

*PILAR GÓMEZ RAMÍREZ
TOXICOLOGÍA
GRADO EN FARMACIA*

**EVALUACIÓN DEL RIESGO
TOXICOLÓGICO**

1

**EVALUACIÓN DEL RIESGO
TOXICOLÓGICO**



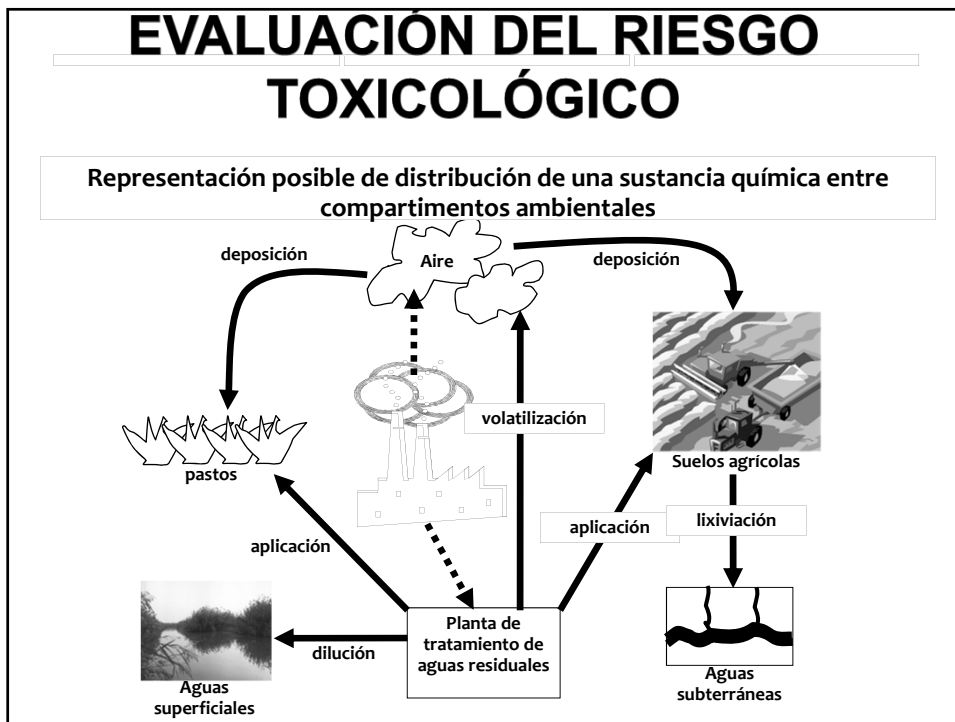
compuestos industriales, plaguicidas, aditivos alimentarios, compuestos farmacéuticos, detergentes y cosméticos

**Nº incalculable de origen natural
> 400.000 de origen sintético
> 100.000 comercializadas
>10.000 interacción habitual**

2



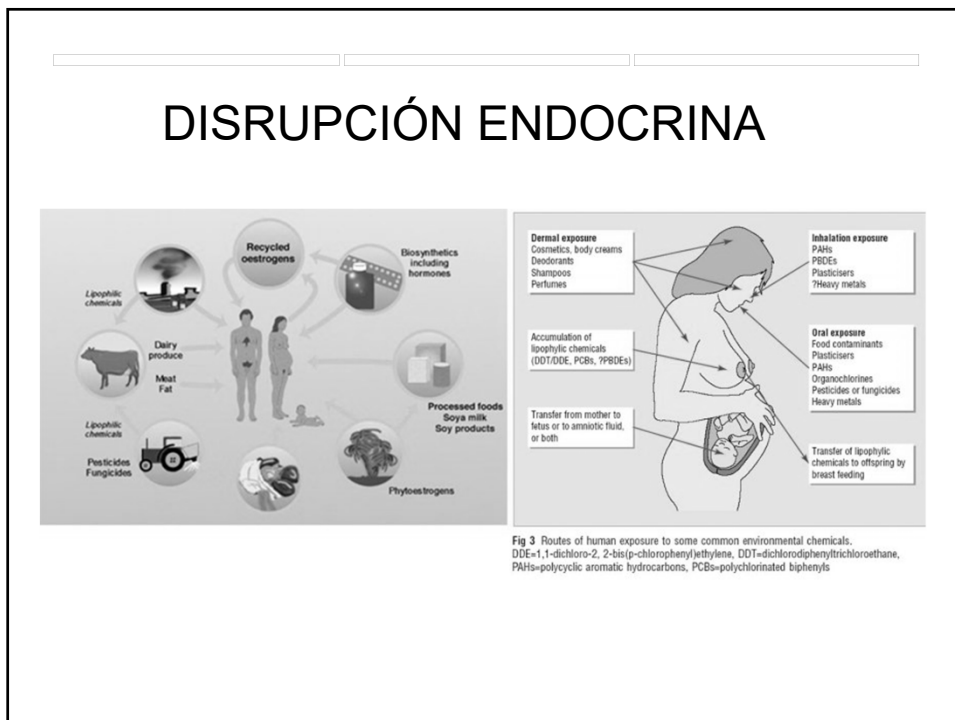
3



4



5



6

EFFECTOS SOBRE LA SALUD ANIMALES SILVESTRES



- Disminución de la puesta de huevos por nido
- Disminución del número de huevos eclosionados
- Disminución del número de pollos que sobreviven tras varias semanas de vida
- Disminución del grosor de la cáscara de huevo por DDE



7

EFFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA

- Alteraciones sistema reproductor masculino:
 - Disminución de la calidad del semen e infertilidad
 - Alteración del desarrollo fetal con malformaciones congénitas del tracto urogenital
 - Criptorquidia (no descenso testicular)
 - Hipospadía (posición anormal de la apertura de la uretra)
 - Tumores de células germinales de los testículos.

8

EFFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA

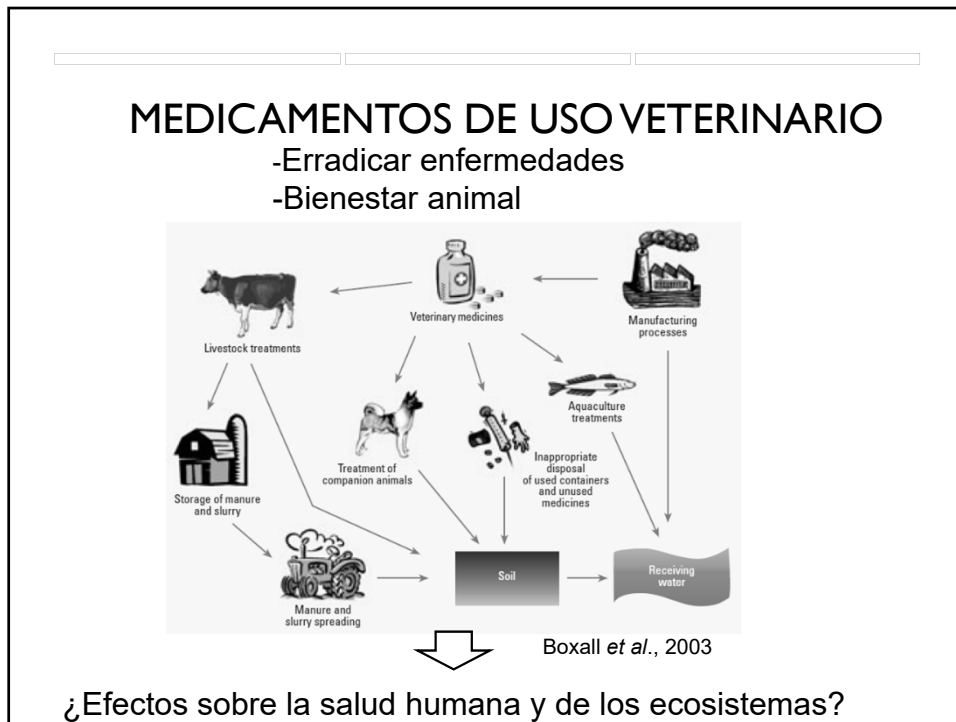
- Alteraciones sistema reproductor femenino:
 - Pubertad precoz
 - Reducción de la fecundidad
 - Síndrome de ovarios poliquísticos,
 - Reducción de la fertilidad
 - Resultados adversos del embarazo
 - Endometriosis y fibroides uterinos (tumores no cancerosos)
 - Cáncer de mama y de ovarios.

9

EFFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA

- Otras alteraciones:
 - Cáncer de tiroides
 - Alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso
 - Retraso mental, autismo, dificultad de aprendizaje
 - Enfermedades metabólicas
 - Síndrome metabólico
 - Diabetes
 - Obesidad
 - Alteraciones inmunes

10



11

RIESGO DEL USO DE MEDICAMENTOS

<http://www.market.com>

<http://masinforiaeso.blogspot.com>

<http://biotaetscientia.wordpress.com>

DICLOFENACO

- ↓ poblaciones de buitres en la India (1990-2004) (Sumpter, 2010; Cuthbert *et al.*, 2011)
- Gyps particularmente sensibles.
- ¿Caso extremo? → **Farmacovigilancia ambiental**

OTROS MEDICAMENTOS

⇌

12

RIESGO DEL USO DE MEDICAMENTOS

- DICLOFENACO EN ESPAÑA
 - Recientemente autorizado USO VETERINARIO
 - Las mayores poblaciones de buitres de Europa: En P. Ibérica



13

EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO



compuestos industriales, plaguicidas, aditivos alimentarios, compuestos farmacéuticos, detergentes y cosméticos

Nº incalculable de origen natural
> 400.000 de origen sintético
> 100.000 comercializadas
>10.000 interacción habitual

↓

EVALUACIÓN DEL RIESGO

14

EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO

Objetivo de la Toxicología

Evaluación de los peligros potenciales de los compuestos tóxicos sobre el hombre, los animales y el medio ambiente, evaluando la toxicidad y exposición a las sustancias, caracterizando los riesgos a las mismas

