

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**EVALUACIÓN DEL RIESGO  
TOXICOLÓGICO**

*PILAR GÓMEZ RAMÍREZ*

1

**EVALUACIÓN DEL RIESGO  
TOXICOLÓGICO**



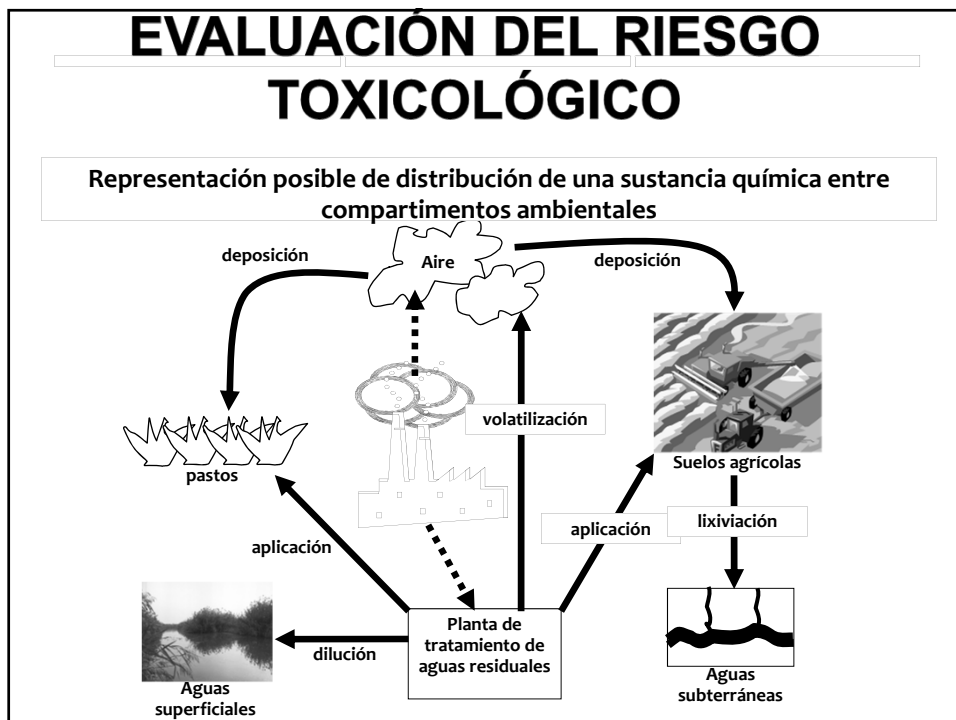
compuestos industriales, plaguicidas, aditivos alimentarios, compuestos farmacéuticos, detergentes y cosméticos

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

2



3



4

## 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

5

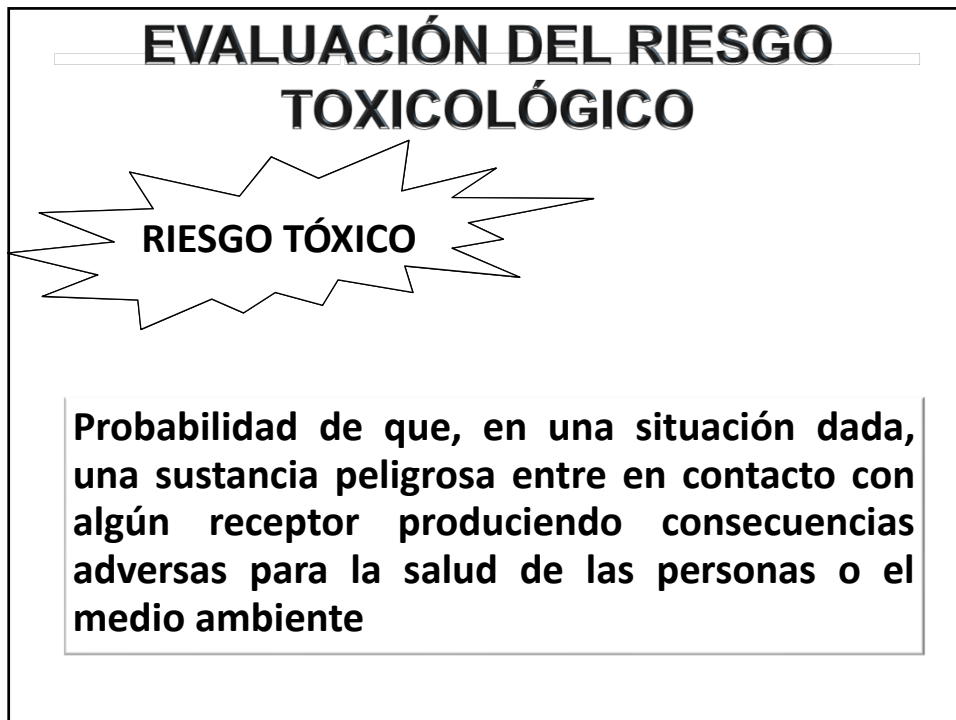
## EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO



