

Toxicología química: bases y aplicaciones



Miriam Beatriz Virgolini
(Directora)



TOXICOLOGÍA QUÍMICA: BASES Y APLICACIONES

Miriam Beatriz Virgolini
(Directora)



Universidad
Nacional
de Córdoba

Autoridades UNC

Rector

Mgter. Jhon Boretto

Vicerrectora

Mgter. Mariela Marchisio

Secretario General

Ing. Daniel Lago

Prosecretaria General

Dra. Ing. Agr. Paola Andrea Campitelli

Director de Editorial de la UNC

Dr. Marcelo Bernal

Toxicología Química: bases y aplicaciones / Miriam Beatriz Virgolini ... [et al.]; dirigido por Miriam Beatriz Virgolini. - 1a ed - Córdoba: Editorial de la UNC, 2022.
Libro digital, PDF - (Ciencias / Salud)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-987-707-240-2

1. Toxicología. 2. Intoxicación. I. Virgolini, Miriam Beatriz, dir.
CDD 615.9001

Diseño de colección y portada: **Lorena Díaz**

Diagramación: **Marco J. Lio**

Edición: **Juan M. Conforte**

Coordinación editorial: **Lorena Díaz**

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723
Universidad Nacional de Córdoba, 2022



Este libro está dedicado al Bioquímico Especialista en Toxicología Cristian Hansen (1965-2018), querido compañero y colega. Inmenso docente, formador de una generación de especialistas que compartieron con él la pasión por el estudio de la Toxicología. Generoso con sus conocimientos, fue inspirador para quienes compartimos con él tantos años de docencia e investigación.

Te fuiste joven amigo, aunque tu ángel sigue por los pasillos de los laboratorios y aulas que te vieron ejercer tu querida profesión.

Tu legado seguirá siempre en la memoria de quienes compartimos tu paso por este tiempo y espacio.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas	13
Preliminares	26
Prólogo	30
Parte 1. Principios generales	33
Capítulo 1. Introducción	
<i>Samanta Andrea Martínez</i>	34
Definición y objetivos de la Toxicología	34
Desarrollo histórico de la Toxicología como disciplina	35
Áreas de la Toxicología	40
Principales campos de aplicación	44
Conceptos básicos de Toxicología	45
Interacciones entre sustancias químicas	50
Capítulo 2. Toxicocinética y toxicodinamia	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	53
Introducción	53
Exposición	53
Toxicocinética	56
Toxicodinamia	70
Conclusiones	84

Capítulo 3. Biotransformación de xenobióticos	
<i>Pedro Armando y Cecilia Gallego</i>	85
Introducción	85
Principios generales	86
Reacciones de Fase I	93
Reacciones de Fase II	113
Implicancias de la biotransformación en el desarrollo de fármacos	122
Interacciones entre xenobióticos	127
Metabolómica	137
Capítulo 4. Valoración del riesgo	
<i>María Constanza Paz</i>	139
Introducción	139
Objetivos de la evaluación del riesgo	142
Pasos a seguir en la evaluación de un riesgo	144
Pruebas de toxicidad	155
Nuevas tecnologías en la valoración de medicamentos	172
Conclusiones	177
Parte 2. Agentes toxicos	178
Capítulo 1. Clasificación	
<i>Miriam Beatriz Virgolini y Julieta Soledad Borello</i>	179
Gases, solventes y vapores. <i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	183
Tóxicos metálicos. <i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	189
Plaguicidas. <i>Julieta Soledad Borello</i>	201
Anexo	222
Capítulo 2. Monóxido de carbono	
<i>Inés González y Héctor Andrés Suárez</i>	225
Historia	225
Epidemiología	226
Etiología de la intoxicación por CO	228
Patogenia	232
Diagnóstico	238

Investigación toxicológica	247
Tratamiento	257
Capítulo 3. Compuestos cianurados	
<i>Inés González y Héctor Andrés Suárez</i>	259
Historia	259
Epidemiología	260
Etiología de la intoxicación por cianuro	261
Etiología médico-legal	265
Patogenia	266
Diagnóstico	273
Anatomía patológica	278
Investigación toxicológica	278
Tratamiento	291
Capítulo 4. Alcoholes y glicoles	
<i>Mara Soledad Mattalloni</i>	294
Alcohol etílico	294
Metanol	334
Etilenglicol	342
Propilenglicol	349
Capítulo 5. Hidrocarburos	
<i>Patricia Antonia Lucero</i>	352
Introducción	352
Hidrocarburos saturados	353
Hidrocarburos aromáticos	359
Hidrocarburos halogenados	366
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	371
Capítulo 6. Plomo	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	374
Propiedades físicas y químicas	374
Historia y epidemiología	374
Fuentes de contaminación y exposición	376

