

EVALUACIÓN DE TOXICIDAD: Métodos experimentales.



Clase correspondiente a la **UNIDAD 6**

CONTENIDOS:

Evaluación de la toxicidad. Principios generales para los estudios de toxicidad. Reglamentaciones sobre la experimentación toxicológica. Estudios de toxicidad aguda por vía oral: Determinación de la DL50. Estudios agudos por vía cutánea y vía inhalatoria. Estudios de toxicidad por administración continuada y de toxicidad subcrónica. Estudios de toxicidad crónica. Ensayos de mutagenicidad. Ensayos de carcinogenicidad. Métodos alternativos.

BIBLIOGRAFÍA: "Toxicología Experimental" Toxicología Fundamental. Repetto. 3ra Ed. (Cap. 11)



SINOPSIS DE LA PRESENTACIÓN: Evaluación de toxicidad

OBJETIVO DE LOS ESTUDIOS (Diap. 4)

MÉTODOS (Diap. 5-22)

ESTUDIOS RETROSPECTIVOS (Diap. 5)

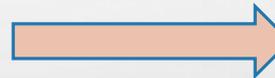
EXPERIMENTOS CON ANIMALES Y PLANTAS (Diap. 6-19)

EXPERIMENTOS CON PLANTAS (Diap. 6-7)

EXPERIMENTOS CON ANIMALES (Diap. 8-19)

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES (Diap. 8-10)

DISEÑO EXPERIMENTAL (Diap. 11-18) **



ESTUDIOS POR MÉTODOS ALTERNATIVOS (Diap. 19-22)

ESTUDIOS *IN VITRO* CON PROCARIOTAS (Diap. 20)

ESTUDIOS *IN SILICO* CON PROCARIOTAS (Diap. 21)

ESTUDIOS *IN VITRO* CON EUCARIOTAS (Diap. 22)

OTROS DATOS (Diap. 23-26)

DISEÑO EXPERIMENTAL (Diap. 11-18) **

ESPECIE ANIMAL (Diap 11)

Número y grupo de animales (Diap 12)

OTRAS CONSIDERACIONES (Diap 13)

VÍAS DE ADMINISTRACIÓN (Diap 14)

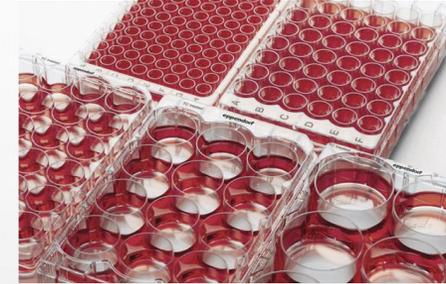
Tiempo y duración del estudio (Diap 15-18)

Toxicidad Aguda (Diap 16)

Toxicidad Crónica (Diap 17)

Toxicidad reproductiva y del desarrollo (Diap 18)

OBJETIVOS: LOS ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS NECESITAN ESTABLECER LOS EFECTOS PELIGROSOS SOBRE LA SALUD DE LOS XENOBIÓTICOS...



- EFECTOS LETALES AGUDOS: tras una sola exposición.
- EFECTOS IRREVERSIBLES NO LETALES, tras una sola exposición
- EFECTOS GRAVES, tras exposiciones repetidas
- EFECTOS CORROSIVOS
- EFECTOS IRRITANTES
- EFECTOS SENSIBILIZANTES
- EFECTOS CARCINOGENICOS
- EFECTOS MUTAGÉNICOS
- EFECTOS TÓXICOS PARA LA REPRODUCCIÓN Y EL DESARROLLO
- EFECTOS TÓXICOS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE.

Símbolos e indicaciones de peligro de las sustancias y preparados peligrosos [1]



E: Explosivo



O: Comburente



F+:

Extremadamente inflamable



F: Fácilmente inflamable



T+: Muy tóxico



T: Tóxico



C: Corrosivo



Xn: Nocivo



Xi: Irritante



N: Peligroso para el medio ambiente

DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD: ESTUDIOS EXPERIMENTALES.



A. ESTUDIOS RETROSPECTIVOS DE CASOS DE INTOXICACIÓN

ORIGINALES

Estudio retrospectivo de casos de Intoxicación por Monóxido de Carbono atendidos en los últimos 7 años en Centros Hospitalarios de Vigo ^{1*}

A. Ros Rosillo

Servicio de Sanidad Marítima. Instituto Social de la Marina. Vigo

Estudio Retrospectivo: Intoxicaciones en Pacientes Pediátricos del Hospital Vicente Corral Moscoso, Enero a Diciembre 2015 / Retrospective Research: Poisoning in Pediatric Patients of Vicente Corral Moscoso Hospital, January December 2015

Romero Valdez, Alexandra Rocío; Rojas Bastidas, Lisseth Jhoana; Córdova Neira, Fernando Marcelo.

