



**JORNADAS TOXICOLOGÍA
AMBIENTAL: SEGURIDAD QUÍMICA**

22 al 25 de Marzo, Torre Guil, Murcia

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

**Isabel María Moreno Navarro
Profesora Asociada de la Universidad de Sevilla**



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA



VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS

1. Previsiones Teóricas-Modelos matemáticos de predicción
2. Estudios no experimentales: informes de casos clínicos, forenses, estudios epidemiológicos.
3. Estudios experimentales con animales y plantas. (Toxicología Experimental)



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

LOS OBJETIVOS QUE SE PERSIGUEN SON:

- A. Definir la capacidad tóxica de una sustancia.
- B. Conocer el peligro de su exposición. Clasificación y etiquetado.
- C. Localizar los órganos dianas y mecanismos fisiopatológicos.
- D. Distinguir la diferente susceptibilidad entre especies, sexos y grupos.
- E. Conocer la cinética.
- F. Determinar los medios de diagnóstico.
- G. Establecer medidas terapéuticas.
- H. Evaluar el riesgo, establecer niveles de seguridad y medidas de prevención.



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

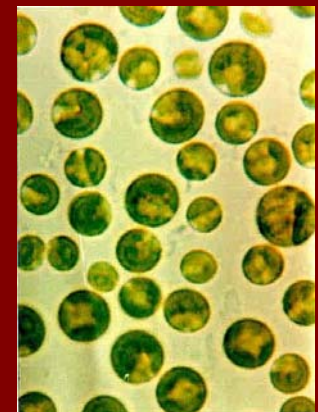
EXPERIMENTACIÓN CON VEGETALES

Objetivos:

Conocer la fitotoxicidad de los productos fitosanitarios y de uso agrícola.

Conocer el metabolismo, transformación y retención de las sustancias.

Se emplean plantas inferiores para llevar a cabo estudios de ecotoxicología.



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

Objetivos:

Valorar la peligrosidad de cada sustancia antes de ser comercializada.

- 1.Efectos letales agudos
- 2.Efectos irreversibles no letales (Una única exposición)
- 3.Efectos graves tras exposición repetida
4. Efectos sensibilizantes, irritantes, mutagénicos, carcinogénicos y corrosivos
- 5.Efectos tóxicos sobre el medioambiente
- 6.Efectos tóxicos sobre la reproducción y el desarrollo



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

ETIQUETADO:

Pictogramas (peligrosidad)

Frases R (riesgo)

Frases S (seguridad)



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

Protocolo:

1. Sustrato biológico / Especie animal
2. Número total y distribución de los grupos de animales
3. Selección de las dosis
4. Elección de las vías de administración
5. Duración del estudio
6. Parámetros a determinar
7. Análisis de los resultados
8. Condiciones generales del ensayo



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA



EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

1. Sustrato biológico / Especie animal

Tipo: animal, cultivo celular, enzimas...

Criterios: (especie animal)

- Animales pequeños
- Escala Filogenética:



- Especie roedora + No roedora
- Mitad de los animales de cada sexo



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

1. Sustrato biológico / Especie animal

Precauciones con los animales

- Bioterio de garantía
- Animales consanguíneos
- Animales axénicos (GF) y heteroaxénicos (SPF)
- Embarazos programados
- Control de condiciones ambientales
- Controles periódicos de salud
- No reutilizar animales

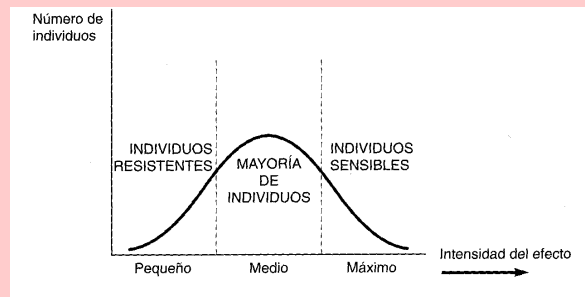


DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

2. Número total y distribución de los grupos de animales

- **Tamaño de la muestra:** Número menor posible, pero suficiente estadísticamente. Cuanto más homogénea sea la población, se requieren menos individuos.
- **Aleatorización completa** de los individuos para minimizar sus diferencias



- **Grupo control no tratado**



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

3. Selección de la dosis

Depende del tipo de estudio:

- **Estudios agudos:**
 - Ensayos pilotos previos, dosis separadas por un factor ≤ 2 ; Partir de datos *in vitro*, por QSAR, por similitud estructural.
 - 3 grupos separados obteniendo la DL50
- **Estudios de dosis repetidas:**
 - Dosis Baja: no provoque efecto (NOAEL)
 - Dosis Alta: tóxica pero no letal



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

4. Elección de la vía de administración

Depende del tipo de producto y la posible vía por la que el hombre lo absorbe:

Tipos:

- Oral: alimentaria o por sonda intragástrica
- Dérmica
- Inhalatoria
- Ocular
- Parenteral: iv, ip, sc, im

Los contaminantes atmosféricos se estudian por vía inhalatoria y cutánea.