**PELIGRO**

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

6



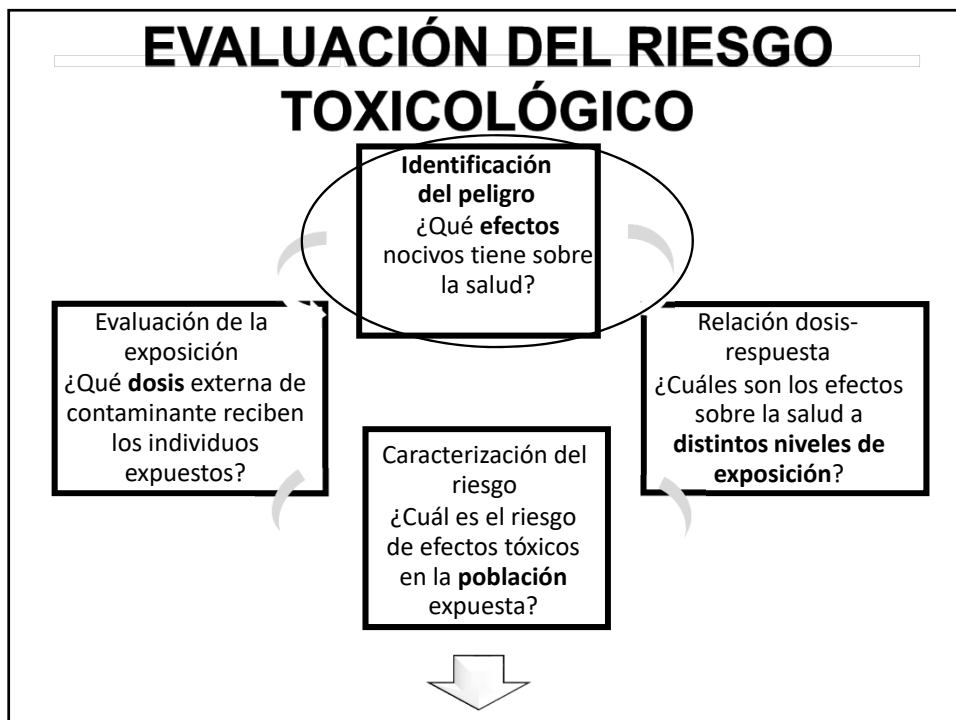
7



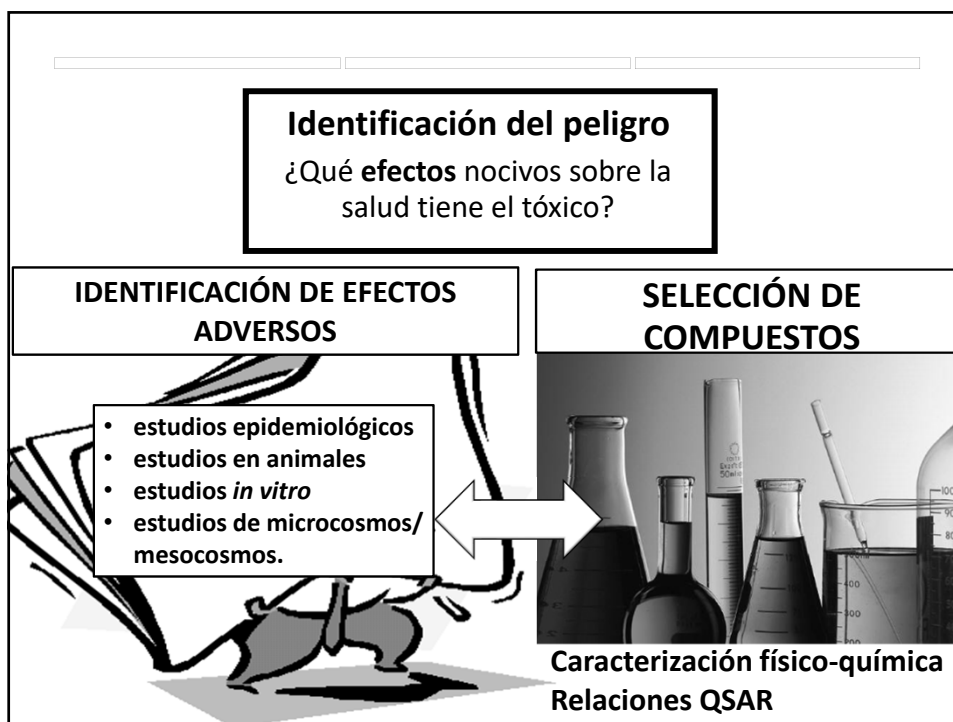
8



9




10



11

**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*

- a) REEMPLAZO: Métodos que no conlleven la utilización de animales vivos.
- b) REDUCCIÓN: El número de animales se reducirá al mínimo
- c) 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**

12

## 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

13

## ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

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

14

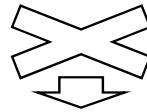
### ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- 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...

15

### 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

16



## 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

17

## 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

18

## 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

19

## MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

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

20

## 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)

21

## 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

22

## APLICACIONES

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