Rev. méd. Hosp. José Carrasco Arteaga ; 11(1): 53-57, Marzo 2019. Tablas

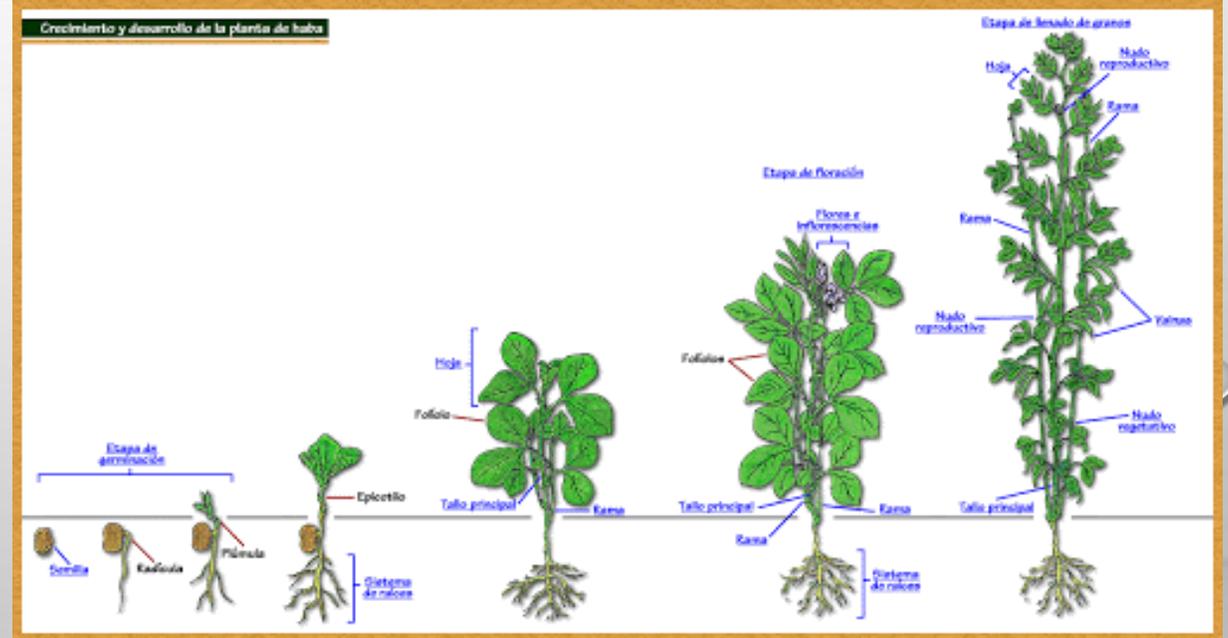
Artigo em Espanhol | LILACS | ID: biblio-1016209

Biblioteca responsável: [EC163](#)

DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD: ESTUDIOS EXPERIMENTALES.



B. ENSAYOS EXPERIMENTALES CON ANIMALES Y PLANTAS



ESTUDIOS EXPERIMENTALES: PLANTAS

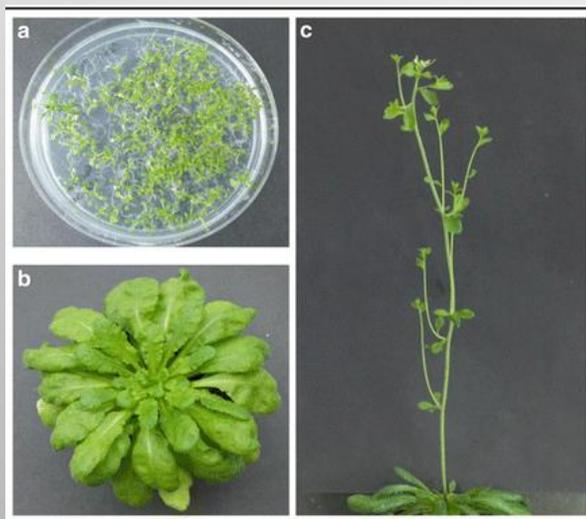
Límite Máximo Permitido
de Residuos de
Plaguicidas adoptados
por el CODEX en Julio de
2016

Base de Datos del CODEX ALIMENTARIUS



1. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS

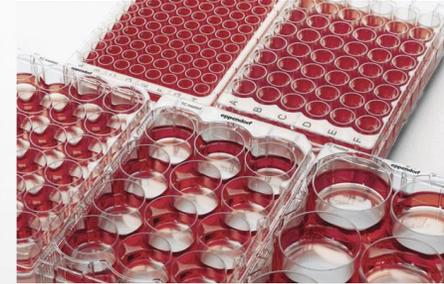
2. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALGAS PARA DETECCIÓN DE HERBICIDAS EN SANGRE



3. DETERMINACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA FISIOLOGÍA VEGETAL INDUCIDAS POR TÓXICOS

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES:

Consideraciones preliminares...



A PESAR DE LAS CONTROVERSIAS, EN UN CONTEXTO TOXICOLÓGICO, LA UTILIZACIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO PERMITE ESTUDIAR LAS RESPUESTAS SISTÉMICAS DE LOS ORGANISMOS (TOXICOCINÉTICA) A LOS XENOBIÓTICOS.

Experimentación y protección animal

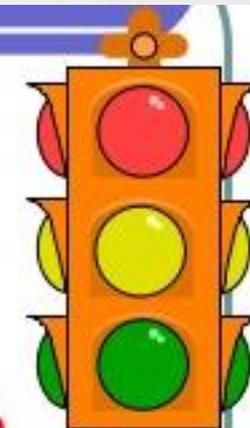
La ética en la investigación con animales



DEBE REALIZARSE CUMPLIENDO CON TODAS LAS EXIGENCIAS LEGALES Y ÉTICAS QUE ACTUALMENTE SE ENCUENTRAN EN VIGENCIA.

Principio de las

3 R



- R** **eplacement** ·No utilizar animales, o
- R** **eduction** ·Utilizar los menos posibles y
- R** **efinement** ·Con técnicas más precisas para evitar al máximo el sufrimiento

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES:

Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)...

LOS CICUALes SON LOS COMITÉS QUE EVALÚAN, ASESORAN Y CONTROLAN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL EN LAS DISTINTAS INSTITUCIONES.