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

5. Duración del estudio

Una sola administración: **Toxicidad aguda**

Períodos cortos de administración: **Toxicidad por dosis repetidas**

Períodos que oscilan entre 6 y 48 meses de exposición: **Toxicidad Crónica**

Casos especiales



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

6. Parámetros a determinar

Selección y programación previa

Principales indicadores:

1 Controles básicos:

Aspecto, postura... y peso, consumo de agua y alimento,

2 Comportamiento

3 Exámenes físicos

4 Hematología

5 Bioquímica sérica y urinaria

6 Autopsia y Estudio macroscópico

7 Estudio histológico



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

7. Análisis de los resultados

- a) Aplicación de las técnicas estadísticas adecuadas
- b) Identificación y criba de interferencias
- c) Análisis de los datos
- d) Interpretación de los datos
 - ❖ Significación estadística
 - ❖ Significación toxicológica



DISEÑO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES-PROTOCOLO

8. Condiciones generales de ensayo

- Recomendaciones y normativas internacionales
- Observación previa de los animales
- Ambiente idéntico
- Administración y observación a la misma hora
- Sacrificio rápido y poco estresante



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

Ensayos y estudios para la valoración de la toxicidad de cualquier sustancia que entre en contacto con el hombre o el medioambiente.

Líneas Directrices de la OCDE (Organization for Economic Co-operation and Development)

<http://www.oecd.org/>

Líneas Directrices de la ECB (European Chemical Bureau)



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

- 1 Efectos agudos (tras una sola exposición).
 - 1.1 Vía oral
 - 1.2 Vía cutánea
 - 1.3 Vía inhalatoria
- 2 Efectos por exposición repetida o prolongada.
- 3 Efectos por exposición crónica
- 4 Efectos carcinogénicos.
- 5 Efectos mutagénicos.
- 6 Efectos tóxicos para la reproducción y el desarrollo.
- 7 Efectos tóxicos sobre el medio ambiente.
- 8 Cinética en el organismo y degradación ambiental
- 9 Otros



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad Aguda

Objetivo:

Determinación del potencial tóxico de una sustancia química tras una sola exposición.

El mejor indicativo: **DL50**

Utilidad de la DL50

- 1.- Clasificar las sustancias por su peligrosidad, permitiendo su etiquetado
- 2.- Ayudar en la selección de las dosis de ensayo en estudios por dosis repetidas



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad Aguda-Clasificación de las sustancias según la DL50 vía oral

I Muy tóxica: $DL_{50} \leq 25$ mg/kg

II Tóxica: $DL_{50} \leq 250$ mg/kg

III Nociva: $DL_{50} \leq 2000$ mg/kg

IV Sin toxicidad aguda: $DL_{50} \geq 5000$ mg/kg



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad Aguda-Determinación de la DL50 vía oral

Método clásico (OCDE 401): varios grupos experimentales tratados simultáneamente con dosis diferentes seguida de interpolación. Actualmente está derogado.

Sistemas secuenciales: un grupo por etapa, y la dosis se decide según el resultado del grupo anterior:

Método de la dosis fija (OCDE 420)

Método de la clase tóxica aguda (OCDE 423)

Método arriba y abajo (OCDE 425)



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad Aguda-Determinación de la DL50 vía oral

Método de la dosis fija (OCDE 420):

5 animales por dosis

4 niveles de dosis (5, 50, 500, 2000 mg/kg)

Proporción de muertes y efectos tóxicos evidentes

5 mg/kg → muerte (Muy tóxico)
↓ NO
50 mg/kg → muerte (Muy tóxico o tóxico)
↓ NO
500 mg/kg → muerte (Tóxico o nocivo)
↓ NO
2000 mg/kg



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad Aguda-Determinación de la DL50 vía oral

Método de la clase tóxica aguda (OCDE 423):

3 animales por dosis

3 a 4 etapas

3 o 4 niveles de dosis (25, 200, 2000 mg/kg / 5, 50, 500, 2000 mg/kg)

Secuencia parecida a la anterior.

Reducción del número de animales de experimentación.



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

Estudios de Toxicidad Aguda-Determinación de la DL50 vía oral

Método de arriba y abajo "up and down" (OCDE 425):

Dosis única, dosis límite 2000 mg/kg

Muertes durante 24 horas

DL50 < 2000 mg/kg 3 muertes de 5

DL50 > 2000 mg/kg 3 o más supervivientes

Cálculos por métodos estadísticos



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

Estudios de Toxicidad Aguda por vía cutánea (OCDE 402/404)

Toxicidad dérmica aguda: Efectos adversos producidos por la aplicación de una sola dosis de una sustancia.