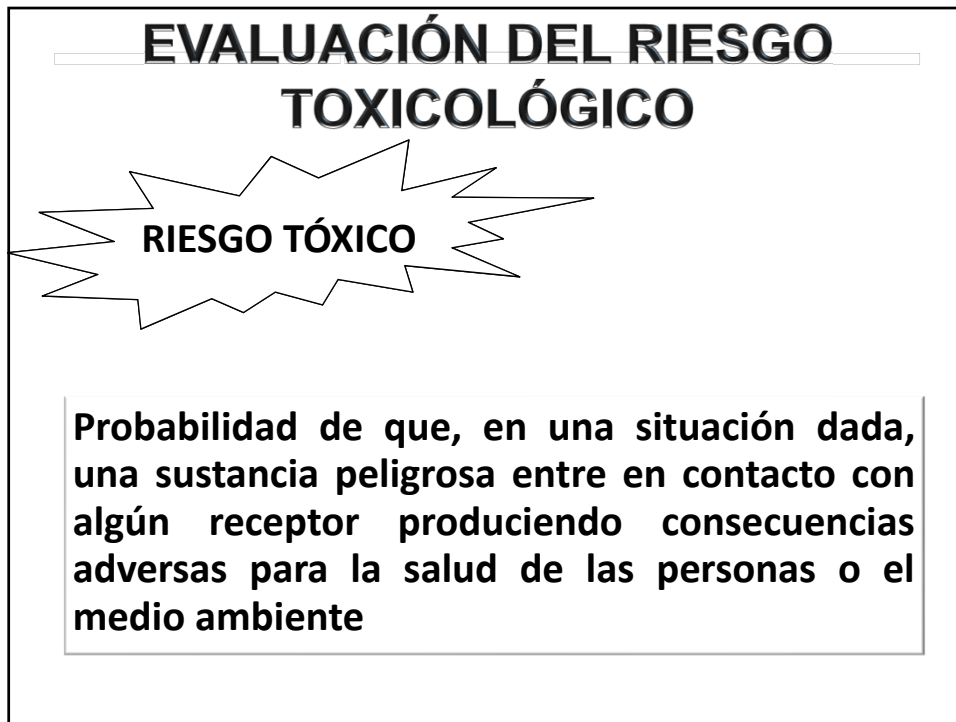
15

EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO

PELIGRO

Potencial de una sustancia para producir efectos adversos en una situación dada

16



17



18

EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO

RIESGO TÓXICO

PERCEPCIÓN DE LOS RIESGOS:

- Población afectada (especies, tamaño)
- Probabilidad de producirse los daños
- Habitación de la población a ese tipo de daño
- Efectos a nivel individual
- Aceptación voluntaria
- Beneficios


NO EXISTE EL RIESGO CERO:

- DISMINUIR EL RIESGO
- BENEFICIO-RIESGO

19

EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO

RIESGO TÓXICO




DIFICULTADES:

- Mezclas de compuestos/metabolitos activos
- Distribución no uniforme de la exposición
- Relaciones dosis-respuesta complejas
- Diferencias interespecíficas, individuales...

20

EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO



“Caracterización científica y sistemática de los posibles efectos adversos sobre la salud, que se pueden producir como consecuencia de la exposición a agentes o situaciones peligrosas”
NRC

Actividad realizada por **EXPERTOS**:

- **RECOGER** datos científicos disponibles sobre un determinado compuesto o mezcla
- evaluarlos respecto a su **CALIDAD** y **VALOR PREDICTIVO**
- finalmente llegar a unas conclusiones sobre los **RIESGOS** que la exposición conlleva para la **SALUD HUMANA** o de los **ECOSISTEMAS**.

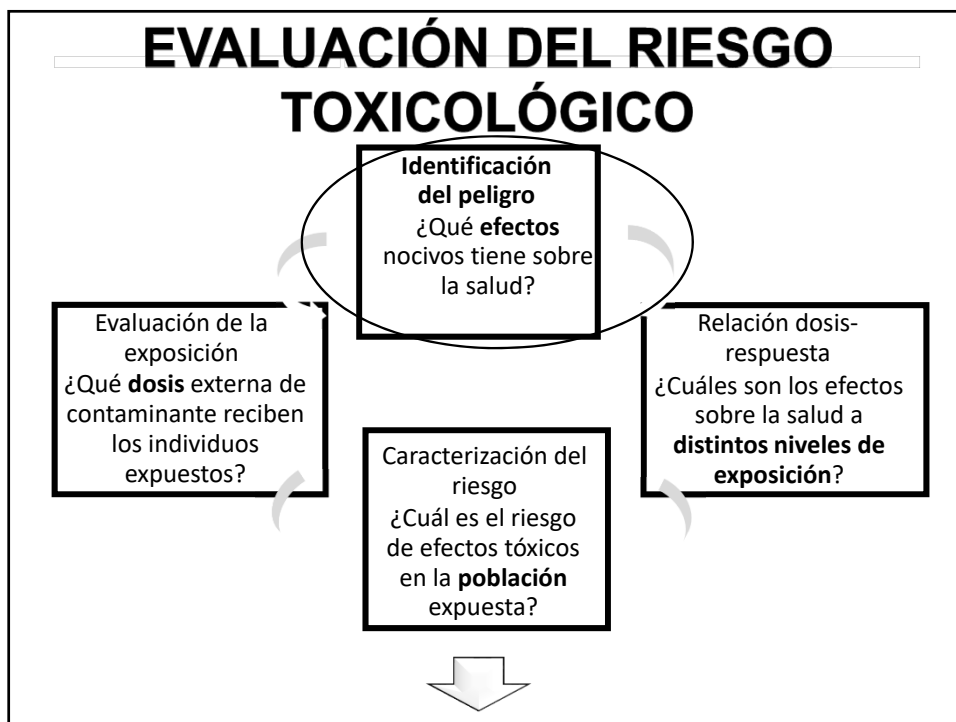
21



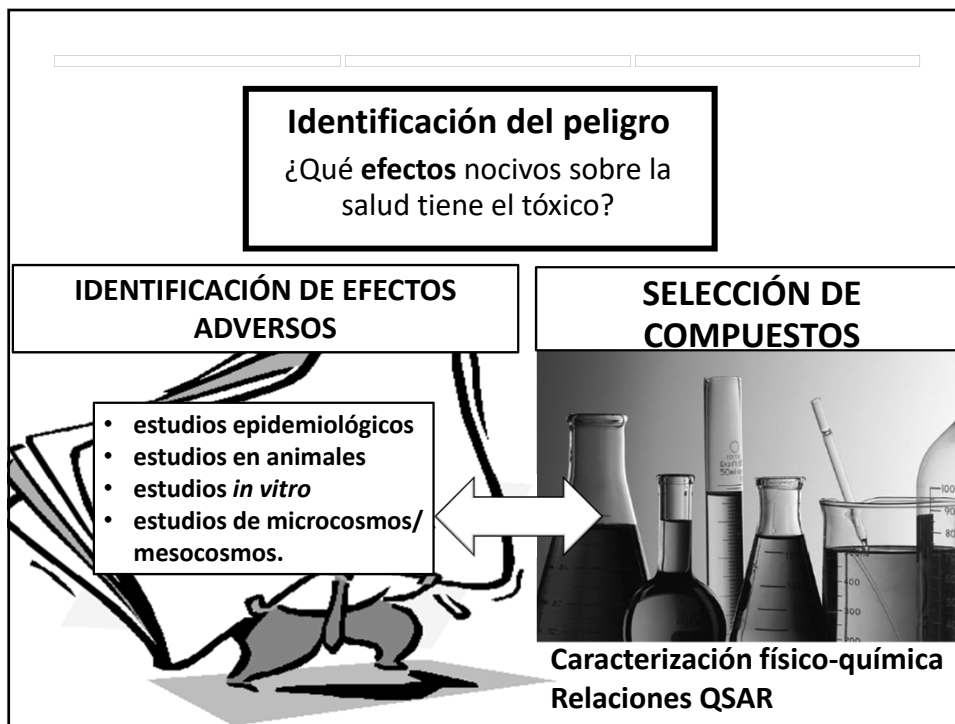
22



23




24



25

ENSAYOS CON ANIMALES



Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la **protección** de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Principio de 3R

- REEMPLAZO: Métodos que no conlleven la utilización de animales vivos.
- REDUCCIÓN: El número de animales se reducirá al mínimo
- REFINAMIENTO: Cría, alojamiento y cuidados, así como los métodos utilizados en procedimientos, se refinarán tanto como sea posible para **eliminar o reducir al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero a los animales**

26

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- Capacidad de una sustancia de producir efectos adversos tras una sola exposición
 - D (C) L
 - DL (C) 50
 - Dosis (concentración) mínima/máxima tóxica

27

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- Clasificación de las sustancias según DL50
 - Muy tóxicos
 - Tóxicos
 - Nocivos
 - Sin clasificar
- Clasificación actual:
 - Intoxicaciones crónicas
 - Rango de toxicidad

28

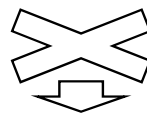
ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- Normalmente muerte en 24 h
- A veces muerte en 10-15 d → observar 1 mes
- Para clasificar por DL50 0 efectos evidentes
- Selección de dosis en base a información previa disponible
 - propiedades físico-químicas,
 - QSAR,
 - otros ensayos de toxicidad...

29

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- Varios grupos experimentales, dosis diferentes, tratados simultáneamente



- Actualmente: Procedimientos secuenciales

- Dosis inicial: toxicidad teórica o prevista
- Dosis siguientes en función de los resultados

- PROCEDIMIENTOS

- *Método de dosis fija*

- *Clase tóxica aguda*


- *Arriba y abajo*

< animales

30

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- **MÉTODO DE DOSIS FIJA**
 - Roedores (rata)
 - Selección de dosis: Estudio preliminar
 - Mortalidad
 - Otros efectos tóxicos
 - No permite determinar DL50, permite clasificar compuestos
 - Dos fases:
 - Estudio preliminar:
 - Varias dosis, 5 hembras, 7 d
 - DL mínima, relación dosis-respuesta
 - Estudio principal: 5 hembras, dosis oral (5, 50, 500 o 2000 mg/kg) tóxica no letal, 14 d
 - Toxicidad sin muertes → no seguir
 - No toxicidad → dosis inmediatamente >
 - Muerte o fuerte reacción tóxica → dosis inmediatamente <



31


ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Dosis	Resultado	Interpretación
5 mg/kg	Supervivencia < 100% Supervivencia =100% pero toxicidad Supervivencia =100% pero sin toxicidad	Muy tóxico Tóxico Ensayar 50 mg/kg
50 mg/kg	Supervivencia < 100% Supervivencia =100% pero toxicidad Supervivencia =100% pero sin toxicidad	Muy tóxico o tóxico Nocivo Ensayar 500 mg/kg
500 mg/kg	Supervivencia < 100% Supervivencia =100% pero toxicidad Supervivencia =100% pero sin toxicidad	Tóxico o nocivo (ensayar 50 mg/kg) Sin toxicidad aguda evidente Ensayar 2000 mg/kg
2000 mg/kg	Supervivencia < 100% Supervivencia =100% pero con o sin toxicidad	Ensayar 500 mg/kg Compuesto sin toxicidad aguda significativa