Toxicocinética	382
Mecanismo de acción	386
Efectos tóxicos	388
Diagnóstico	395
Valores de referencia	398
Tratamiento	401
 Capítulo 7. Arsénico	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	405
Historia	405
Fuentes de exposición	408
Formas químicas y fuentes de intoxicación	411
Toxicidad	415
Mecanismo de acción	415
Toxicocinética	417
Efectos tóxicos	420
Tratamiento	424
Indicadores biológicos	425
Valores de referencia	427
Arsina	428
 Capítulo 8. Mercurio	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	430
Historia	430
Formas químicas y fuentes de exposición	432
Toxicocinética	434
Propiedades químicas y mecanismo de acción	436
Toxicidad	437
Tratamiento	440
Diagnóstico	442
Valores de referencia	443
 Capítulo 9. Cadmio	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	445
Fuentes de exposición	445

Toxicocinética	447
Mecanismo de acción	449
Toxicidad	449
Diagnóstico	452
Valores de referencia	453
Tratamiento	455
 Capítulo 10. Cromo	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	456
Fuentes de exposición	457
Toxicocinética	458
Mecanismo de acción	460
Tratamiento	463
Diagnóstico	463
Valores de referencia	465
 Capítulo 11. Manganeso	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	467
Usos y fuentes de exposición	467
Farmacología y fisiología	468
Toxicocinética	469
Mecanismo de acción	471
Toxicidad	472
Diagnóstico	475
Valores de referencia	476
Tratamiento	477
 Capítulo 12. Otros metales esenciales	
<i>Miriam Beatriz Virgolini</i>	478
Calcio	479
Potasio	479
Sodio	479
Magnesio	480
Hierro	480
Zinc	480

Cobre	481
Manganeso	481
Molibdeno	481
Cobalto	482
Estaño	482
Cromo	482
Capítulo 13. Insecticidas	
<i>Julietta Soledad Borello</i>	483
Introducción	483
Compuestos organofosforados	484
Carbamatos	500
Piretroides	503
Compuestos organoclorados	511
Otros insecticidas	521
Capítulo 14. Herbicidas	
<i>Patricia Antonia Lucero</i>	526
Introducción	526
Herbicidas clorofenólicos o fenoxiácidos	529
Glifosato	535
Triazinas	539
Bipiridilos cuaternarios	541
Capítulo 15. Rodenticidas	
<i>Patricia Antonia Lucero</i>	545
Introducción	545
Estricnina	547
Talio	550
Anticoagulantes	554
Capítulo 16. Fungicidas	
<i>Patricia Antonia Lucero</i>	560
Introducción	560
Ditiocarbamatos	564

Benzimidazoles	567
Estrobirulinas	569
Triazoles	573
Ftalimidas	575
Fungicidas inorgánicos	576
Resistencia	579
Parte 3. Aplicaciones de la toxicología	580
Capítulo 1. Toxicología experimental	
<i>Bethania Mongi-Bragato</i>	581
Fuentes del conocimiento toxicológico	581
El método científico	582
Tipos de investigación en Toxicología experimental	584
Diseño y componentes de los modelos toxicológicos experimentales	587
Alternativas en la experimentación animal	602
Métodos alternativos: toxicidad <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	606
Métodos de biología celular y molecular	609
Estudios neuroquímicos	615
Estudios conductuales	618
Capítulo 2. Toxicología forense	
<i>Samanta Andrea Martínez</i>	631
Introducción	631
Etapa pre analítica	632
Etapa analítica	647
Etapa post analítica	649
Capítulo 3. Toxicología analítica	
<i>Cristian Hansen, R. Sebastián Tisocco y Gamaliel Zar</i>	652
Introducción	652
Preparación de muestras	653
Técnicas de detección/identificación	659
Métodos de cuantificación	662

Capítulo 4. Toxicología clínica	
<i>Nilda Gait</i>	678
Introducción	678
Intoxicaciones medicamentosas	687
Conclusión	722
Sustancias de consumo	722
Intoxicaciones por cáusticos	751
Capítulo 5. Toxinología	
<i>Ruth Stella Maris Llebeili</i>	759
Escorpionismo	759
Aracneísmo	770
Ofidismo	787
Bibliografía	809
Sobre los autores	860

CAPÍTULO 4

VALORACIÓN DEL RIESGO

María Constanza Paz

Introducción

Existen distintas maneras de clasificar las áreas de la Toxicología, este capítulo se centra en la clasificación en función del modo de abordar el hecho tóxico, lo cual divide a la toxicología en tres áreas, Toxicología descriptiva, experimental o mecanística y regulatoria.