ADEMÁS, FORMAN REDES QUE PERMITEN ESTABLECER CRITERIOS HOMOGÉNEOS DE TRABAJO Y ASESORAMIENTO



CICUAL
Comité Institucional para el Cuidado y
Uso de Animales de Laboratorio
FCEyN · UNMdP



DISEÑO EXPERIMENTAL DE ENSAYOS TOXICOLÓGICOS CON ANIMALES:



1. Especie animal a utilizar

A. CLASIFICACIÓN SEGÚN ESPECIE:

1. FRECUENTES: ratones, ratas, cobayos, conejos.
2. MENOS FRECUENTES: aves, peces, gatos, perros.
3. EXCEPCIONALES: primates



B. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ORIGEN GENÉTICO

1. EXOGÁMICOS
2. ENDOGÁMICOS
 - a. cepas
 - b. animales transgénicos
 - c. animales knock-out
 - d. animales knock-in

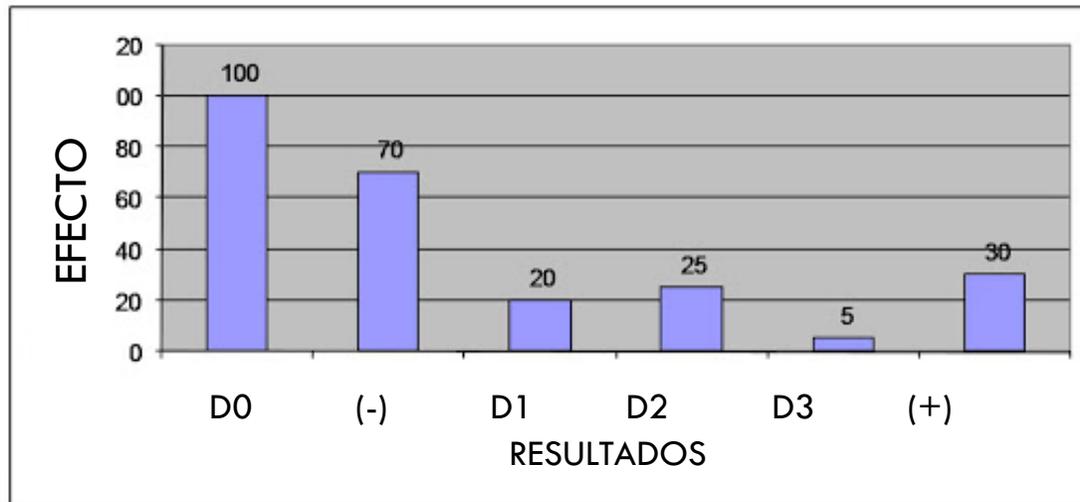
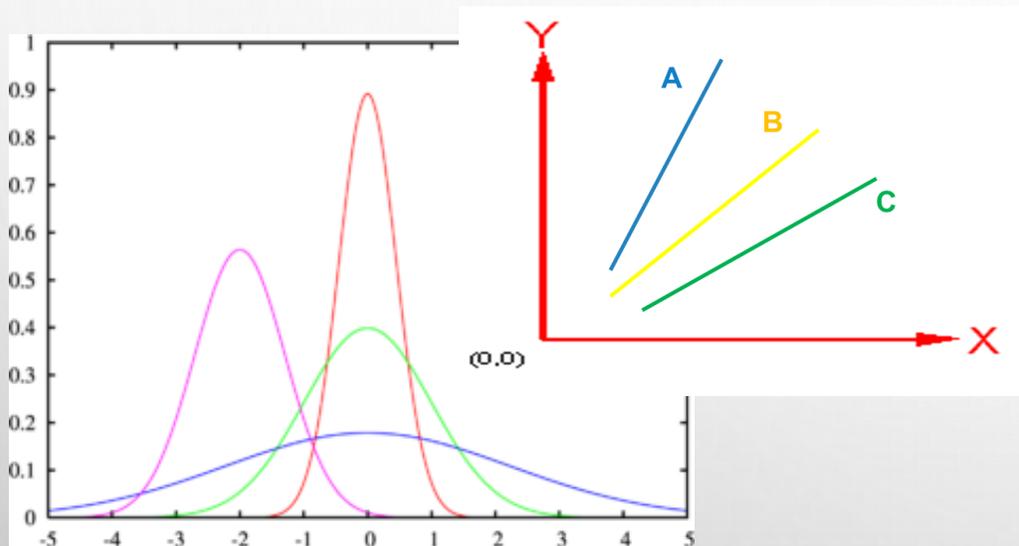
C. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU *STATUS* BACTERIOLOGICO

1. CONVENCIONALES: Flora bacteriana desconocida.
2. GNOTOBIÓTICOS: Flora conocida.
 - a. Axénicos
 - b. Gnotoxénicos
3. AGNOTOBIÓTIOS: Flora bacteriana controlada.
 - a. Heteroxénicos: Germ free, SPF, COBS
 - b. Holoxénicos
 - c. Neoholoxénicos

DISEÑO EXPERIMENTAL DE ENSAYOS TOXICOLÓGICOS CON ANIMALES:



2. Número y grupos de animales



La selección del número de animales (n) por grupo debe realizarse considerando la distribución gaussiana de un efecto en la población y la presencia de subpoblaciones con diferente sensibilidad al xenobiótico. Muchas revistas tiene sus propias exigencias sobre el n a utilizar en cada grupo.

El diseño experimental debe considerar un grupo mínimo de animales. Depende del estudio particular pero en términos generales, deben incluirse: **D0** (grupo sin tratar), **(-)** (grupo tratado vehículo), **D1-3** (diferentes dosis del tóxico a estudiar que permitan establecer la relación dosis-respuesta) y **(+)** (grupo tratado con un tóxico conocido).