32

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

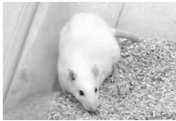
- **PROCEDIMIENTO POR CLASE DE TOXICIDAD AGUDA**
 - No pretende determinar DL50
 - Clasificar sustancias por rango de exposición a la que se espera letalidad
 - 2-4 etapas
 - 3 animales/etapa (mismo sexo) → confirmación en el otro sexo
 - Siguiendo etapa: dosis > o < según resultados
 - Dosis: 5 mg/kg 50 mg/kg 300 mg/kg 2000 mg/kg
 - Secuencia y periodo observación similar a «método de dosis fija»
 - Sin datos previos → dosis inicial = 300 mg/kg



33


ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- **PROCEDIMIENTO ARRIBA-ABAJO**
 - 1 animal/etapa (rata hembra)
 - Se aplica un factor hacia arriba o abajo a la dosis previa según se produzca la muerte o no del animal
 - Dosis inicial: inferior a la DL50 prevista o 175 mg/kg
 - Observación 15d-1 mes




34

TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA

- IRRITACIÓN CUTÁNEA
 - Lesión reversible tras 4 h de exposición
 - CORROSIÓN CUTÁNEA
 - Lesión irreversible (necrosis visible de epidermis y dermis) tras 4h de exposición
 - CLASIFICACIÓN
 - Propiedades físicoquímicas
 - pH
 - Ensayos *in vitro*
- } ⇒ IRRITANTES SEVEROS:
No necesarios ensayos *in vivo*
- } ⇒ NO IRRITANTES INVITRO:
Necesarios ensayos *in vivo*
- 

35

CAPACIDAD IRRITANTE/CORROSIVA DÉRMICA

- MÉTODOS *IN VIVO*:
 - Test de Draize
 - Piel afeitada del dorso
 - 1 animal
 - Ratas, conejos, cobayas
 - En el mismo animal:
 - sustancia a ensayar
 - vehículo sin sustancia
 - Animal inmovilizado
 - Anestésico local
 - Exposición < 4h → lavado de la zona con agua tibia y observar
 - Si existe acción dérmica → no ensayo ocular (clasificación como corrosivo ocular)
- 

36

CAPACIDAD IRRITANTE/CORROSIVA OCULAR

■ MÉTODOS *IN VIVO*:

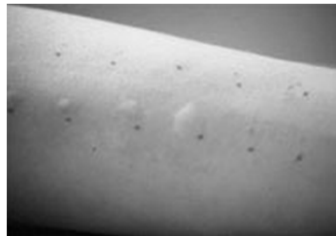
- Test de Draize
 - 1 animal
 - Instilación de 0.1ml en saco conjuntival
 - Anestésico local
 - Observación <21 días
- IRRITACIÓN OCULAR:
 - Lesiones reversibles en los 21 d siguientes a la exposición
- CORROSIÓN OCULAR:
 - Lesiones no totalmente reversibles en los 21d siguientes a la exposición



37




CAPACIDAD SENSIBILIZANTE

- SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA (dermatitis alérgica de contacto):
 - Reacción cutánea de origen inmunológico ante una sustancia.
 - Prurito
 - Eritema
 - Edema
 - Pápulas
 - Vesículas
 - Ampollas



38

CAPACIDAD SENSIBILIZANTE

- **MÉTODOS INVIVO:**
 - Evaluación de maximización en cobaya
 - Aplicación intradérmica
 - 10 tratados+ <5 control
 - Test de parche ocluido de Buehler (cobaya)
 - Aplicación tópica
 - 20 tratados + 10 control
 - Ensayo del nódulo linfático local (LLNA) (raton)
 - > 4 animales/ grupo, 3 niveles de dosis
 - Cuantifica la proliferación linfocitaria en ganglios linfáticos de la zona de aplicación
 - Si hay aumento población linf ≥ 3 veces respecto al control → alergizante

39

TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN REPETIDA O
PROLONGADA

- Anteriormente «toxicidad subcrónica o subaguda»
- Ensayos con administraciones diarias, < 10% de la vida media del animal
- Conocer efectos a largo plazo y NOAEL
- Identificar órganos diana
- Reversibilidad de efectos, acumulativos o retardados

40

TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN REPETIDA O PROLONGADA

- En dos especies y ambos sexos
- Administración diaria, 4 lotes/sexo (1 lote control, 3 dosis diferentes)
- Mínimo 10 animales (5 hembras+5machos)/lote
- Dosis (3 niveles):
 - Alta: con efectos tóxicos
 - Baja: sin efectos adversos, dosis terapéutica en medicamentos
 - Dosis intermedia

41

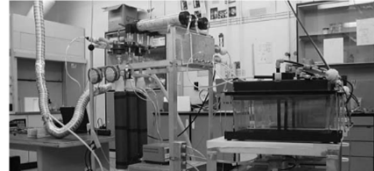
TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN REPETIDA O PROLONGADA

- Duración en función del compuesto y especie
 - Ensayos por dosis repetidas durante 14 y 28 d:
 - Via oral, dérmica e inhalatoria
 - Ensayos por dosis repetidas durante 90 d:
 - Via oral, dérmica e inhalatoria
 - Toxicidad Crónica medio plazo: 90 d
 - Toxicidad Crónica largo plazo: 1-2 años (> 6 meses)
- Observación de parámetros físicos, bioquímica
- Fin experimento: sacrificio, necropsia, estudio macro y microscópico

42

ESTUDIOS VÍA INHALATORIA

- Evaluación de gases, volátiles, aerosoles, partículas
- Equipos especiales:
 - Concentración fija
 - 12-15 ventilaciones/hora
 - 19% oxígeno
 - Atmósfera de exposición uniforme
 - Exposición < 4 h en estudios de toxicidad aguda
 - Observación > 14 d
 - Examen clínico minucioso 2 veces/día
 - Conocer periodo de recuperación



43

MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

- Intercambio de información
- Mejoras en los experimentos
- Modelos matemáticos: estructura Q^a-actividad (QSAR)
- Simulaciones
- Estudios epidemiológicos
- Embriones de vertebrados
- Toxicovigilancia
- **Técnicas *in vitro***
 - Bacterias, hongos, algas, fracciones subcelulares, porciones de tejidos, órganos perfundidos...

44

VENTAJAS DE ENSAYOS *IN VITRO*

- Morales y éticas
- Económicas (animales, tiempo, instalaciones)
- Científicas
 - Homogeneidad
 - Material humano
 - Estudio de población celular/moléc diana
 - Reproducibilidad
 - Mayor control de condiciones experimentales
 - Optimización de estudios (toxicocinéticos, mec de acción, etc)

45

INCONVENIENTES DE ENSAYOS *IN VITRO*

- Necesidad de usar distintos ensayos
- Interacciones entre órganos
- Limitada duración (toxicidad retardada)
- Incapacidad de metabolizar
- Problemas de disolución en medio de cultivo
- Extrapolación

46

APLICACIONES

- Evaluación de la toxicidad (fármacos, plaguicidas, cosméticos, radiaciones...)
- Fertilización *in vitro*
- Diagnóstico y tratamiento de enfermedades
- Organismos transgénicos
- Obtención de moléculas terapéuticas

47

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS EXPERIMENTALES



Plan de exposición

- Concentraciones
- Frecuencia
- Vía de administración

INDICADORES DE TOXICIDAD
(parámetros a observar)

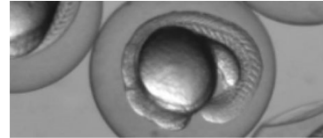
- Estudio estadístico de los resultados
- Modelos predictivos



48

SUSTRATOS BIOLÓGICOS

- Invertebrados
- Microorganismos
- Plantas
- Algas
- *In vitro*
 - Cultivo de embriones (pre/postimplantados):
 - Roedores, aves
 - Alt del desarrollo, diferenciación
 - Capacidad metabolizar
 - Dificultad para evaluar alt celular/molecular



49

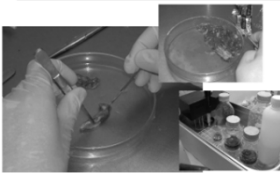
SUSTRATOS BIOLÓGICOS

- Cultivo y baño de órganos (íntegros o láminas)
 - Hígado, cerebro, hipófisis...
 - Hipoxia en el centro del órgano
 - Dificil visualizar comunicaciones intercelulares
- Órganos perfundidos (sistemas de perfusión continua)
 - Hígado, riñón, páncreas..
 - Estudios toxicocinéticos

50

SISTRATOS BIOLÓGICOS

- **Explantos (cultivos organotípicos)**
 - A partir de porciones de tejido de animales de **cualquier edad**
 - Crecimiento celular manteniendo la estructura del órgano
 - Difícil visualizar céls individuales
 - Complejidad de preparación
 - Baja reproducibilidad bioquímica
- **Cultivo de reagregados celulares**
 - Céls de **tejidos fetales**, agitación cte
 - agregados con estructura 3D del órg



+ > reprod bioquímica

- Edad embriones, estructuración variable, > n° animales

51

SISTRATOS BIOLÓGICOS

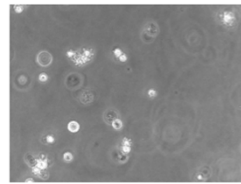
- Líneas celulares establecidas/clones celulares
 - Céls de origen humano o animal adaptadas a cultivo
 - «Transformación» (espontáneo o inducido por radiaciones, virus, compuestos químicos) → línea celular establecida (multiplicación ∞)
 - Proporcionar grandes cantidades de células del mismo tipo
 - Fácil mantenimiento
 - Resultados reproducibles
 - Fácil visualización de las células
 - Clon celular: línea celular que procede de una sola célula (características homogéneas)

52

SUSTRATOS BIOLÓGICOS

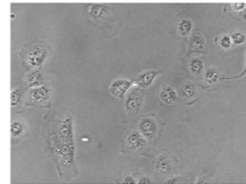
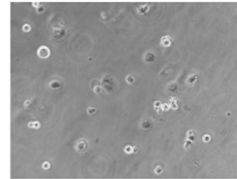
- Líneas celulares establecidas/clones celulares

- Evaluación microscópica



descongelación

3 horas



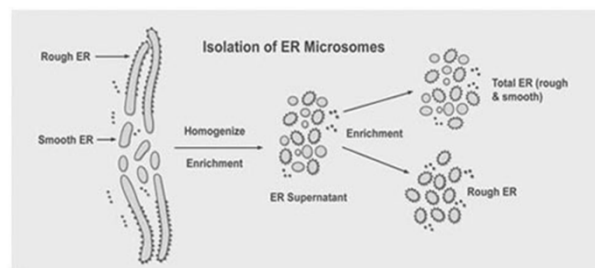
54 horas

53

SUSTRATOS BIOLÓGICOS

- Modelos libres de células:

- Obtenidos por centrifugación
- Evitar interacciones tisulares, celulares, etc: específico
- microsomas, núcleos, mb,



54

BIOMARCADORES DE TOXICIDAD *IN VITRO*

Nivel de alt	Biomarcadores
Morfología celular y tisular	MO, ME: Forma, tamaño, diferenciación
Viabilidad	Colorante (MTT), citometría
Proliferación celular	Proteínas, ADN, ciclo cel, citometría
Actividad metabólica	Sust reguladoras, enzimas, proteínas
Estructura celular	Permeabilidad iónica, sistemas de transporte
Sistemas de defensa	GSH, metalotioneínas
Específicos	SI, SN, Reprod

55

CAPACIDAD IRRITANTE/CORROSIVA DÉRMICA Y OCULAR

- PROHIBICIÓN DE ENSAYOS EN ANIMALES PARA EVALUACIÓN DE COSMÉTICOS
- Prohibición de ensayar en animales productos cosméticos e ingredientes de cosméticos desde 11 de Marzo de 2009
- Prohibición de vender en UE cosméticos (ingredientes, productos) testados en animales desde **11 de Marzo de 2013**.

http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/animal-testing/index_en.htm



**MÉTODOS
ALTERNATIVOS**

56

CAPACIDAD IRRITANTE DÉRMICA

■ CON CULTIVOS CELULARES

■ Queratinocitos:

- Exposición 24 o 48 h
- Determinación de captación de colorante rojo neutro

■ Ensayo del activador del plasminógeno

- Secretado por céls epiteliales
- Determinado por colorimetría

■ Ensayo de MTT

- Viabilidad celular
- Reducción de sal de tetrazolio (amarillo) $\xrightarrow{\text{Succinato deshidrogenasa de mitocondrias}}$ formazano (morado)

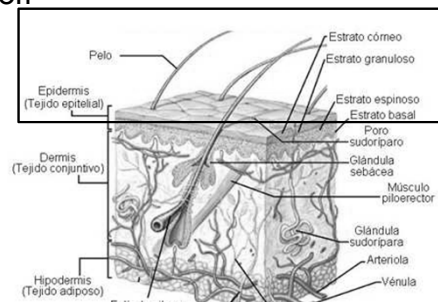
57

CAPACIDAD IRRITANTE DÉRMICA

■ CON CULTIVOS CELULARES

■ Cultivos celulares tridimensionales

- Queratinocitos en estratos
- Respuesta más completa
- Crecimiento celular sobre nylon
- ZKI 100, SKIN™



58

CAPACIDAD IRRITANTE DÉRMICA

- SIN CULTIVOS CELULARES
 - SKINTEX
 - Alteración de la conformación e hidratación de una matriz de proteínas
 - MICROTOX
 - Reducción de luz emitida por *Vibrio fischeri*



59

CAPACIDAD CORROSIVA DÉRMICA

- CON CULTIVOS CELULARES
 - Ensayo metabólico con piel humana reconstituida (EPISKIN, Epiderm, SkinEthic™)
 - Permiten distinguir entre corrosivos- corrosivos severos
 - Evalúan viabilidad celular del estrato córneo por disminución de metabolismo del colorante MTT



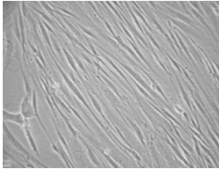
60

CAPACIDAD IRRITANTE OCULAR

- Fenómeno complejo: Dificultades para encontrar modelo apropiado
 - Irritación de conjuntiva
 - Irritación de córnea
 - Irritación de iris

63

CAPACIDAD IRRITANTE OCULAR

- CON CULTIVOS CELULARES
 - CULTIVOS PRIMARIOS
 - Córnea de conejo
 - Queratinocitos humanos
 - Fibroblastos humanos
 - LÍNEAS CELULARES
 - 3T3 fibroblastos
 - V79 fibroblastos
 - SIRC células córneas de conejo
 - He-La
- CITOTOXICIDAD
- 

64

	Tipo	Marcador
<p>CAPACIDAD</p> <p>■ CITOTOXICIDAD</p>	Viabilidad celular	Captación de colorante Exclusión de colorante
	Morfología celular	Forma y tamaño de la célula Contacto célula-célula Tamaño del núcleo Vacuolización del citoplasma
	Proliferación celular	Aumento en el número de células Aumento del DNA total Aumento del RNA total Aumento de la proteína total
	Lesión de la membrana	Pérdida de enzimas (ej: LDH) Pérdida de iones o cofactores (Ej.: Ca^{++} , K^+ , NADPH)
	Captación o incorporación de precursores radiactivos	Síntesis de uridina y RNA Síntesis de timidina y DNA Síntesis de aminoácidos y proteínas


65

■ **SIN CULTIVOS CELULARES**

CAPACIDAD IRRITANTE OCULAR

- **Córnea bovina aislada (BCOP)**
 - Córneas de animales de matadero
 - Evaluación de la opacidad
- **EYTEX**
 - Kit comercial, matriz de proteínas similar a la córnea
 - Evaluación de opacidad
- **HETCAM (membrana corioalantoidea de pollo)**
 - Vasoconstricción
 - Hemorragia
 - Coagulación de proteínas

} CÁLCULOS MATEMÁTICOS



66

CAPACIDAD SENSIBILIZANTE

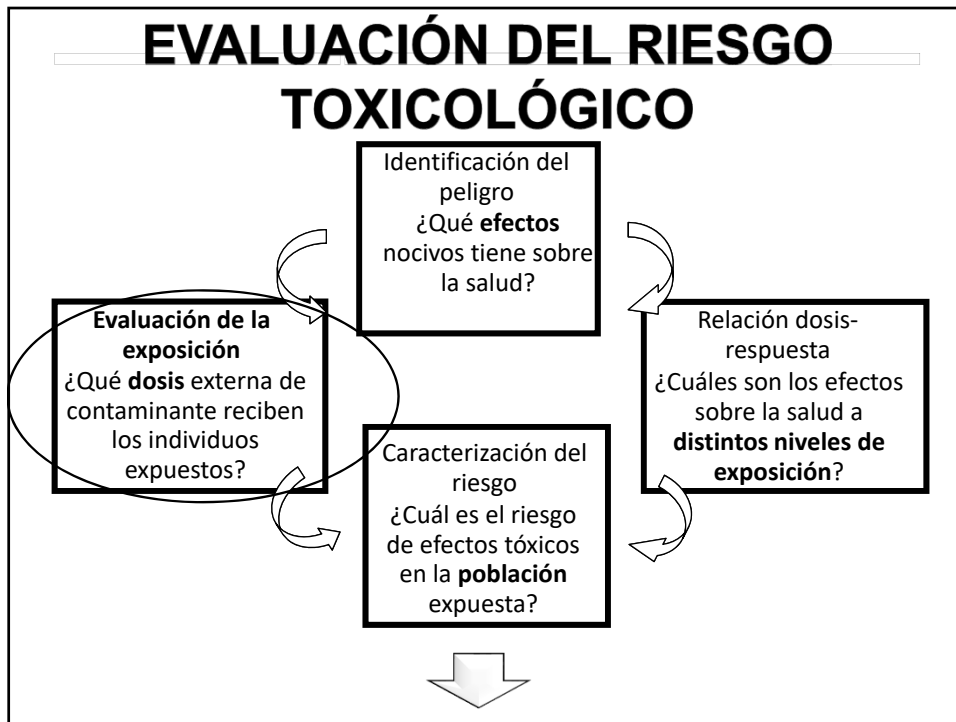
- Cultivo de células dendríticas humanas
 - A partir de mononucleares periféricos
 - Evaluación de liberación de IL-1 β o la producción de sus ARNm
- Modelos de piel humana reconstituida
- Ensayo en la oreja del ratón (MEST)
- Liberación de Ig E en cultivos expuestos
- Cultivos de células de Langerhans
- Cultivos de queratinocitos
- Cocultivos de células T y células dendríticas

67

FOTOSENSIBILIZACIÓN

- Ensayo de fotosensibilización in vitro 3T3
 - Incubación de céls Balb/c 3T3
 - 1 h, 8 concentraciones
 - Irradiación \rightarrow 24h: Citotoxicidad (disminución de la absorción del colorante vital rojo neutro)

68



69

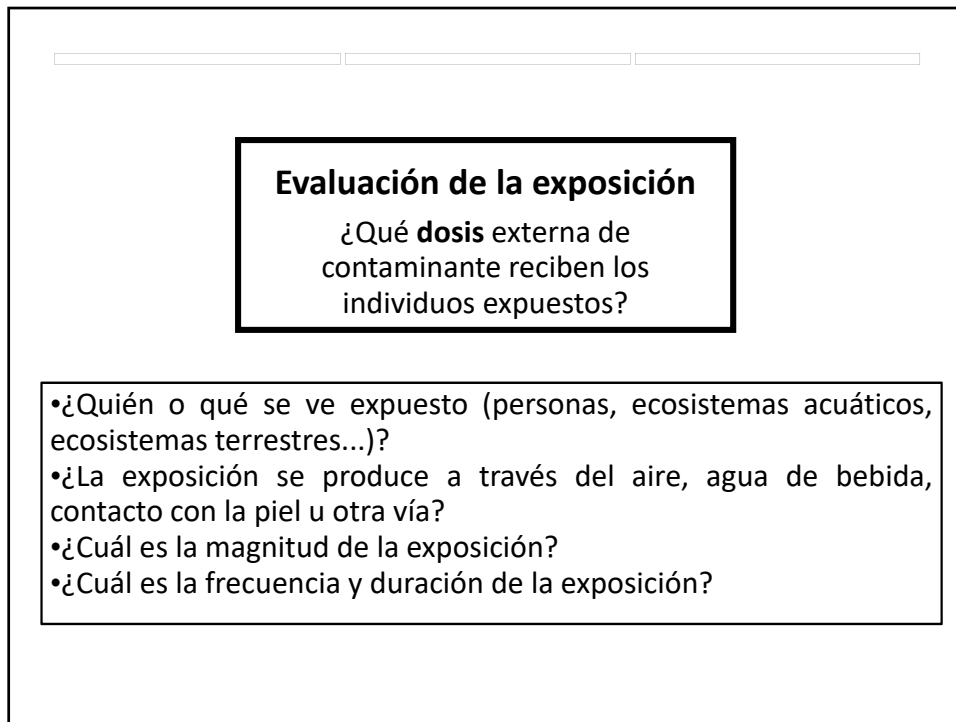
Evaluación de la exposición

¿Qué **dosis** externa de contaminante reciben los individuos expuestos?