Como ha sido descripto previamente en este texto, las dos primeras se encargan de realizar las pruebas de toxicidad para evaluar la seguridad de una sustancia química e identificar los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares, mediante los cuales ejerce sus efectos tóxicos. La Toxicología regulatoria decide, en función de los datos aportados por la Toxicología descriptiva y mecanística, si el riesgo de un fármaco u otra sustancia química es lo suficientemente bajo como para ser utilizado o comercializado. A continuación, se definen conceptos relevantes del tema a tratar en este capítulo.

El riesgo es la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo. La valoración del riesgo es el proceso por el cual se recaba información disponible sobre los efectos tóxicos de una sustancia química o situación (caracterización) y se determina el riesgo posible en relación a la exposición.

El objetivo de la valoración del riesgo tóxico es estimar la probabilidad que tiene un agente de producir efectos tóxicos en el organismo humano. Se trata de un proceso largo y complejo que se realiza siguiendo una serie de pasos, contenidos en un libro del Consejo Nacional de Investigación

(NRC) de EE.UU., llamado *El libro rojo* (del inglés *Red Book*). Si bien los principios del proceso son los mismos, la metodología a seguir difiere según sean tóxicos originados por sustancias químicas o agentes físicos que actúan sobre el hombre o el ecosistema (ecotóxico). A medida que se aumentan los datos, respecto a la sustancia o situación evaluada y a partir de las observaciones realizadas tanto en animales como en humanos, se progresiva desde una situación de completa incertidumbre a otra en que la incertidumbre disminuye. Si los datos provienen de ensayos en humanos, ya sean por ensayos clínicos o estudios epidemiológicos, tendrán mayor relevancia que aquellos que derivan de ensayos en animales (preclínicos), los cuales suponen extrapolaciones que conllevan mayor incerteza.

Es importante considerar la percepción del riesgo, que no es igual en todas las situaciones. Aunque los datos existentes para la mayoría de los tóxicos son escasos, es importante tener en cuenta que para muchos agentes puede darse alguna de las siguientes situaciones. Puede suceder que la población general no esté nunca expuesta a ellos (por ej. un tóxico de laboratorio que no accede al medio ambiente) o bien, la exposición ocurre a muy bajas concentraciones (por debajo de los niveles tóxicos). Además, los problemas toxicológicos son muy diferentes según la región o la época, lo que en un país constituye un verdadero problema, no lo es en otro, o lo que en un momento histórico fue una amenaza para la salud pública deja de serlo por la adopción de medidas preventivas una vez reconocido el peligro. La percepción del riesgo es también diferente en distintas sociedades, lo que puede ser inaceptable para un grupo puede ser tolerable para otros.

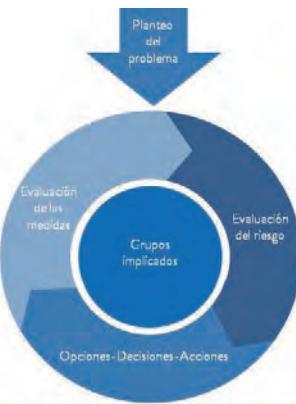
Surge entonces, la necesidad de proporcionar una base científica para mantener el riesgo dentro de niveles aceptables, asociados a un grado de incerteza también aceptable. Es la ciencia toxicológica la encargada de proporcionar dichas bases.

En función de las diferencias en la percepción del riesgo, es importante considerar dos conceptos fundamentales planteados por la Comisión

de valoración y gestión del riesgo de EE.UU., en primer lugar, situar el problema o asunto ambiental en un contexto ecológico o sanitario, y por otra parte, involucrar activamente a los grupos interesados pertinentes.

La evaluación del riesgo es una herramienta para obtener conclusiones de fácil comprensión a partir de los conocimientos científicos. Es una metodología que sirve de apoyo a los diferentes estamentos políticos, para la toma de decisiones que tendrán repercusión en la salud pública, y que, a su vez, deberán ser comprendidas por la sociedad en general. Luego de la evaluación existe una etapa de gestión, proceso mediante el cual se toman las decisiones políticas necesarias para controlar los peligros que han sido identificados en la fase anterior. En esta etapa, no sólo se tienen en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación del riesgo, sino también una serie de factores adicionales y frecuentemente contrapuestos, los cuales incluyen la preocupación social, intereses económicos, limitaciones legales, el binomio costo-beneficio, implicancias políticas, entre otros; para luego tomar una decisión final que supone la elaboración de legislación y medidas de control. Finalmente, la última etapa involucra la comunicación, proceso por el cual la información sobre el riesgo, obtenida tanto por la evaluación y la gestión del mismo, se hace comprensible para los distintos grupos colectivos sociales, sean legisladores, jueces, trabajadores, ecologistas, empresarios, etc. Es de gran importancia en esta etapa, estar atento a los temores, impresiones, prioridades y soluciones propuestos por cada uno de los grupos interesados. En esta etapa es conveniente evitar alarma la población, es esencial la función del toxicólogo como la voz de la razón presentando una visión balanceada del riesgo y beneficios y planteando posibles alternativas. Esta última tarea, es esencialmente educacional y debería llegar a todos los niveles educativos, inclusive al público en general.