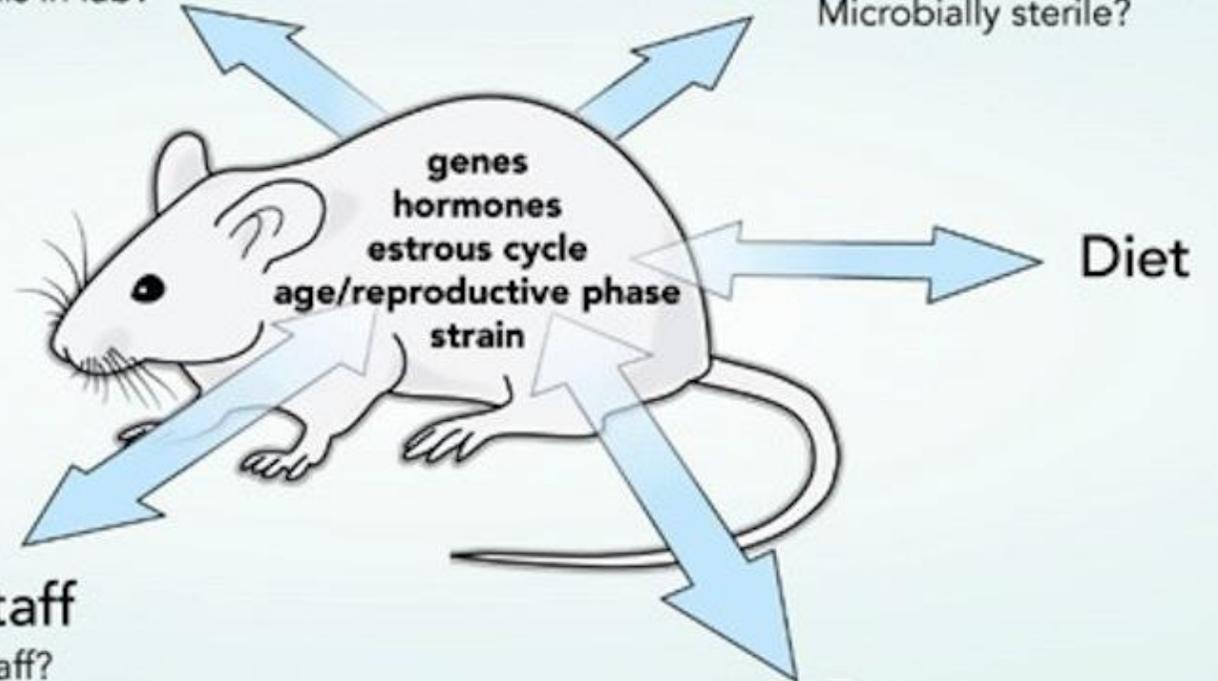
Integrating Sex & Gender into Animal Research

Social Dynamics

Sex-segregated or male/female mix?
Number and mix of animals in lab?

Caging

Individual or group? Size?
Complex environment vs. no enrichment?
Microbially sterile?



Diet

Researcher/Staff

Sex of researcher/staff?
Research/staff handling of
male/female animals?

Room

Temperature?
Sound?
Lighting (circadian)?
Odor?

**OTRAS
CONSIDERACIONES
RELACIONADAS A LA
SELECCIÓN DE ANIMALES...**

DISEÑO EXPERIMENTAL DE ENSAYOS TOXICOLÓGICOS CON ANIMALES:

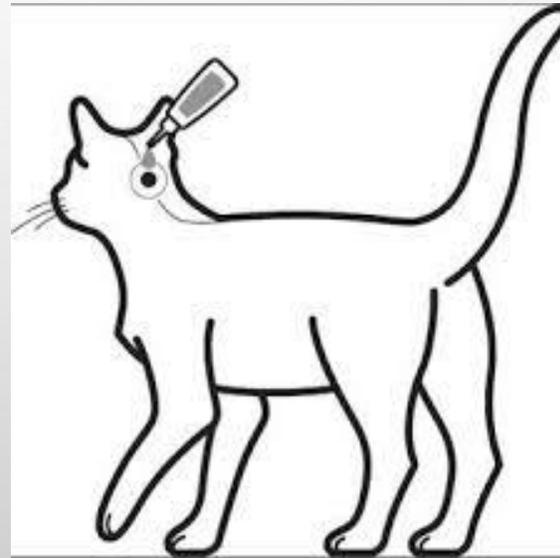
3. Vías de administración

Debe seleccionarse en función de la vía de exposición por la que el xenobiótico en estudio toma contacto con el organismo huésped.

1. Oral



2. Parenteral (intravenosa)



3. Tópica



4. Sensibilización



DISEÑO EXPERIMENTAL DE ENSAYOS TOXICOLÓGICOS CON ANIMALES:

4. Tiempo de duración del estudio

A. TOXICIDAD AGUDA:

Son estudios que consideran la administración del xenobiótico en una ÚNICA dosis. Los resultados esperados pueden analizarse en forma inmediata o diferida (7, 14, 28 días).

B. TOXICIDAD CRÓNICA Y/O SUBCRÓNICA:

Se trata de estudios que consideran los efectos de la ADMINISTRACIÓN REPETIDA de un xenobiótico. Los plazos utilizados más frecuentemente utilizados son : 28 días (subcrónica) y mayor a 90 días (crónica).

C. TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO:

Se trata de estudios que consideran la ADMINISTRACIÓN REPETIDA en relación a etapas fisiológicas especiales como resultan como son la preñez y lactancia. Generalmente se estudia el comportamiento de variables como la formación de gametos y estructura gonadal, fertilidad, gestación, parto y lactancia. Sobre la descendencia pueden estudiarse variables relacionadas al comportamiento, aumento de peso, presencia de malformaciones, pautas de maduración.



