productos químicos que pueden provocar la formación de radicales libres. Esta técnica puede complementar provechosamente las de estudios electrolítico y polarográfico.

Es preciso efectuar una extracción previa, después un tratamiento mediante un reactivo del tipo del ácido sulfúrico concentrado. El método es muy agresivo, poco sensible, no permite el estudio de estructuras hiperfinas mediante los reactivos de los radicales libres. Recordemos que técnicas colorimétricas análogas (uso del ácido sulfúrico) se utilizan todavía de modo tradicional en toxicología analítica y que estos procedimientos son asimismo utilizados en la determinación en cromatografía en capa fina.

Posiblemente otros reactivos pueden dar mejores resultados y de hecho se está desarrollando con rapidez la síntesis de reactivos de radicales libres

que den lugar a productos de reacción estables o identificables.

La espectrografía EPR constituye, pues, una nueva técnica para la medición de una energía electromagnética. Sus condicionamientos geométricos pueden convertirla en una técnica

de tipo cualitativo más que cuantitativo, ocupar un primer lugar y ser irremplazable en la parte que estudie las propiedades magnéticas en biología y el papel de los heteroátomos en las moléculas que poseen una acción farmacodinámica.

PLAN

1. Radicales libres. Generalidades:

Variedad de los radicales libres — Estabilidad.
 Reacciones de formación.
 Reacciones químicas.
 Reacciones y medio químico.

2. Radicales libres de los tejidos:

a) Tejidos vivos

Detectación EPR.

— Tejidos con melanina.

— Tejidos sin melanina.

— Interpretación esquemática,
 semiquinonas,
 flavinas, ubiquinonas,
 metaloproteínas.

— Elementos celulares: radicales libres,
 mitocondrias,
 microsomas.

— Funciones celulares,
 sistema de óxido - reducción,
 oxidación de sustancias extrañas,
 trapping de radicales libres.

b) Liofilización (FD)

— Dispositivos EPR.

— Aspectos de las señales y variantes.

— Interpretación de los dispositivos,
 paso de una fase hidrófila a fase lipófila,
 creación de nuevas relaciones moleculares.

— Resultados de intoxicaciones masivas en tejidos examinados en FD.

- Quinonas.
- Ac. ascórbico y reductores biológicos.
- Iniciadores radicalógenos.
- Derivados azufrados.

3. *Radicales libres y toxicología:*a) *Fotosensibilización*

fototoxicidad,
fotoalergia,
pigmentación.

Energía de activación.

Interpretación: no formación de melaninas,
sustancias radicalógenas.

b) *Toxicología pulmonar*

Radicales gaseosos.

Mecanismo: efecto de lipoperoxidación.

Reacciones en causa,
radicalógenos y no radicalógenos.

Protectores.

c) *Toxicología hepática*

Radicales producidos por metabolismo.

Mecanismo: lipoperoxidación,
desnaturalización proteínica,
degradación lipídica,
difusión.

Efecto protector.

Integración del fenómeno: teoría de Slater.

d) *Mutagénesis*

Radicales altamente energéticos.

Efectos sobre DNA,
sobre enzimas azufradas.

Cancerogénesis

Radicales libres de los tejidos cancerosos.

Radicales libres después de intoxicación por cancerógenos.

Acumulación microsomal.

Envejecimiento

Efectos antioxidantes y teoría radicalógena.

Pigmentos de envejecimiento.

4. *Marcaje de spin:**Conclusiones*

Palabras finales. — El profesor J. A. SALVÁ MIQUEL (Decano de la Facultad de Medicina autónoma y catedrático numerario de Farmacología experimental) glosa algunos de los aspectos del tema y subraya con el autor la importancia toxicológica de los radicales libres, al presente.

Y el doctor B. RODRÍGUEZ ARIAS, que presidía la sesión, felicita por su magistral lección al insigne profesor, le agradece haya querido honrarnos con su visita y recuerda que ORFILA, gran maestro legista en París, une espiritualmente a su patria chica (Mahón, en Baleares), nuestra Barcelona y la capital de Francia.