En la figura 1 se muestran las distintas partes que componen la gestión de un riesgo representado de forma circular mostrando la relación directa de una etapa con la otra y la continuidad en el tiempo de este proceso.



1. Formular el problema en un contexto ecológico o sanitario
2. Analizar el riesgo
3. Definir las opciones
4. Decidir las medidas para disminuir el riesgo
5. Aplicar las medidas
6. Evaluar la eficacia de las acciones llevadas a cabo

Figura 1. Pasos a seguir en la gestión de un riesgo (Autora: María Constanza Paz).

Objetivos de la evaluación del riesgo

Los objetivos que plantea la evaluación del riesgo son los siguientes:

1. Establecer un equilibrio entre riesgos-beneficios. No existe ningún parámetro cualitativo ni cuantitativo absoluto que permita decidir si una sustancia es aceptable para uso humano, exclusivamente en función de su toxicidad, siempre es necesario evaluar si el riesgo es aceptable en función del beneficio que la sustancia en estudio aporte. Claros ejemplos son los fármacos, más específicamente los antineoplásicos, dado que el riesgo de su uso en humanos es muy elevado, pero en muchas situaciones son una opción para salvar vidas. Otro ejemplo posible a citar son los pesticidas, sustancias con potencial tóxico, pero necesarias en muchos casos para evitar la pérdida de alimentos, o bien para evitar que plagas rurales ingresen a zonas urbanas, dada la actual cercanía del campo y la ciudad.

2. Establecer objetivos para los niveles de riesgo. Se refiere a establecer límites aceptables en beneficio de la población y el ambiente. Esto es de gran importancia, sobre todo frente a sustancias con potencial tóxico cuyo valor de concentración no pueden llevarse a cero, como por ejemplo tóxicos alimenticios, ya sean naturales o incluso los aditivos, necesarios en muchas circunstancias para evitar otros efectos perjudiciales en la salud humana (por ejemplo, el uso de nitratos para impedir el crecimiento de la toxina botulínica en las carnes). Lo mismo sucede con los contaminantes del agua, en muchos casos imposible de eliminar por completo, como sucede con el arsénico. En estas circunstancias, es de gran importancia poder establecer objetivos claros a alcanzar en beneficio de la salud pública.
3. Establecer prioridades para las actividades del programa. Dichas prioridades serán diferentes para cada grupo involucrado, ya sean los fabricantes de la sustancia, las organizaciones medioambientales, consumidores u organismos reguladores, siendo estos últimos los que debieran ser más imparciales y regular en beneficio siempre de la salud. Como ejemplo se podría considerar la siguiente situación: el interés de una fábrica de agroquímicos por establecerse en una localidad y producir pesticidas, necesarios seguramente para el control de plagas rurales, pero quizás la población no lo vea de igual manera, y posiblemente las organizaciones protecciónistas del medio ambiente no lo aprueben; los organismos de regulación deberán tener una mirada objetiva de la situación y organismos gubernamentales pueden también plantear la necesidad de generar puestos de trabajo. Observando esta situación, podemos fácilmente darnos cuenta que las prioridades de cada grupo involucrado serán diferentes, por lo que es fundamental considerarlas a todas y establecer prioridades comunes, siempre en función del beneficio de la salud humana y medioambiental.

4. Calcular el riesgo residual y el grado de disminución del riesgo original luego de adoptar las medidas. Esto indica que el proceso es dinámico, debiendo existir un control y una evaluación permanente del riesgo en estudio.

Pasos a seguir en la evaluación de un riesgo

Si bien, los riesgos conocidos son diversos e involucran tanto sustancias químicas como situaciones físicas, en este capítulo se hará referencia a las primeras como objeto de estudio.