23

## ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS EXPERIMENTALES



### Plan de exposición

- Concentraciones
- Frecuencia
- Vía de administración

**INDICADORES DE TOXICIDAD**  
(parámetros a observar)

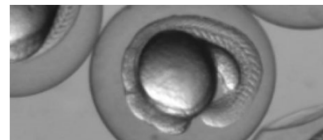
- Estudio estadístico de los resultados
- Modelos predictivos



24

## 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



25

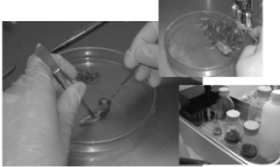
## SUSTRATOS BIOLÓGICOS

- 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

26

**SUSTRATOS 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

27

**SUSTRATOS 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  $\infty$ )
    - 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 cél (características homogéneas)

28

### SUSTRATOS BIOLÓGICOS

- Líneas celulares establecidas/clones celulares
  - Evaluación microscópica

descongelación

3 horas

54 horas

29

### SUSTRATOS BIOLÓGICOS

- Modelos libres de células:
  - Obtenidos por centrifugación
  - Evitar interacciones tisulares, celulares, etc: específico
  - microsomas, núcleos, mb,

Isolation of ER Microsomes

30

**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

31




32



### Evaluación de la exposición

¿Qué dosis externa de contaminante reciben los individuos expuestos?