A. TOXICIDAD AGUDA:

- Es la capacidad de una sustancia de producir efectos adversos tras UNA SOLA DOSIS.
- Por resultar evidente e irreversible, el parámetro más frecuentemente utilizado es la Dosis Letal media (DL50).
- Aunque existen diferentes criterios para clasificar un compuesto tóxico, la OECD* recomienda...



Tabla 11.4. MÉTODO DE DOSIS FIJA PARA DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL APROXIMADA. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL, EN RATA, EN LOTES DE 5 ANIMALES

Dosis	Resultado	Interpretación
5 mg/kg	Supervivencia menor del 100 por 100.	Compuesto <i>muy tóxico</i> .
	Supervivencia del 100 por 100 pero toxicidad evidente. Sin signos de toxicidad.	Compuesto <i>tóxico</i> .
50 mg/kg	Supervivencia menor del 100 por 100.	Ensayar dosis de 50 mg/kg.
	Supervivencia del 100 por 100 pero toxicidad evidente. Sin signos de toxicidad.	Compuesto <i>muy tóxico</i> o <i>tóxico</i> . Ensayar dosis de 5 mg/kg. Compuesto <i>nocivo</i> .
500 mg/kg	Supervivencia menor del 100 por 100.	Ensayar dosis de 500 mg/kg.
	Supervivencia del 100 por 100 pero toxicidad evidente. Sin signos de toxicidad.	Compuesto <i>tóxico</i> o <i>nocivo</i> . Ensayar dosis de 50 mg/kg. Compuesto <i>nocivo</i> . No precisa más ensayos.
2.000 mg/kg	Supervivencia menor del 100 por 100.	Ensayar dosis de 2.000 mg/kg.
	Supervivencia menor del 100 por 100. Sin signos de toxicidad.	Compuesto <i>nocivo</i> . Ensayar dosis de 500 mg/kg. Compuesto sin riesgo de efectos agudos.

*OECD: Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), que es una asociación económica intergubernamental con 36 países integrantes cuyo objetivo es el progreso económico y el comercio internacional.

B. TOXICIDAD CRÓNICA

- Se consideran crónicos estudios sostenidos en el tiempo (desde 7 días a 18 meses), en los cuales se administran diferentes dosis del xenobiótico problema, de manera diaria y repetida, utilizando como diversas variables para determinar toxicidad...



ASPECTO FÍSICO



- POSTURA
- PÉLO
- MUCOSAS
- LIMPIEZA

COMPORTAMIENTO



- CONSUMO LÍQUIDO
- ALIMENTACIÓN
- ACTIVIDAD ESPONTÁNEA
- AGRESIVIDAD
- ACICALAMIENTO

HEMATOLOGÍA

- ERITROCITOS
- LEUCOCITOS
- FÓRMULA
- PLAQUETAS



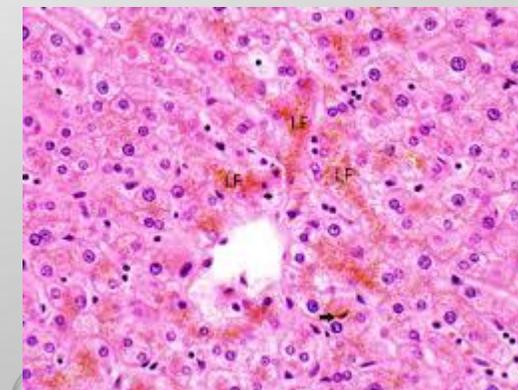
BIOQUÍMICA



- GLUCEMIA
- UREMIA
- CREATININEMIA
- ASAT
- ALAT
- FAL



ANATOMÍA PATOLÓGICA



- HÍGADO
- RIÑÓN
- PULMÓN
- INTESTINO
- BAZO
- MÚSCULO

CRITERIO HUMANITARIOS DE EUTANASIA: el animal debe ser inmediatamente sacrificado ante la presencia de signos como: convulsiones, adelgazamiento (>20%), anorexia, lordosis, ascitis, etc.

C. TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO

TRASTORNOS DE LA FERTILIDAD MASCULINA O FEMENINA



- LIBIDO
- COMPORTAMIENTO SEXUAL
- GAMETOGÉNESIS
- ACTIVIDAD HORMONAL
- PROCESO DE FERTILIZACIÓN
- DESARROLLO DEL CIGOTO
- IMPLANTACIÓN

TRASTORNOS DEL DESARROLLO

ETAPAS:

• PRENATAL



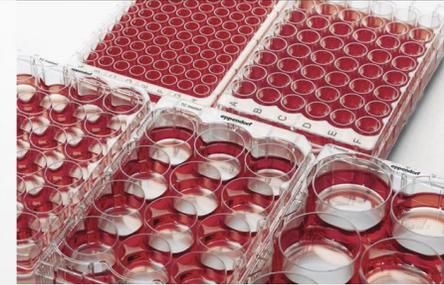
• PERINATAL



• POSNATAL



• LACTANCIA



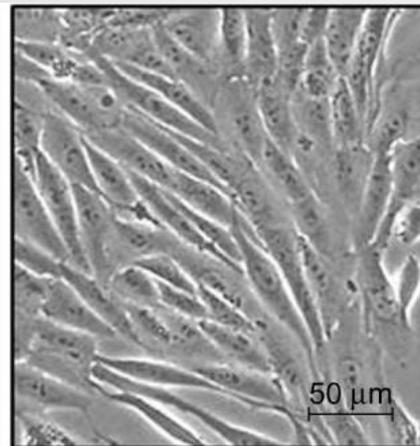
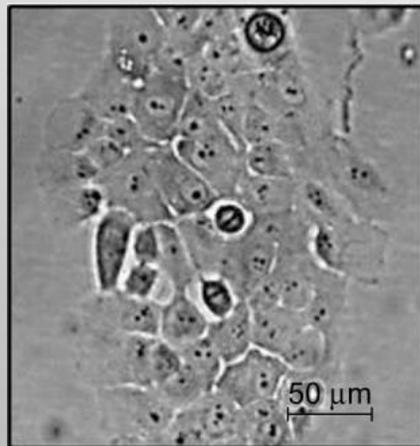
- DISMINUCIÓN DEL PESO
- RETRASO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO
- LESIONES ÓRGANO ESPECÍFICAS
- MUERTE
- ABORTO
- DEFECTOS ESTRUCTURALES
- DEFECTOS FUNCIONALES

ESTUDIOS DE TOXICIDAD ALTERNATIVOS:

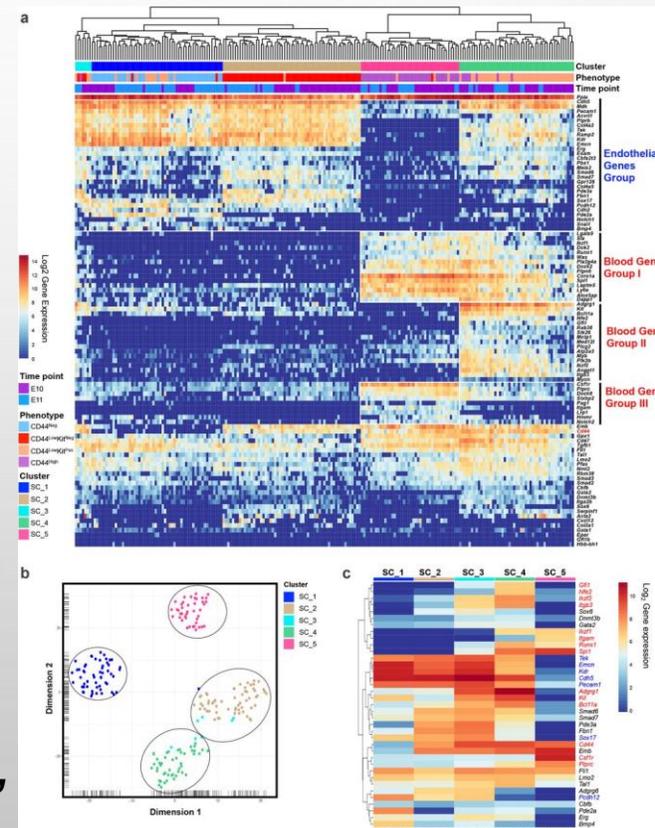
Estos estudios no sustituyen a los experimento *in vivo*, pero obligatoriamente deben realizarse en forma previa a estos con el objeto de ajustar la experimentación animal acorde al **principio de las 3R**.



1. MODELOS CELULARES PROCARIOTAS "IN VITRO"



3. MODELOS CELULARES EUCARIOTAS "IN VITRO"



2. MODELOS MATEMÁTICOS Y COMPUTACIONALES "IN SILICO"

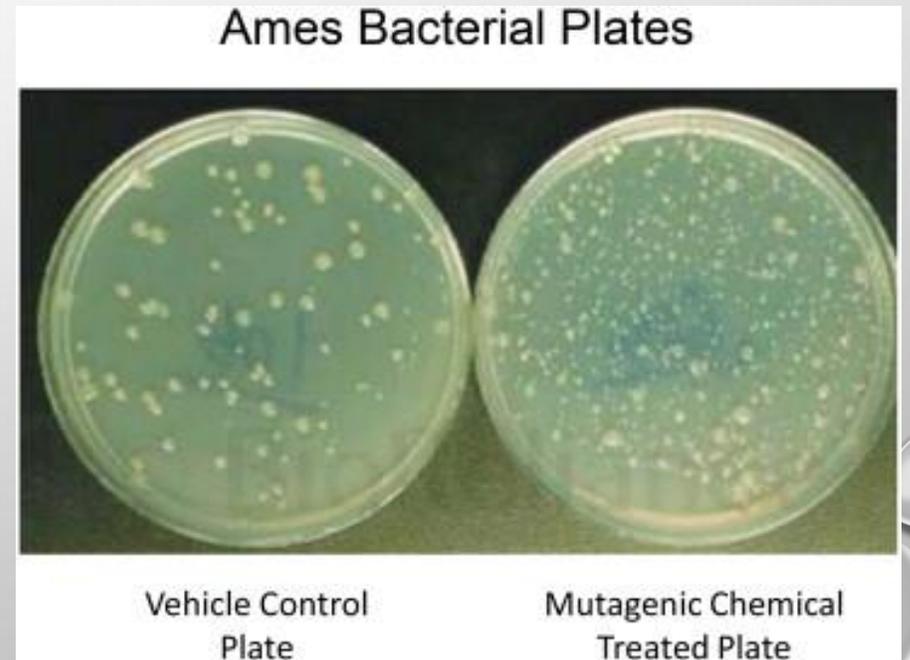
1. MODELOS CELULARES PROCARIOTAS “IN VITRO”



Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico.



El test de Ames es un ensayo biológico para evaluar el potencial mutagénico de compuestos químicos. Esta prueba utiliza varias cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* alteradas genéticamente para presentar mutaciones en los genes implicados en la síntesis de histidina. A causa de dichas mutaciones, estas bacterias requieren de un suministro externo de histidina para su crecimiento. El ensayo pone a prueba la capacidad del mutágeno para provocar una alteración genética en las bacterias que permita el retorno al crecimiento en un soporte libre de histidina.