En una evaluación del riesgo se requiere información cualitativa sobre la consistencia de las pruebas y la naturaleza de las consecuencias, así como una valoración cuantitativa de las exposiciones, teniendo en cuenta, los factores de susceptibilidad del huésped y la magnitud potencial del riesgo. Para caracterizar un riesgo se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Identificación del riesgo: determinar los efectos adversos que una sustancia química puede causar.
2. Evaluación de la exposición: establecer las concentraciones o dosis a las que está expuesta la población.
3. Evaluación de la dosis-respuesta: evaluar la dosis o nivel de exposición a una sustancia por parte de la población.
4. Caracterización del riesgo: en la práctica, estas distintas fases enumeradas no se realizan de forma secuencial, sino que se van completando simultáneamente a medida que se obtienen datos experimentales, tanto *in vitro*, como preclínicos en animales de experimentación y en humanos ya sea mediante estudios clínicos o epidemiológicos. Finalmente, integrando todos los datos obtenidos en los pasos anteriores se logra caracterizar el riesgo, es decir, estimar la incidencia y la severidad de los efectos adversos en la población por la exposición al peligro.

Identificación del riesgo

Para la identificación del riesgo asociado a una sustancia se realizan distintos estudios o test de toxicidad que se nombran a continuación y se describen en el punto 4 de este capítulo:

- a. Evaluación de las características físicas y químicas de la sustancia como: estructura, solubilidad, pH, estabilidad, electrofilia, volatilidad, reactividad química.
- b. Evaluación de la relación estructura-actividad, para lo que existen distintos métodos computacionales como, SAR (del inglés *structure-activity relationships*), QSAR (del inglés *quantitative structure-activity relationships*) o 3D-QSAR (del inglés *quantitative structure-activity relationships in three dimensions*), con los que se puede predecir cualitativa o cuantitativamente, las respuestas de distintos compuestos, o bien diseñar compuestos para que tengan un efecto determinado.
- c. Pruebas *in vitro* y a corto plazo, principalmente para el estudio del potencial de mutagenicidad (test de Ames), aunque en la actualidad se utilizan estudios *in vitro* también para evaluar otros efectos tóxicos de sustancias de uso tópico en cultivo de queratinocitos o de células de la córnea.
- d. Bioensayos en animales de experimentación: ensayos preclínicos.
- e. Ensayos en humanos: ensayos clínicos.

Evaluación de la exposición

Proceso por el que se determina la manera a través de la cual individuos contactan con una sustancia peligrosa, con qué frecuencia, durante cuánto tiempo y la cantidad de dicha sustancia. Es la evaluación cuantitativa de la cantidad de químico a la cual los individuos pueden ser expuestos bajo condiciones específicas. Una premisa importante a considerar, es que el riesgo no existe en ausencia de exposición.

Los componentes básicos a evaluar son: la fuente u origen del compuesto, el mecanismo de liberación, desprendimiento y transporte de la sustancia, las vías de contacto (oral, dérmica, respiratoria, etc.), magnitud, duración y frecuencia del contacto y el área geográfica del contacto.

Los parámetros a medir cuando se realiza una evaluación de exposición son los siguientes:

Concentración: cantidad de sustancia presente en un medio determinado, ya sea suelo, agua, aire, etc. Por ejemplo, la cantidad de monóxido de carbono por milímetro cúbico de aire.

Exposición: proceso por el que un individuo o población entran en contacto con una sustancia, ya sea mediante ingestión, inhalación, o contacto de la piel o los ojos. La exposición puede ser de corta duración (aguda), duración intermedia, o larga duración (crónica). Se la determina como la cantidad de sustancia en contacto (concentración x tiempo).

Dosis: cantidad de una sustancia por unidad de peso corporal, es decir que ingresa al organismo expuesto. La dosis interna o carga corporal representa la cantidad de sustancia por unidad de peso o volumen que ingresa en un organismo (absorción) o se incorpora a órganos y tejidos y se calcula multiplicando la DEE por la fracción absorbida en el cuerpo. La dosis biológicamente activa efectiva o activa es la dosis de un agente que interactúa con los receptores y que origina un efecto definido en un sistema dado. La DEE es una función de la concentración del agente tóxico en un medio físico donde las personas pueden entrar en contacto con el agente, del tiempo de exposición, y del comportamiento que conduce a dicha exposición.

La DEE calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{DEE} = \frac{C \times TC \times F \times D}{PC \times T}$$

DEE= dosis de exposición estimada (miligramos de contaminante/kg de peso corporal/día) a un contaminante a través de una vía concreta (oral, inhalatoria, dérmica). En el caso de la exposición oral, pueden darse exposiciones a través de múltiples alimentos, siendo necesario calcular la DEE para cada uno de ellos, y finalmente sumar la DEE para dicha vía.

C = concentración del contaminante en el medio contaminado (mg de contaminante /kg; μg de contaminante/ mm^3 , mg de contaminante/l).