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

33

### Evaluación de la exposición

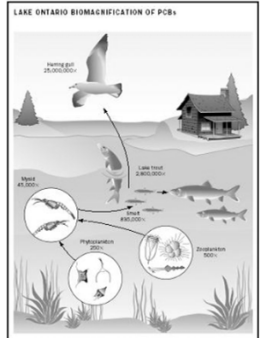
## RUTA DE EXPOSICIÓN

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

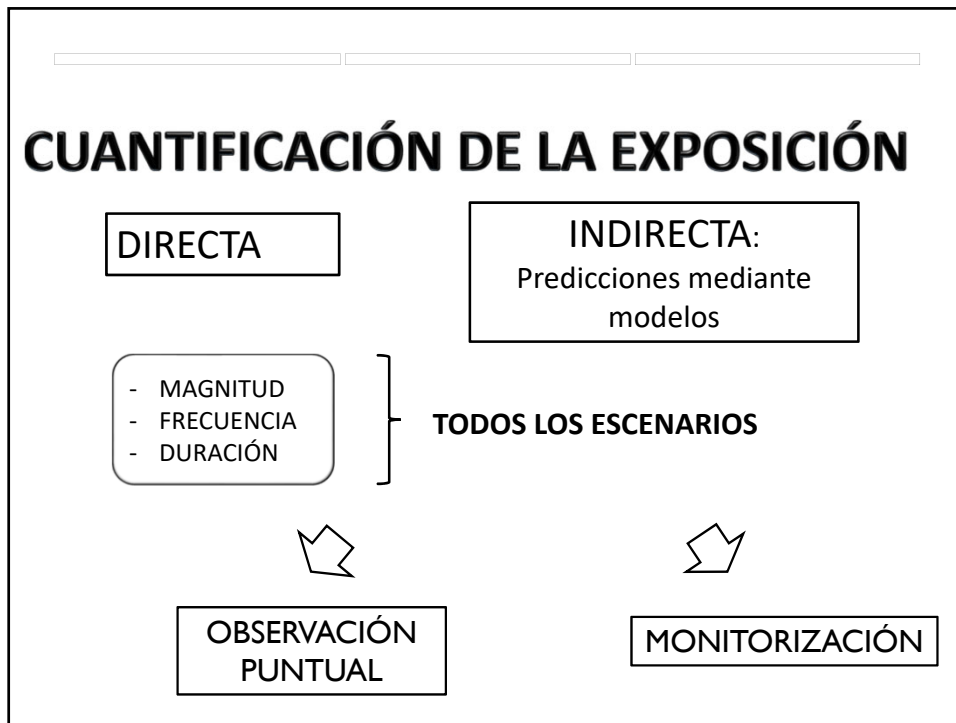


Conocer la cantidad de tóxico que contacta durante el periodo de exposición

Prever exposiciones futuras



34



35

### AGUA, SUELO, AIRE

Mediciones físicas

}

- Tª
- Precipitaciones
- Disponibilidad de agua
- Luz

Mediciones químicas

**Salinidad, nutrientes,  
CONTAMINANTES**

**REFERENCIAS: Hielo glaciar, sedimentos, turba...**

36

# 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

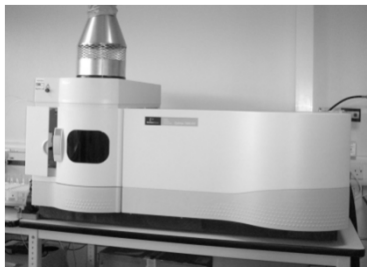


37

# 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)



38

## CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS



*Muestras hemáticas*

Sangre entera  
Plasma/Suero





*Orina*



*Aire espirado*







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

39

### Evaluación de la exposición

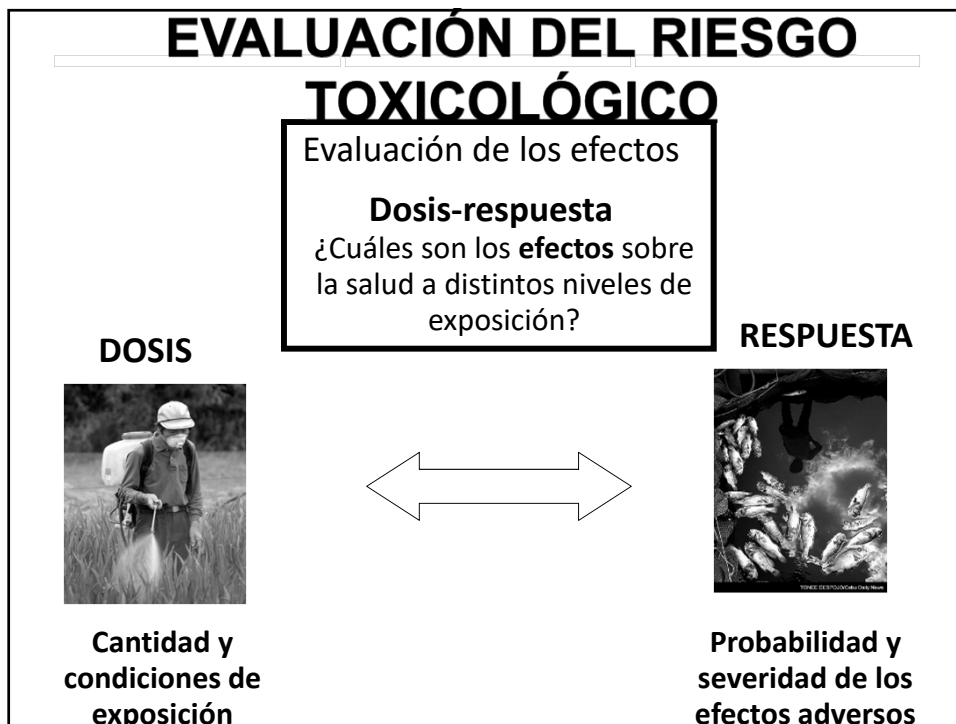
¿Qué **dosis** externa de contaminante reciben los individuos expuestos?

- 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.