Objetivo

Clasificar la sustancia

Diferenciar entre corrosivo y no corrosivo.

No interesa la muerte del animal

Especies utilizadas:



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

Estudios de Toxicidad Aguda por vía cutánea (OCDE 402)

Limitar la zona de exposición

El tiempo < 24 horas

Eliminar el producto

Observar efectos (14 días)

5 animales

Dosis límite de 2000 mg/kg

Cálculo de la DL50



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Efectos de Irritación/Corrosión aguda en piel (OCDE 404)

Limitar la zona de exposición

El tiempo < 4 horas

Eliminar el producto

Observar efectos



Escala de las reacciones cutáneas:

0: sin cambios visibles

1: eritema/edema ligero en manchas localizadas

2: eritema/edema moderado y confluyente

3: eritema/edema intenso y tumefacción

4: Eritema/edema severo



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad por vía cutánea

Ensayo de Irritación/Corrosión Aguda sobre los ojos (OCDE 405):

Especies utilizadas:

3 por lotes

Posibilidad de usar de anestésicos

0,1 mL en el saco conjuntival

El tiempo < 21 días

Anotar daños reversibles/irreversibles



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad por vía cutánea

Estudio de sensibilización dérmica (OCDE 406): El objetivo es la identificación de sustancias con potencial alergénico significativo

Método de Magnusson y Kligman

Cobayas

10 por lote tratado y 5 por lote control

Inyección intradérmica

Observación de los efectos 24/48 horas



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad por vía inhalatoria (OCDE 403)

Objetivo:

Evaluar y estimar las propiedades tóxicas de gases, volátiles, aerosoles y materias particuladas.

Clasificar el producto

Condiciones:

10 animales (5M+5H)

3 niveles de concentración

Tiempo de exposición < 4 horas

Observación 14 días

Examen clínico dos veces al día

Interpretación: por daños y muerte



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

Estudios de Toxicidad por vía inhalatoria- Procedimiento de la concentración fija (OCDE 433)

Objetivo:

Evaluar y estimar las propiedades tóxicas de gases, volátiles, aerosoles y materias particuladas.

Clasificar el producto

Condiciones:

5 animales (solo un sexo)

Concentraciones fijas dependiendo de si es vapor, gas o polvo.

Tiempo de exposición < 4 horas

Observación 14 días

Examen clínico dos veces al día

Interpretación: por daños y muerte



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad con Dosis Repetidas

Objetivo:

Conocer los efectos de las sustancias en animales de experimentación tras administración de dosis repetidas y posible extrapolación al hombre.

Período de exposición:

14 días

28 días

90 días



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad con Dosis Repetidas

Condiciones:

4 lotes de animales de cada sexo

3 niveles de dosis

1. una que no produzca toxicidad
2. una intermedia
3. y otra que sea ligeramente tóxica.

Administración diaria

Observación dos veces al día



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

Estudios de Toxicidad con Dosis Repetidas

Líneas Directrices de la OCDE

408: toxicidad oral dosis repetidas (90 días) roedores

409: toxicidad oral dosis repetidas (90 días) no roedores

411: estudios dérmicos con dosis repetidas (90 días)

412: toxicidad inhalatoria dosis repetidas (14 o 28 días)

413: toxicidad inhalatoria dosis repetidas (90 días)



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO



Estudios de Toxicidad Crónica

Objetivos:

Conocer los efectos a largo plazo

Determinar la dosis sin efecto adverso observado:
NOAEL

Condiciones:

Administración diaria

Observaciones mucho más detalladas que en estudios agudos

Especies Animales seleccionadas en ensayos previos.

Usualmente: 25 roedores y 6 perros por nivel de dosis.

Lotes: 2-4 niveles, seleccionadas según DL-50, con 10 animales de cada sexo por nivel de dosis, como mínimo.



PRINCIPALES ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO

Estudios de Toxicidad Crónica

Observaciones:

- 1 Aspecto físico (diariamente)
- 2 Comportamiento
- 3 Exámenes físicos
- 4 Hematología (periódicamente y al final)
- 5 Bioquímica sanguínea (periódicamente y al final)
- 6 Orina (periódicamente y al final)
- 7 Muerte





JORNADAS TOXICOLOGÍA AMBIENTAL: SEGURIDAD QUÍMICA

22 al 25 de Marzo, Torre Guil, Murcia

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

Isabel María Moreno Navarro
Profesora Asociada de la Universidad de Sevilla