TC = tasa promedio de contacto. Ingesta promedio diaria de un producto alimenticio o grupo de alimentos (kg/día); inhalación promedio de aire ($\text{mm}^3/\text{día}$), ingesta de agua diaria (l/día).

F = Frecuencia de exposición (días/año)

D= Duración de exposición (años)

PC = Peso corporal (kg)

t= Período de tiempo sobre el cual la exposición es promediada (días)

Se acuñó por vez primera el concepto de ingesta diaria admitida (IDA) para establecer umbrales máximos de exposición a aditivos en alimentos. La IDA se define como cantidad aproximada en miligramos de una sustancia expresada en relación al peso corporal que se puede ingerir a diario durante toda la vida de una persona, sin que llegue a representar un riesgo apreciable para la salud (efectos no cancerígenos). En el caso de los contaminantes, y otras sustancias cuya presencia en alimentos o agua de consumo humano no sigue una finalidad tecnológica justificada, se utiliza el término ingesta diaria tolerable (IDT).

Para determinar la ingesta diaria estimada (IDE) de una sustancia en un individuo, es decir, la exposición a una sustancia a lo largo de la vida, se utiliza la fórmula de DEE, considerando que la duración de la exposición se estima de 70 años, como promedio de años de vida. El valor obtenido se compara luego con el valor de IDA conocido para la sustancia en cuestión, para estimar así, si el consumo de dicha sustancia a lo largo de la vida del individuo se encuentra dentro de límites admisibles o tolerables.

Evaluación de la relación dosis-respuesta

La relación dosis-respuesta (D-R) representa el espectro de efectos en función de la exposición a distintas concentraciones de una sustancia, o bien, la relación entre la dosis y la magnitud del cambio biológico producido. Esta relación puede ser expresada en una gráfica que adopta siempre una forma constante.

Existen dos tipos de curvas que responden a dos formas de evaluación diferente de la relación D-R:

Individual o gradual (figura 2 A), la cual representa la respuesta de un individuo a varias dosis de una sustancia y muestra la intensidad del efecto. Las relaciones dosis-respuesta individuales se caracterizan por un aumento continuo relacionando la dosis con la severidad de la respuesta.

Cuantal (figura 2 B), que representa la distribución de las respuestas a dosis diferentes en una población de individuos, expresando la incidencia de un efecto. Ésta responde a la ley del todo o nada.

La pendiente de estas curvas es de gran implicancia, ya que indica si un efecto aumenta o disminuye y la velocidad del cambio en función de la concentración o dosis de la sustancia.



Figura 2 A. Representación gráfica de una curva D-R del tipo individual o gradual
(Autora María Constanza Paz)

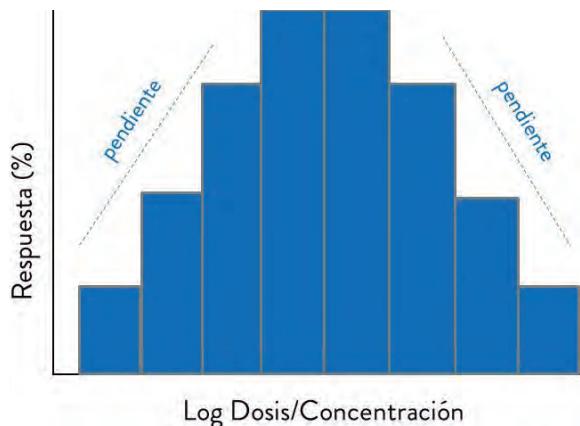


Figura 2 B. Representación gráfica de una curva D-R del tipo cuantal (Autora María Constanza Paz).

De gran implicancia en estudios de toxicidad es también la Dosis Umbral, dosis mínima eficaz de cualquier sustancia que provoca una respuesta de todo o nada, o bien, es la dosis por debajo de la cual la probabilidad de respuesta de un individuo es cero. Depende de la respuesta particular que se mida, de la sensibilidad del método y del número de sujetos estudiados (figura 3).

En un ensayo de valoración de riesgo es de gran importancia:

- Considerar los puntos de inflexión de las curvas más que valores absolutos umbrales, por ejemplo: acetaminofén a dosis bajas tiene escasa toxicidad, porque su metabolito tóxico es eliminado, mientras que, a dosis altas el glutatión es disminuido y el metabolito tóxico se acumula. Existen umbrales para la mayoría de los efectos tóxicos, aunque la variabilidad de respuesta entre los individuos, que cada dosis provoca en un patrón de respuestas, dificulta establecer una verdadera dosis sin efecto para cada sustancia, lo que genera puntos de inflexión en las curvas D-R. Estos puntos de inflexión que responden a la variabilidad entre los individuos, suelen deberse tanto a la saturación de las vías de biotransformación, de los puntos

de unión a proteínas o de los sitios de acción (receptores) de las moléculas de la sustancia, como a la disminución de cofactores intracelulares, necesarios para que el efecto se produzca.