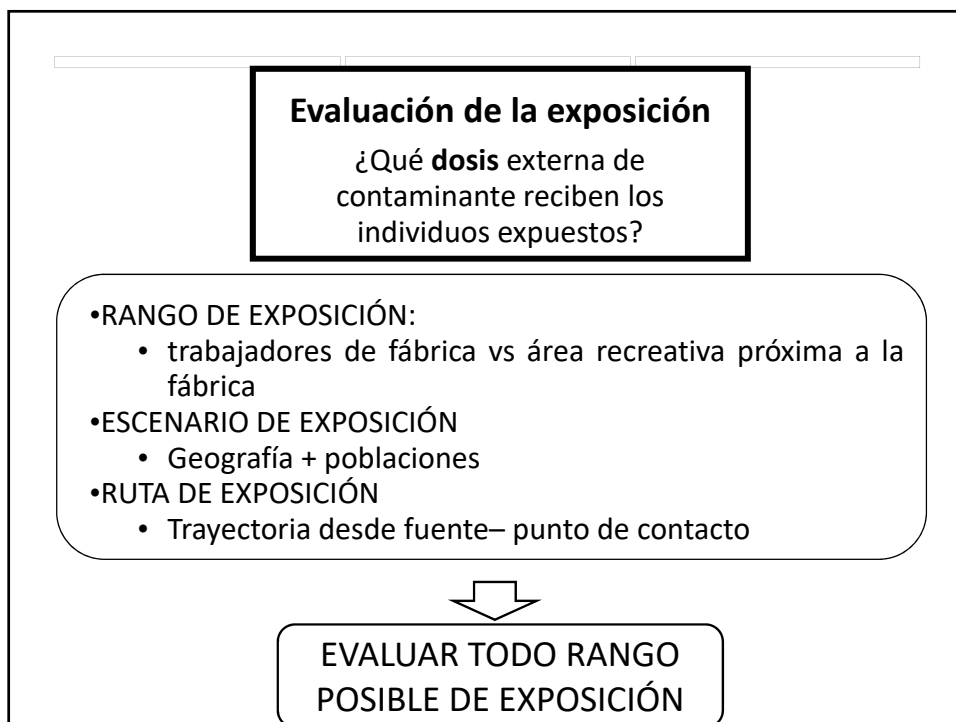


- **Magnitud (emisiones)**
- **Frecuencia y duración**
- **Rutas de exposición**

70



71




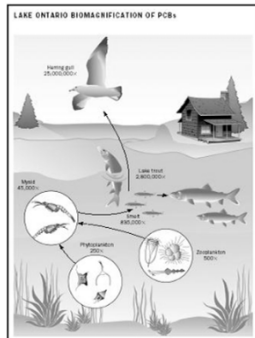
72

Evaluación de la exposición

RUTA DE EXPOSICIÓN

- **Fuente**
 - muestreo, información del área, mecanismos de liberación
- **Transporte y destino**
 - Acumulación
 - Transporte
 - Transformación
- **Punto de exposición** (concentración, poblaciones sensibles...)
- **Vías de exposición**





Conocer la cantidad de tóxico que contacta durante el periodo de exposición

Prever exposiciones futuras

73


RUTAS DE EXPOSICIÓN

Receptor	Vía de exposición
Animales terrestres	Ingestión, inhalación y absorción dérmica
Vegetales terrestres	Absorción por raíz o por las hojas
Animales acuáticos	Contacto directo con branquias, ingestión
Plantas acuáticas	Contacto directo

74

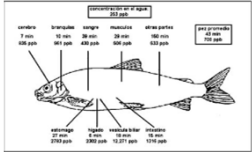
BIOCONCENTRACIÓN

Aumento de concentración en un organismo respecto al medio (acuático)



BIOACUMULACIÓN

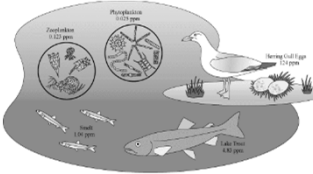
Absorción y retención de los tóxicos por organismos con el alimento o el agua



CONTENIDO DE PESTICIDA				
Componente	Concentración	Alimento	Residuos	Alimento ingerido
Carbencicloro	10 ppm	20 ppm	20 ppm	100 ppm
Endosulfato	100 ppm	400 ppm	400 ppm	1000 ppm
Malatión	10 ppm	20 ppm	20 ppm	100 ppm
Paratión	10 ppm	20 ppm	20 ppm	100 ppm

BIOMAGNIFICACIÓN

Aumento de las concentraciones de un compuesto con la cadena trófica



75

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN


DIRECTA

INDIRECTA:
Predicciones mediante
modelos


- MAGNITUD
- FRECUENCIA
- DURACIÓN

}

TODOS LOS ESCENARIOS



OBSERVACIÓN
PUNTUAL



MONITORIZACIÓN

76

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

MONITORIZACIÓN

Recolección repetida de datos durante un periodo de tiempo con el fin de determinar tendencias en los parámetros medioambientales, comparando esos datos con algún estándar o valores considerados normales.

OBJETIVOS:

- Determinar nivel de contaminación en un área
- Determinar su evolución en el tiempo
- Identificar los focos de emisión



77

AGUA, SUELO, AIRE

Mediciones físicas {
-Tª
-Precipitaciones
-Disponibilidad de agua
-Luz

Mediciones químicas {
**Salinidad, nutrientes,
CONTAMINANTES**

REFERENCIAS: Hielo glaciar, sedimentos, turba...



78

CONSIDERACIONES MUESTREO NO BIOLÓGICO

- Polvos, nieblas, gases y vapores:
 - filtros de soportes sólidos (ésteres de celulosa, membranas de plata, resinas, etc.)
- Gases y vapores:
 - frascos lavadores cargados con líquidos absorbentes.
- Vapores orgánicos
 - tubos de carbón activo.
- Aguas:
 - a tres niveles de profundidad y en distintos lugares).




79

BIODISPONIBILIDAD



80



Especies monitoras: aquellas cuyas alteraciones en sus funciones o rendimiento indican el impacto causado por los tóxicos

Especies indicadoras: aquellas cuya ausencia o presencia indican la magnitud de la contaminación;

Especies centinelas: como aquellas capaces de acumular contaminantes en sus tejidos sin sufrir sus efectos adversos.

Beeby, 2001

81

ESPECIE CENTINELA (NRC)


- Ofrecer respuesta a los agentes o grupo de agentes que pudiera ser objeto de medida
- Habitar en un territorio o rango de influencia que abarque el área de monitorización
- Ser fácilmente censada y capturada
- Existir un tamaño de población suficiente y una densidad adecuada

82

BIOMONITORIZACIÓN DIRECTA

Medición de los niveles de contaminantes en muestras de seres vivos

- **Bivalvos:** acumulación de plaguicidas, metales y PCB's en medio acuático.
- **Aves rapaces:** disminución del éxito reproductivo por insecticidas organoclorados.
- **Aves acuáticas:** intoxicaciones por plomo.
- **Mamíferos marinos:** exposiciones a metales pesados, plaguicidas y PCB's.
- **Peces** metales como el mercurio
- **Hongos y micorrizas:** contaminación suelos por metales pesados y elementos radiactivos
- **Líquenes:** contaminación atmosférica



83

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

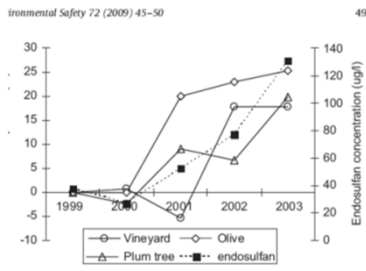
journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Changes in blood pesticide levels in booted eagle (*Hieraaetus pennatus*) associated with agricultural land practices [☆]

Emma Martínez-López ^a, Diego Romero ^a, Pedro María-Mojica ^a, Jose E. Martínez ^b, Jose F. Calvo ^b, Antonio J. García-Fernández ^{a,*}

^a Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain
^b Department of Ecology and Hydrology, Faculty of Biological Sciences, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Environmental Safety 72 (2009) 45–50 49



Year	Vineyard (µg/l)	Olive (µg/l)	Plum tree (µg/l)	endosulfan (µg/l)
1999	~1	~1	~1	~1
2000	~2	~2	~2	~2
2001	~5	~5	~5	~5
2002	~10	~10	~10	~10
2003	~15	~15	~15	~15

[☆] 3. Mean yearly endosulfan concentrations (the sum of isomers α , β and fosulfan sulphate) in the blood of booted eagle nestlings matched with the rease in surface area of a range of crops in the Region of Murcia.

84

BIOMONITORIZACIÓN

DIRECTA

SISTEMÁTICAS ANALÍTICAS QUÍMICO-TOXICOLÓGICAS

- Sistemática para gases y vapores (hidrocarburos, gases tóxicos...)
- Sistemática para tóxicos inorgánicos (metales pesados)
- Sistemática para tóxicos orgánicos (insecticidas)



85

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS



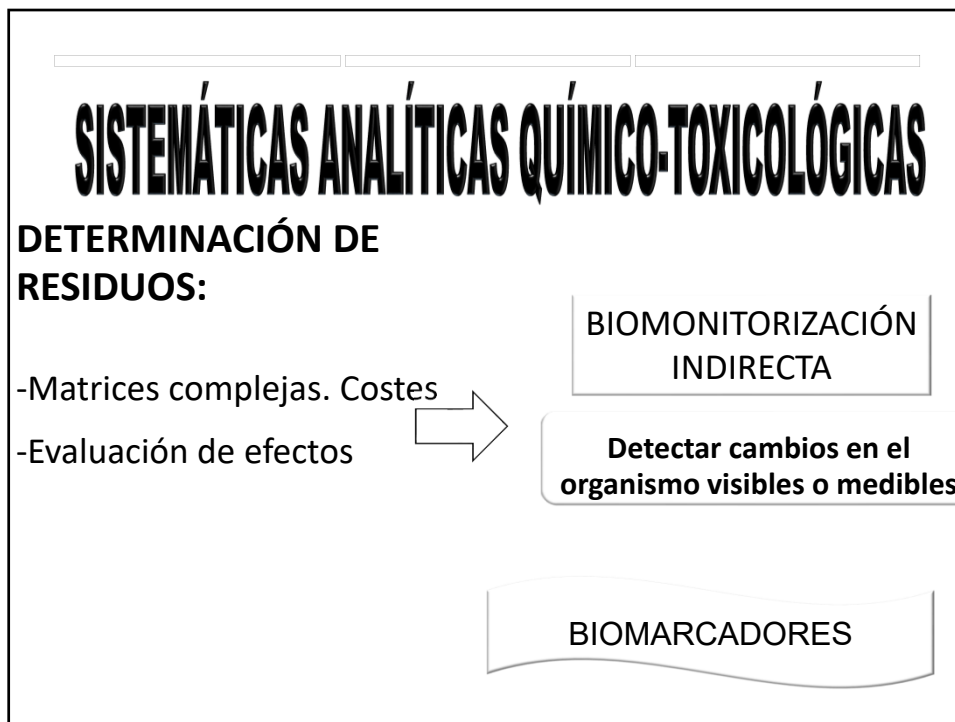
Muestras hemáticas → Sangre entera
→ Plasma/Suero