40



41



42

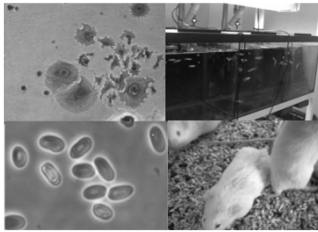
## EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS

ESTUDIOS NO EXPERIMENTALES

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

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

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



43

## 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

44

## EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS

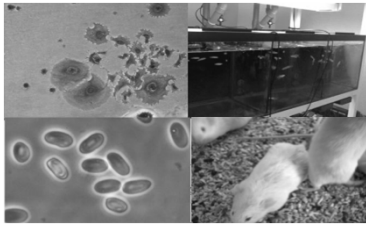
**ESTUDIOS EXPERIMENTALES**

**IN VIVO**

- Toxicidad aguda
- Toxicidad por administración continuada (28 días)

**IN VITRO**

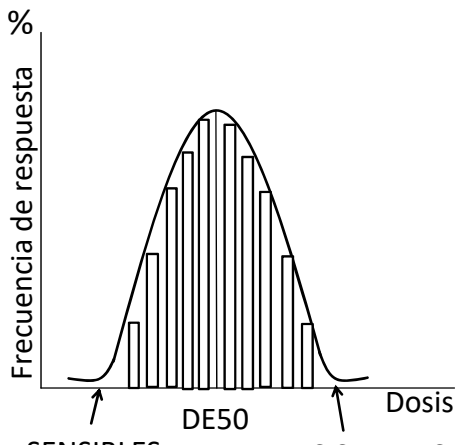
- Mutagénesis



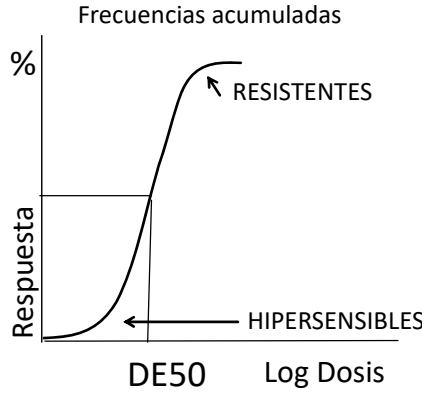
45

## EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS RELACIONES DOSIS-RESPUESTA

Gran nº de dosis con gran nº de animales/dosis



**GAUSSIANA**

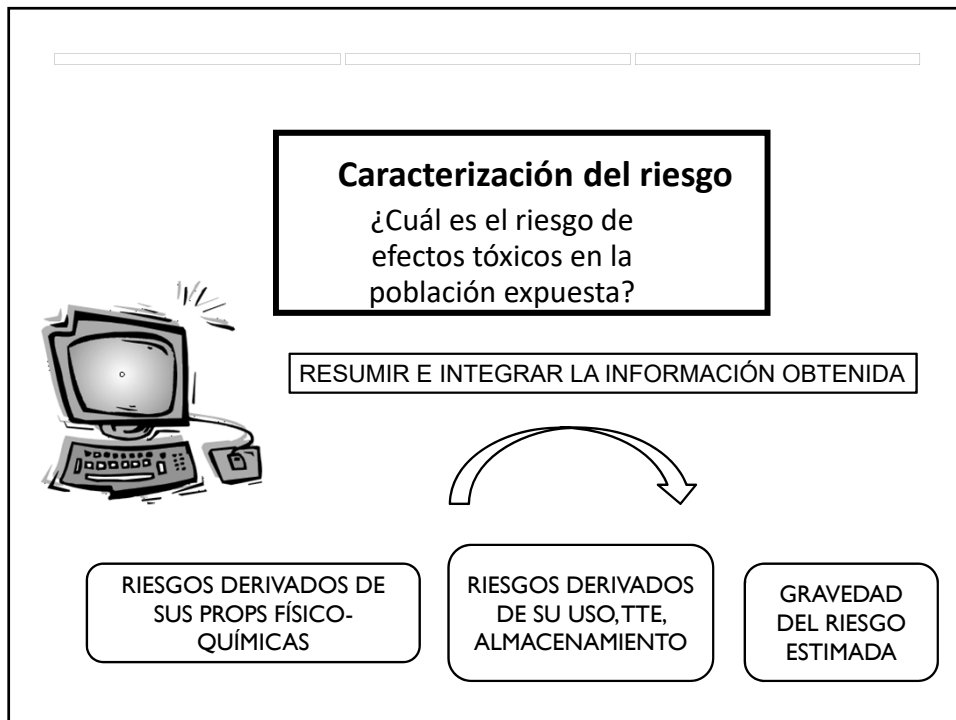


**SIGMOIDEA**

46



47

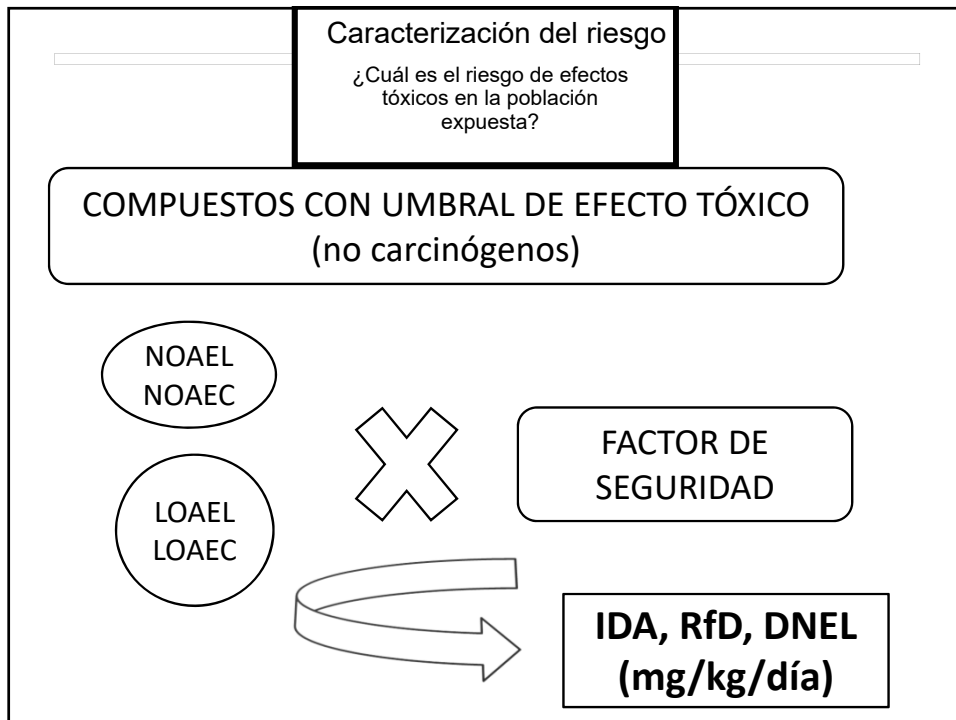


48

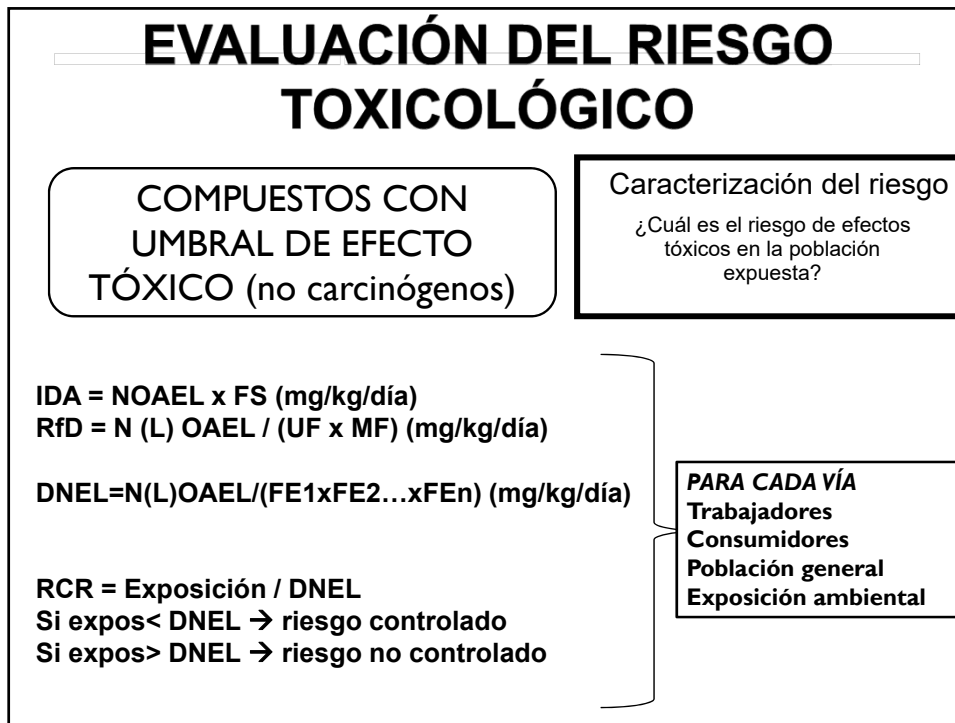





49




50




51




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 X 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

52



53



54



55



56