– Considerar la severidad de efecto, ya que para los efectos carcinogénico, teratogénico e inmunosupresor se asume que carecen de umbral, es decir que la sustancia en estudio puede producir dichos efectos a cualquier dosis (figura 3).

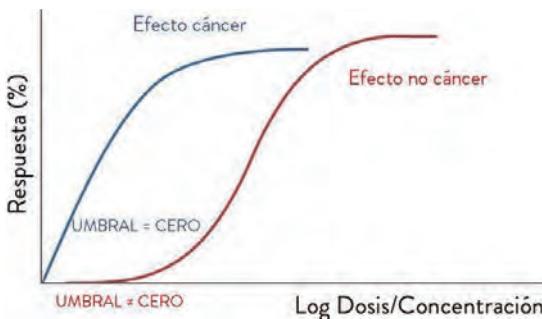


Figura 3. Representación gráfica de los tipos de efectos a ser considerados en la evaluación de un riesgo (Autora María Constanza Paz).

Consideraciones de la relación dosis-respuesta

Respecto a la relación D-R se asume:

- La existencia de una relación causal entre el material tóxico y la respuesta.
- La magnitud de la respuesta está relacionada a la dosis.
- La existencia de un receptor o sitio molecular para que el tóxico interactúe.
- La respuesta está relacionada a la concentración del tóxico.
- La concentración en el sitio de acción está relacionada a la dosis administrada.
- Existencia de un método cuantificable para determinar la toxicidad. Se debe elegir aquel efecto asociado con los eventos moleculares

que resultan de la exposición al tóxico. Pueden existir varias relaciones D-R y se elige aquella respuesta relevante para el efecto tóxico.

Utilidad de la relación dosis-respuesta

El ensayo de D-R define la relación entre las dosis y las respuestas asociadas, de la cual se pueden obtener parámetros experimentales de gran utilidad para la generación de las dosis necesarias para los primeros estudios en seres humanos (ensayos clínicos). A continuación, se definen dichos parámetros.

El NOAEL (del inglés *no observable adverse effect level*), es el mayor nivel de dosis testeada experimentalmente a la que no se observan efectos adversos.

El LOAEL (del inglés *lower observable adverse effect level*) es el menor nivel de dosis testeada experimentalmente a la que se observan efectos adversos.

La CRf (concentración de referencia) o DRf (dosis de referencia) es la concentración o dosis de cualquier sustancia que se puede utilizar en humanos, para pesticidas y aditivos para alimentos el parámetro utilizado es el índice de IDA.

Para la obtención de este valor se requiere realizar estudios preclínicos, es decir, ensayos en animales de experimentación, que serán descriptos más adelante, de los cuales se obtienen los parámetros NOAEL y el LOAEL que, divididos por un Factor de Seguridad (FS) dan lugar a la CRf o DRf.

La evaluación D-R permite la extrapolación de datos obtenidos en animales a humanos, además de la utilización de un amplio rango de alta a bajas dosis, realizar pruebas mediante diferentes vías de administración y la identificación de subpoblaciones más sensibles a la sustancia en estudio.

En la evaluación D-R los datos más relevantes son los obtenidos de estudios realizados en humanos, pero como las limitaciones son mayores, son necesarios los ensayos en animales. A partir de éstos se realiza

una extrapolación del animal al humano, lo que requiere conocer la toxicocinética y toxicodinámica de la sustancia en estudio en ambas especies. Dado que normalmente esto no sucede, al extrapolar los datos obtenidos en animales de experimentación se asume que:

- La farmacocinética y la farmacodinámica de la sustancia en estudio es igual en ambas especies.
- Que los efectos vistos en animales, extrapolados a los humanos serán iguales en todos ellos.

Se sabe que no es ésta la realidad, dada la variabilidad entre especies e intraespecie. Existe diferente susceptibilidad a las sustancias entre los seres humanos. Los resultados de los estudios y de los modelos toxicocinéticos usan valores de la media y sus desviaciones estándar de esa media para contemplar la variabilidad de los valores obtenidos. Sin embargo, existen valores atípicos que rara vez se investigan, además es muy difícil poder predecir si un paciente estará más expuesto a un riesgo que otros, y mucho más conocer la medida del riesgo. Las diferencias en la susceptibilidad son debidas a distintos factores inherentes al huésped como son: los factores genéticos, el sexo biológico, la edad, los hábitos de conducta (por ej. tabaco, alcohol), la existencia de enfermedades preexistentes, exposiciones coexistentes o al uso de medicación o medidas de protección.