Orina

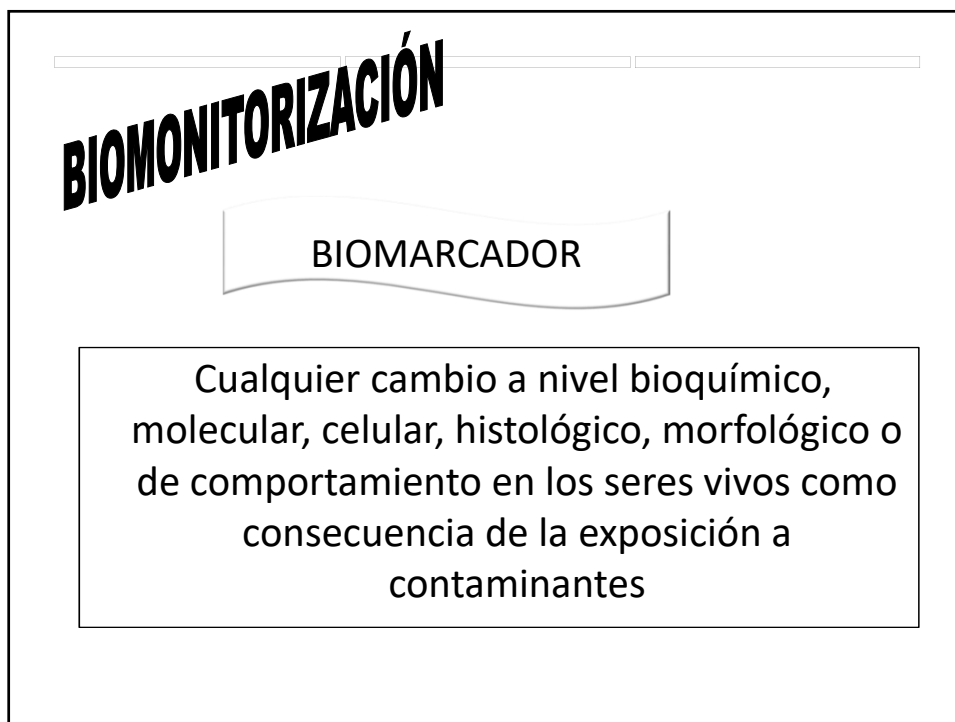
Aire espirado

Tejidos animales
Hígado > Riñón > Encéfalo
Plumas, pelo, huevos

86



87



88

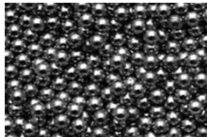
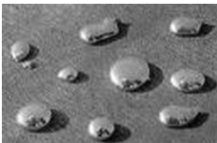

BIOMARCADORES

Ácido δ -aminolevulínico dehidratasa
(δ -ALAD)

GSH, SOD, malondialdehído

Metalotioneínas

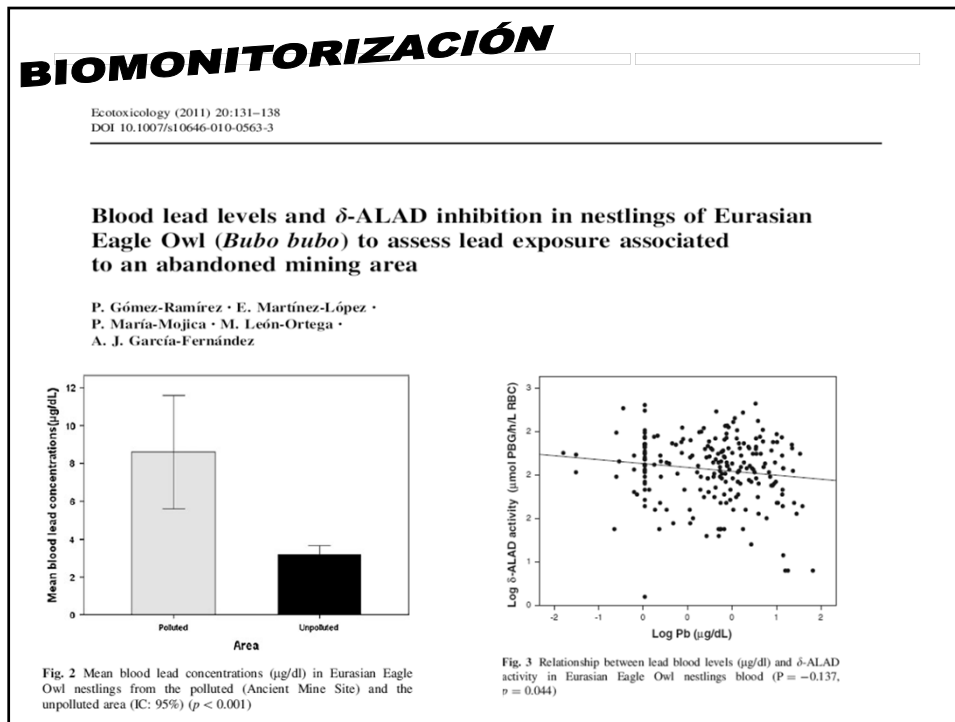
Acetilcolinesterasa

89

BIOMARCADOR	CONTAMINANTE	ÓRGANO
Inhibición de la Acetilcolinesterasa	OP, CB	Cerebro, sangre
Inhibición de δ -ALAD	Plomo	Sangre
Inducción metalotioneínas	Metales pesados	Hígado
Disminución de retinol y tiroxina	OCs y PCBs	Sangre
Inducción de MFO (P-450)	PAHs, PCBs, dioxina	Hígado
Cianohemoglobina	Cianuros	Sangre
Inducción de metahemoglobina	Nitritos	Sangre
Lesión epitelio branquial	Detergentes	Branquias
Inmunotoxicidad	Metales pesados, PAHs	Sangre
Aductos ADN	PAHs, PCBs, aminas aromáticas	Sangre
Inducción de vitelogenina en ovíparos	DES	Hígado
Inducción micronúcleos (Alteración en ADN)	PCBs, PAHs, PHAHs, OC	Sangre
Metabolitos de xenobióticos	DDTs, PAHs y PCBs	Bilis
Porfirinas	MP, PCBs, dioxinas	Sangre y piel
Parámetros de estrés	Xenobióticos	Sangre
Indices biométricos (Factor condición, Índice hepatosomático)	Xenobióticos	Peso corporal, longitud, órganos

90



91

Evaluación de la exposición

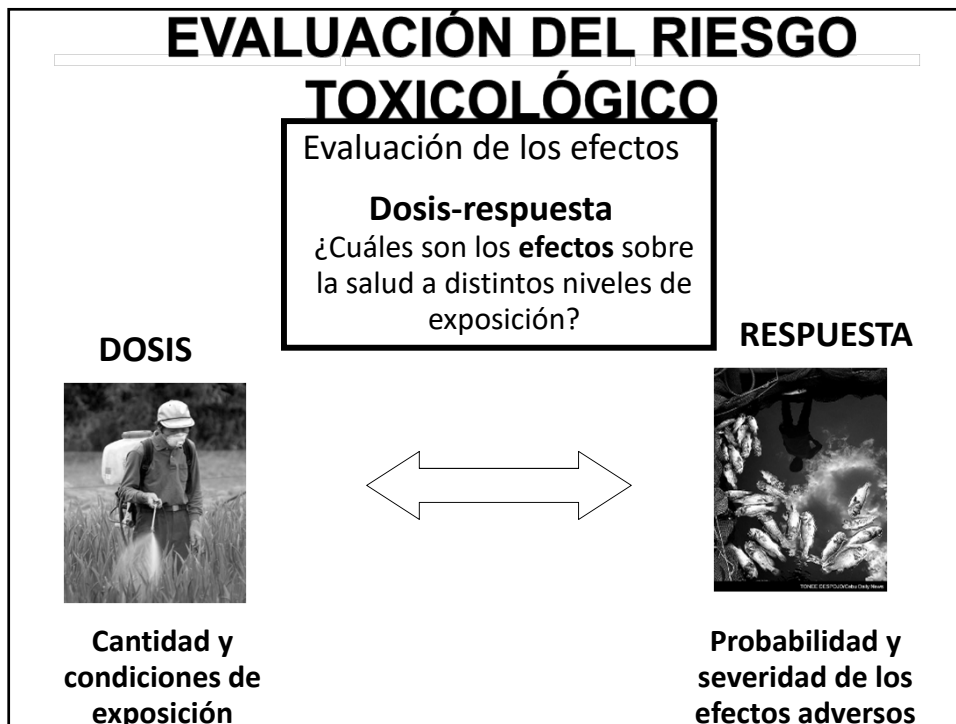
¿Qué dosis externa de contaminante reciben los individuos expuestos?

- Datos de exposición
- Cantidad de sustancia producida o importada.
- Forma en la que se produce, importa o utiliza la sustancia
- Categorías de uso y grado de confinamiento.
- Datos sobre la producción.
- Propiedades fisicoquímicas de la sustancia
- Productos de degradación y/o los productos de transformación.
- RUTA (Vías probables de exposición, potencial de absorción, y los de absorción/desorción y degradación en compartimentos medioambientales)
- Frecuencia y duración de la exposición.
- Tipo y tamaño de las poblaciones específicas expuestas.