2. TÉCNICAS DE PREDICCIÓN “IN SILICO” DE TOXICIDAD



A. Modelado molecular: evalúan la interacción de moléculas pequeñas con macromoléculas biológicas (predominantemente proteínas), ajustando el ligando en el sitio activo del receptor.



B. Sistemas expertos: evaluarán la toxicidad de un nuevo compuesto, en un programa de ordenador. La creación de una base de datos para un sistema experto requiere extensas búsquedas para crear conocimientos aplicables a partir de casos específicos.

C. Driven data system: El clásico análisis (Q) SAR utiliza técnicas de regresión para derivar las ecuaciones a partir de datos experimentales. Estas ecuaciones se pueden utilizar para la predicción de otros compuestos con estructuras y mecanismos similares.

2. MODELOS CELULARES EUCARIOTAS "IN VITRO"

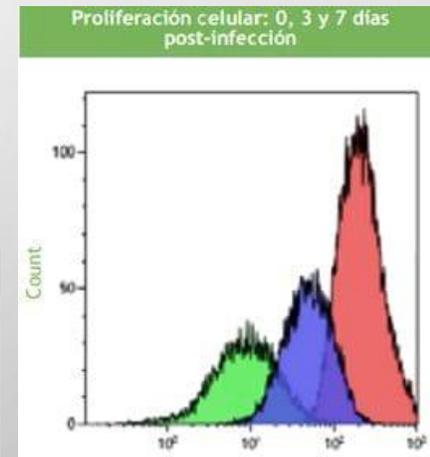
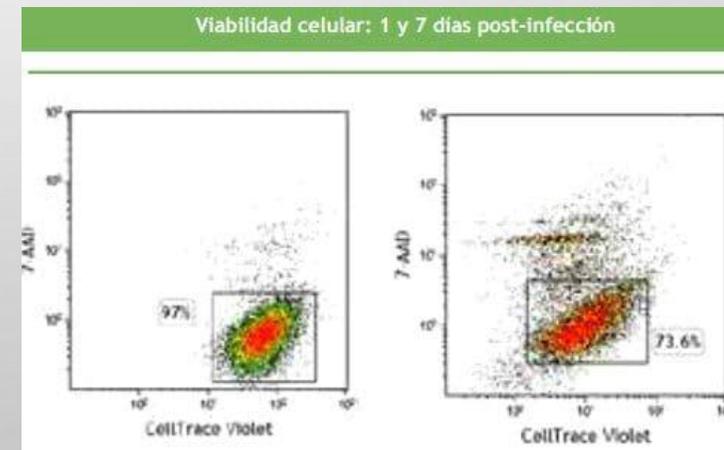
A. SUSTRATO BIOLÓGICO

En la práctica, el término "cultivo celular" se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de eucariotas pluricelulares. Estas células se encuentran disponible comercialmente y son representativas de diferentes especies y órganos.

LÍNEA CELULAR	JURKAT T	MDA-MB-231	MCF-7/VP
Morfología			
Tejido	Linfocitos T	Glándula mamaria	Glándula mamaria
Origen	Sanguíneo	Epitelial	Epitelial
Crecimiento	Suspensión	Adherente	Adherente
Procedencia	ATCC: TIB-152	ATCC: HTB-25	Derivada de MCF-7 por selección a Etopósido
Características	p53 funcional	p53 mutada p16 mutada	p53 mutada ¹⁹ caspasa-3 mutada sobrexpresión MRP-1

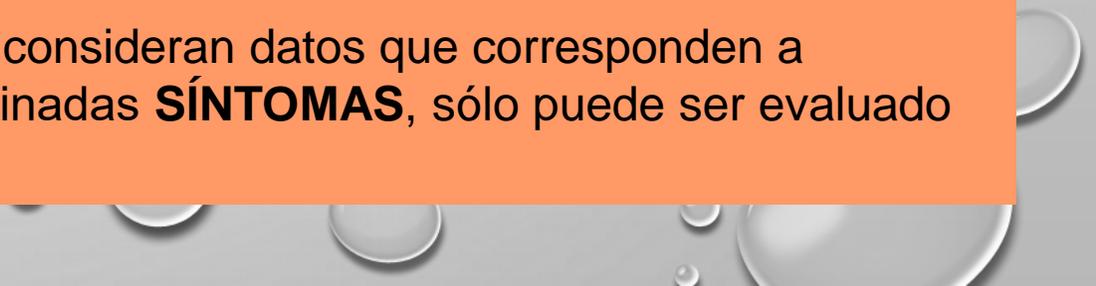
B. INDICADORES DE TOXICIDAD

Son parámetros elegidos para representar los efectos del xenobiótico a estudiar. Incluyen estudios de proliferación celular, viabilidad, morfología, actividad metabólica, integridad de membranas celulares, etc.