92



93



94

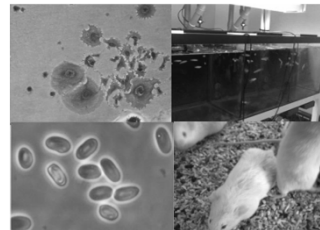
EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS

ESTUDIOS NO EXPERIMENTALES

- Epidemiológicos
- Informes de casos (humanos/ambientales)
 - Informes médicos

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

- *In vivo*
- *In vitro*
- Microcosmos
- Mesocosmos



95

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS

ESTUDIOS NO EXPERIMENTALES

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS:

- De cohorte: grupo expuesto (cohorte)-grupo control
- Caso-control: Sanos-enfermos
- Longitudinales: prevalencia de la enfermedad entre uno o más grupos expuestos
- Ecológicos: incidencia en diferentes áreas geográficas

- Retrospectivos
- Prospectivos

96

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS

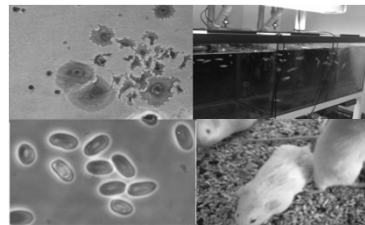
ESTUDIOS EXPERIMENTALES

IN VIVO

- Toxicidad aguda
- Capacidad corrosiva (dérmica y ocular)
- Capacidad irritante (dérmica y ocular)
- Capacidad sensibilizante
- Toxicidad por administración continuada (28 días)

IN VITRO

- Mutagénesis



97

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- Capacidad de una sustancia de producir efectos adversos tras una sola exposición
 - D (C) L
 - DL (C) 50
 - Dosis (concentración) mínima/máxima tóxica
 - Clasificación de las sustancias según DL50
 - Muy tóxicos
 - Tóxicos
 - Nocivos
 - Sin clasificar
 - Clasificación actual:
 - Intoxicaciones crónicas
 - Rango de toxicidad

98

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

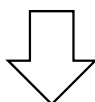
- Normalmente muerte en 24 h
- A veces muerte en 10-15 d → observar 1 mes
- Para clasificar por DL50 0 efectos evidentes
- Selección de dosis en base a información previa disponible
 - propiedades fisico-químicas,
 - QSAR,
 - otros ensayos de toxicidad...

99

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

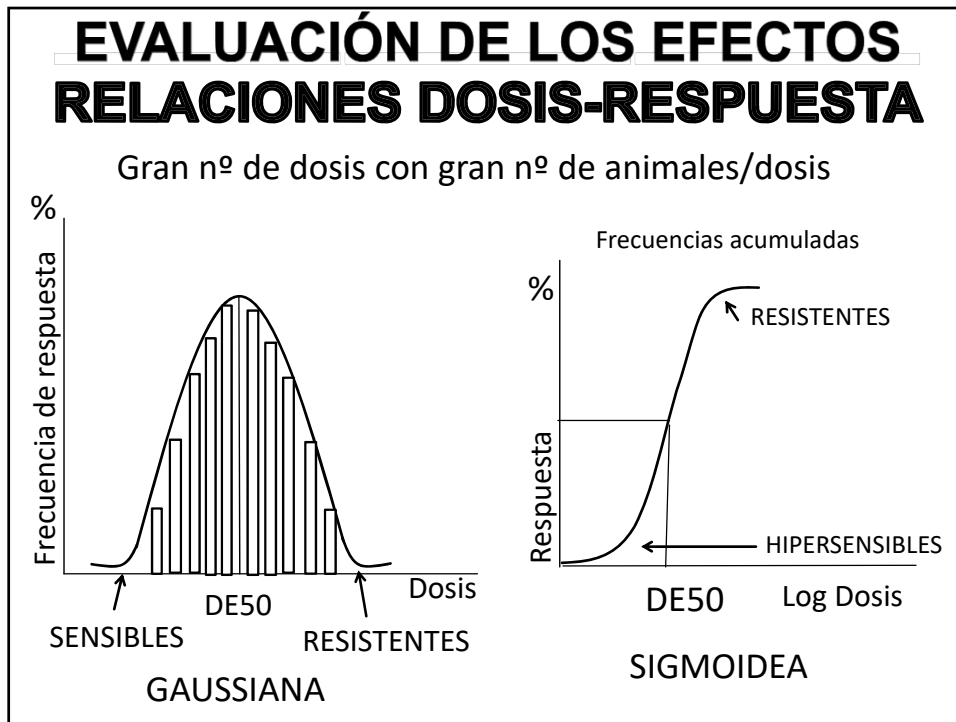
- Tradicionalmente: Varios grupos experimentales, dosis diferentes, tratados simultáneamente

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA



- Actualmente: Procedimientos secuenciales
 - Dosis inicial: toxicidad teórica o prevista
 - Dosis siguientes en función de los resultados
 - PROCEDIMIENTOS
 - *Método de dosis fija*
 - *Clase tóxica aguda*
 - *Arriba y abajo*
- < nº animales

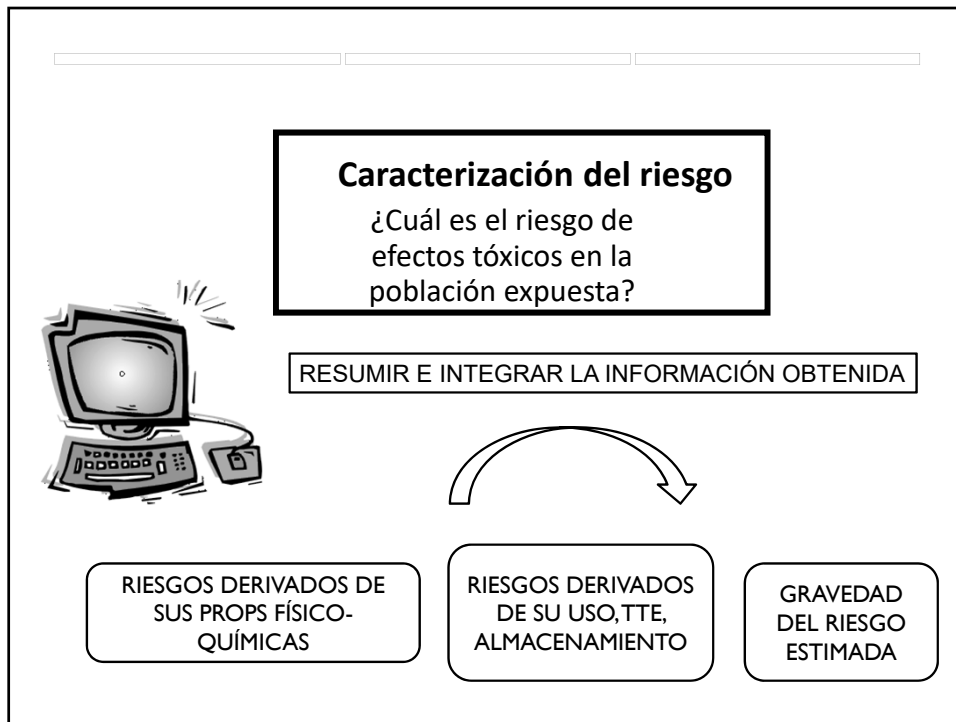
100



101



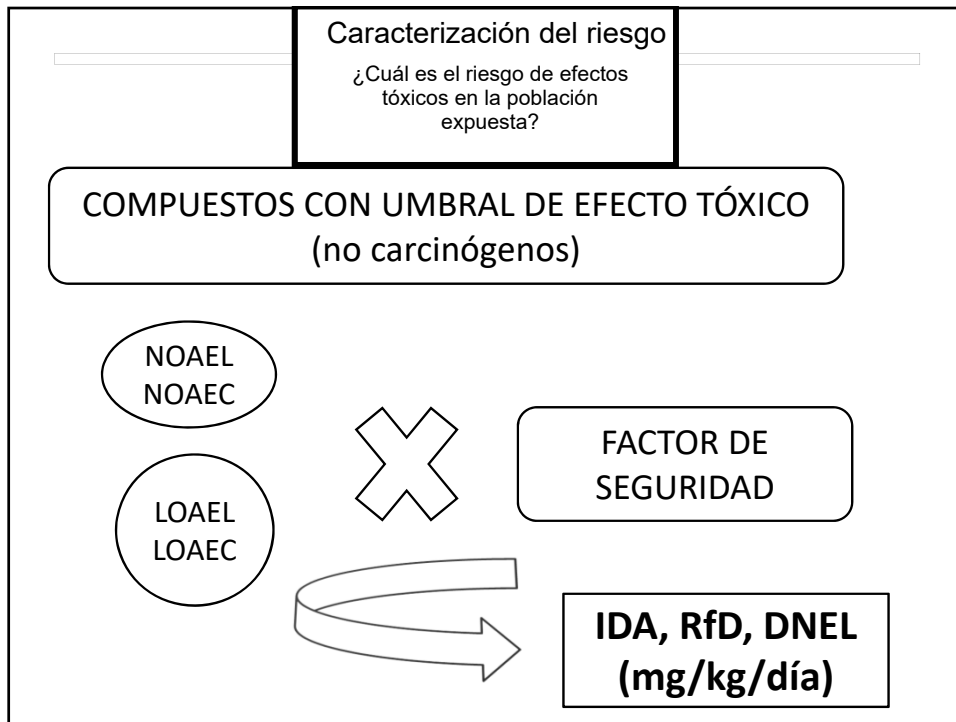
102



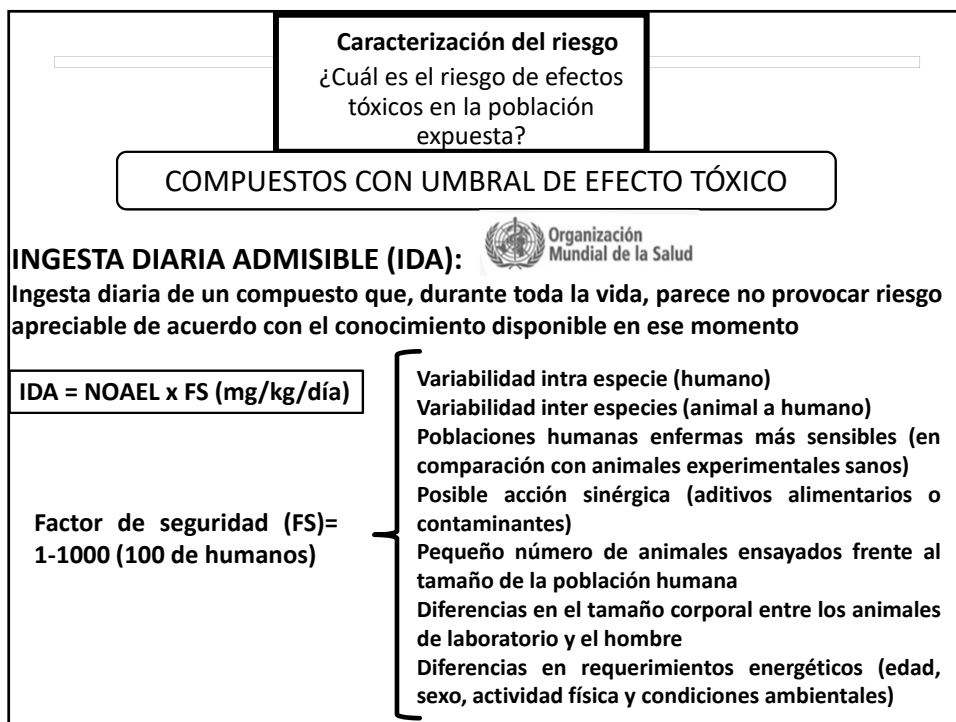
103



104



105



106

Caracterización del riesgo
 ¿Cuál es el riesgo de efectos tóxicos en la población expuesta?