CORRELACIÓN ENTRE TOXICIDAD ANIMAL, LA HUMANA Y TOXICOLOGÍA COMPARATIVA

- **NINGÚN ANIMAL RESPONDE A LOS TÓXICOS IGUAL QUE EL HOMBRE.** Las diferencias son más del tipo cuantitativo que cualitativo.
 - Las **DIFERENCIAS INTERESPECIES** se deben a diferencias de toxicocinética y de biotransformación.
 - Existe una correlación lineal entre el logaritmo del peso corporal medio de la especie y el logaritmo de la DL50 de cada tóxico (**RELACIÓN ALOMÉTRICA**).
 - Debe considerarse que los estudios de toxicidad animal solo consideran datos que corresponden a “signos”. La presencia de manifestaciones subjetivas, denominadas **SÍNTOMAS**, sólo puede ser evaluado en el ser humano.
- 

ESTIMACIÓN DE RIESGO

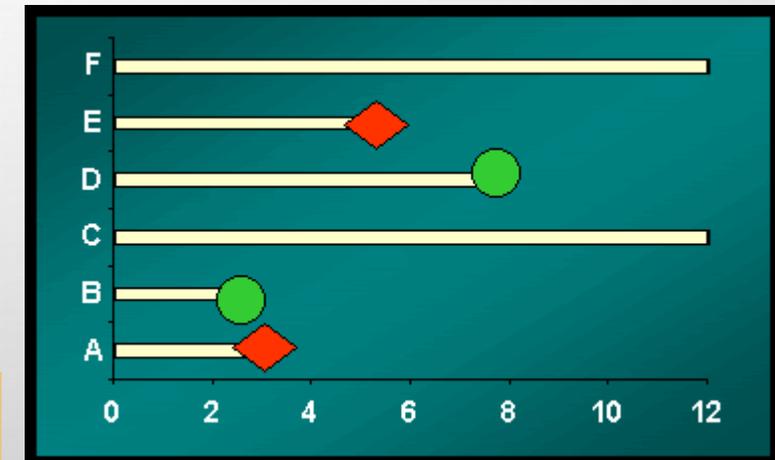


LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD TIENEN DOS OBJETIVOS FUNDAMENTALES...



1. CONOCER LOS MECANISMOS RELACIONADOS A LA TOXICIDAD

2. EVALUAR EL RIESGO DE LA INCIDENCIA SOBRE LAS POBLACIONES



DETERMINACIÓN DE RIESGO: identificación y cuantificación de posibles daños determinados por tóxicos.

ESTIMACIÓN DEL RIESGO: es la relación que se establece entre las curvas dosis-respuesta de un tóxico y la probabilidad de exposición a la que está expuesta la población.



FACTORES DE SEGURIDAD

AL EXTRAPOLAR LOS RESULTADOS DE TOXICIDAD OBTENIDOS EN ANIMALES AL HOMBRE; O BIEN, DATOS DE UN PEQUEÑO NÚMERO DE INDIVIDUOS A UNA GRAN POBLACIÓN ES NECESARIO CONSIDERAR LA APLICACIÓN DE **FACTORES DE SEGURIDAD**.

Se han propuesto varios procedimientos:

- **Regla del peso corporal.**
- **Método *probit*.**
- **Modelo del impacto singular.**

REGLAMENTACIÓN DE LA EXPERIMENTACIÓN TOXICOLÓGICA

Existen normativas legales que afectan a la experimentación toxicológica. La legislación internacional requiere que cualquier nueva sustancia sea caracterizada desde un punto de vista físico químico, analítica, toxicológica y ecotoxicológica.



OECD Home

About

Countries ▾

Topics ▾

Las guías para el estudio toxicológico mejor aceptadas alrededor del mundo son las determinadas por la OECD...

[OECD Home](#) > [Chemical safety and biosafety](#) > [Testing of chemicals](#) > OECD Test Guidelines for the Chemicals

OECD Test Guidelines for the Chemicals

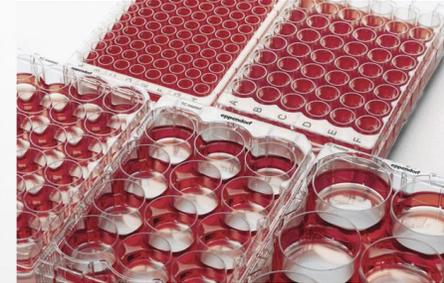
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en

VIDEOS COMPLEMENTARIOS:

Título: “Determinación del Límite Máximo de Residuos (LMR)”

link: <https://www.youtube.com/watch?v=pZvuhgiF0q0>

Resumen: El video plantea en forma clara, concisa y didáctica la importancia del establecimiento de LMR y su relación con la toxicidad humana.



VIDEOS COMPLEMENTARIOS:

Título: “Citotoxicidad”

link: <https://www.youtube.com/watch?v=4EMa8pSB6Es>

Resumen: EXCELENTE descripción general de los estudios de toxicidad realizados en cultivos celulares (citotoxicidad). Además, se presenta un contraste muy preciso de los alcances de los estudio *in vitro* en la estimación de la toxicidad.





VIDEOS COMPLEMENTARIOS:

Título: “Evaluación de la toxicidad del extracto del Chichipince”

link: <https://www.youtube.com/watch?v=A8xPOzVSsrw>

Resumen: El vídeo presenta el resumen de una investigación realizada en Ecuador para validar científicamente los reportes folclóricos de las propiedades de una planta medicinal. A partir del minuto 17’ se explican y presentan los resultados de los estudios de la toxicidad oral en ratones de laboratorio.



VIDEOS COMPLEMENTARIOS:

Título: “Ames Test”

link: <https://www.youtube.com/watch?v=9sCHHD5dqy0>

Resumen: Descripción del Test de Ames y sus aplicaciones. El video es en inglés pero está subtulado.



VIDEOS COMPLEMENTARIOS:

Título: “El modelado molecular, la química computacional y sus aplicaciones”

link: <https://www.youtube.com/watch?v=YGXqZLyMs48>

Resumen: Descripción de los principales métodos computacionales (modelado *in silico*) para predecir interacciones biológicas. A partir del minuto 20' se presentan los ejemplos de toxicidad en distintos sistemas biológicos.