COMPUESTOS CON UMBRAL DE EFECTO TÓXICO

DOSIS DE REFERENCIA (RfD) United States Environmental Protection Agency

Una estimación de la exposición diaria via oral durante toda la vida, que no supone un riesgo apreciable de efectos adversos

$$RfD = N(L)OAEL / (UF \times MF) \text{ (mg/kg/día)}$$

Factor de modificación (MF)= >0-10
(por defecto MF=1)

Factor de incertidumbre (UF)=
10H x 10 A x...x10n

10H = extrapolación a una exposición prolongada en humanos sanos
 10 A = extrapolación de estudios en animales
 10S = extrapolación de estudios a corto plazo a exposición crónica

107

Caracterización del riesgo
 ¿Cuál es el riesgo de efectos tóxicos en la población expuesta?

COMPUESTOS CON UMBRAL DE EFECTO TÓXICO

NIVEL DERIVADO SIN EFECTO (DNEL) = (mg/kg/día) EUROPEAN CHEMICALS AGENCY

nivel máximo de exposición de las personas a una sustancia, por encima del cual no se debe producir exposición a las mismas

$$DNEL = N(L)OAEL / (FE1 \times FE2 \dots \times FE_n) \text{ (mg/kg/día)}$$

Extrapolación según REACH: DNEL / FE		Factor de Evaluación
Interespecies	-Corrección por diferencias en metabolismo por peso corporal	4 (rata)*
	-Otras Diferencias	2.5
Intraespecies	-Trabajador	5
	-Población general	10
Duración exposición	-Subagudo a subcrónico	3
	-Subcrónico a crónico	2
	-Subagudo a crónico	6
Ruta de exposición	-diferente ruta de exposición ensayada y la humana	1*
Dosis-respuesta	-Severidad del efecto	1**
	-Punto de partida	
	-Pendiente de la curva	

*consideradas en paso 2 **posibles desviaciones si se trata de LOAEL

COCIENTE DE CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO (RCR)

$$RCR = \text{Exposición} / DNEL$$

108

EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO

**COMPUESTOS CON
UMBRAL DE EFECTO
TÓXICO (no carcinógenos)**

Caracterización del riesgo

¿Cuál es el riesgo de efectos tóxicos en la población expuesta?

IDA = NOAEL x FS (mg/kg/día)
RfD = N (L) OAEL / (UF x MF) (mg/kg/día)


DNEL=N(L)OAEL/(FE1xFE2...xFE_n) (mg/kg/día)

RCR = Exposición / DNEL
Si expos < DNEL → riesgo controlado
Si expos > DNEL → riesgo no controlado


PARA CADA VÍA

Trabajadores
Consumidores
Población general
Exposición ambiental


109




European Food Safety Authority



GOBIERNO DE ESPAÑA




MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD



aecosan
agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición

- IDA= ingesta diaria admisible
- LMR = Límite máximo de residuos
- Ingesta diaria máxima teórica (IDMT)
 - IDMT = $\sum (LMR \times \text{ingesta en la dieta})$
- Ingesta diaria máxima estimada (IDME)
 - IDME: tiene en cuenta factores de corrección
 - Si IDMT < IDA → no existe riesgo

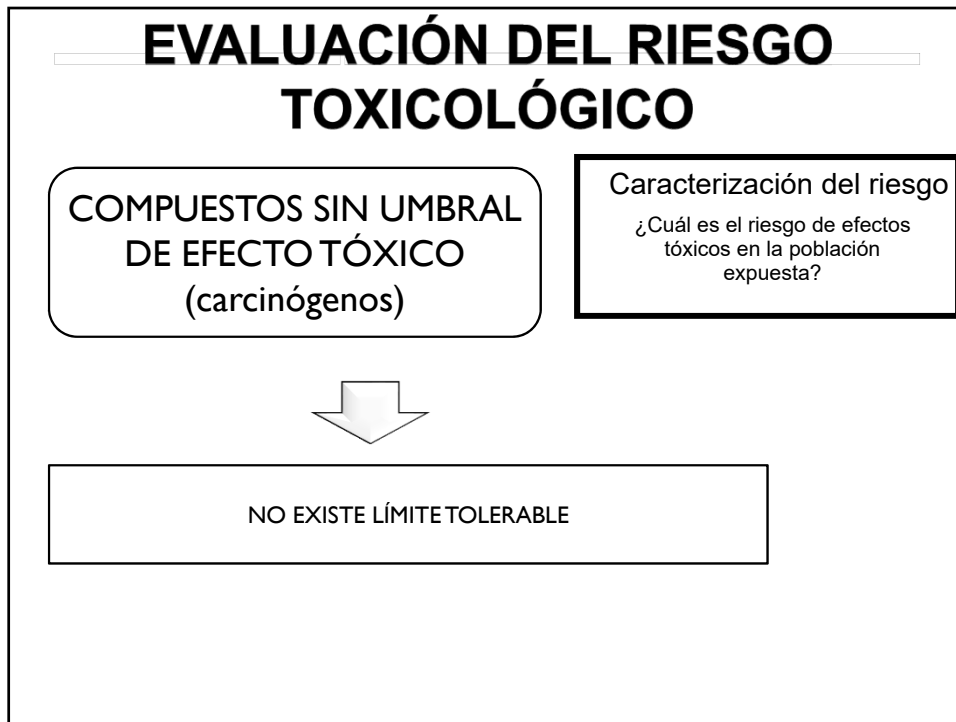


GOBIERNO DE ESPAÑA



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

110



111



112



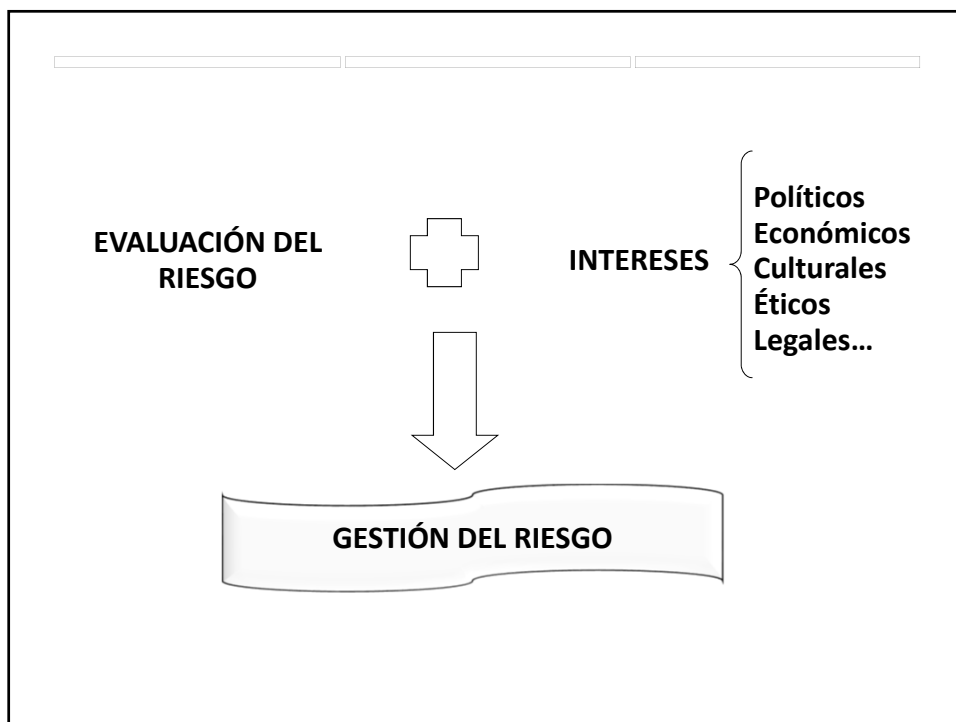
113



114



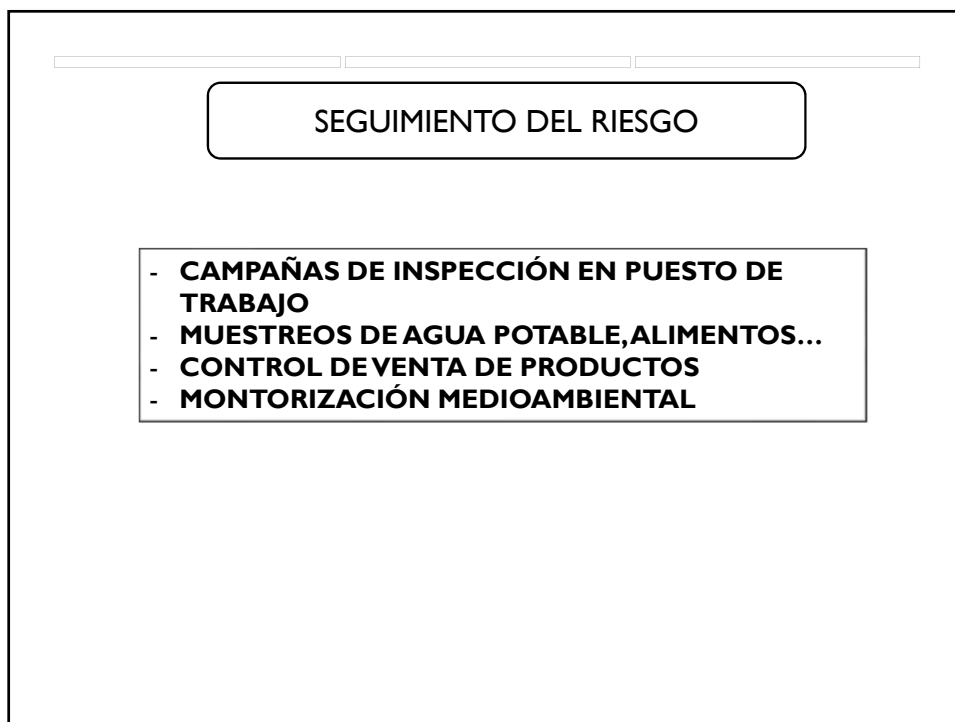
115



116



117



118