Por esa razón se utilizan dos factores que van entre 10 a 100 cada uno, a fin de considerar cada una de estas variables, llamándose factor de modificación (FM) para la variabilidad interespecie y factor de incertezza (FI) para la diferente susceptibilidad dentro de la especie humana, ambos valores asumidos de acuerdo al nivel de riesgo que la sustancia en estudio tenga, se multiplican dando lugar al llamado FS. El FS divide el valor de NOAEL o LOAEL, según con el que se cuente, obtenidos experimentalmente. Este último valor es el que se utilizará para la determinación de la CRf o DRf que serán utilizadas en humanos para los primeros estudios clínicos (figura 4).

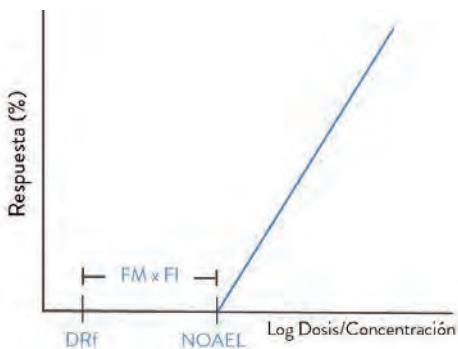


Figura 4. Representación gráfica del concepto de factor de seguridad (Autora María Constanza Paz).

Caracterización del riesgo

Para determinar cuantitativamente la probabilidad de que se produzca un efecto adverso en una población expuesta, la información cuantitativa de la exposición se combina con la información derivada de la etapa de evaluación dosis-respuesta. La estimación cuantitativa del riesgo se realiza de forma diferente para compuestos no carcinógenos y carcinógenos.

El margen de exposición (MOE del inglés *margin of exposure*) o margen de seguridad (MOS del inglés *margin of safety*) es la relación entre el nivel de NOAEL obtenido de los estudios de toxicología animal y el nivel o dosis de exposición humana prevista o estimada ($MOE = NOAEL/DEE$). Se usa comúnmente en la evaluación de riesgos para la salud humana (por ej. evaluación de la seguridad de un ingrediente cosmético o una impureza alimentaria). Para una sustancia química con umbrales de salud (es decir, no genotóxica ni cancerígena), valores bajos de MOS indican que las magnitudes de exposición de seres humanos están cerca de las cifras para la magnitud del NOAEL, en cambio un $MOE \geq 100$ generalmente se considera seguro. Este cálculo no incluye factores de seguridad; por ello, las agencias reguladoras han utilizado los valores de MOE menor a 100 como indicador de valoración adicional.

Existen situaciones en las que se requiere que el MOE sea superior a 100, las cuales se citan a continuación:

- si el NOAEL no se obtiene de estudios de toxicidad crónica y la exposición es crónica;
- si sólo se identificó un LOAEL, pero no un NOAEL;
- si existen incertidumbres sobre la calidad de los datos disponibles;
- si existe probabilidad de subestimación de la exposición;
- si existe la necesidad de proteger a grupos de personas sensibles.

En el caso de compuestos genotóxicos y cancerígenos, debe utilizar otra ecuación para calcular el MOE, ya que los valores NOAEL no se pueden identificar para esas sustancias. En general, un $MOE \geq 10.000$ se considera seguro. El cálculo involucra otro concepto cuyas siglas del inglés son BMD (del inglés *Benchmark Dose*), el cual se define como el límite inferior de incerteza en la determinación de la dosis de referencia ($MOE = BMD / DEE$).

Existe un concepto llamado Cociente de Riesgo (HQ del inglés *Hazard Quotient*) el cual representa la relación entre la exposición potencial a una sustancia y el nivel al que no se esperan efectos adversos. La Agencia de protección medioambiental (EPA del inglés *Environmental Protection Agency*) lo utiliza principalmente para evaluar los riesgos para la salud de los tóxicos del aire.

En función de este concepto el riesgo no carcinógeno se caracteriza calculando el cociente entre la dosis de exposición estimada (DEE) y la dosis umbral que, como se vio anteriormente, puede recibir diferentes nombres dependiendo de la agencia (IDA, DRf).

$$\text{Cociente de Riesgo (HQ)} = \frac{\text{DEE}}{\text{UMBRAL}} = \frac{\text{DEE}}{\text{DRf}}$$

Cuando el cociente HQ es menor a 1, se puede decir que no es probable que se produzcan efectos adversos, y el riesgo puede considerarse

despreciable. Cuando el cociente HQ es mayor a 1, y por tanto se supera el umbral de exposición seguro, debe considerarse la probabilidad de que se produzca un efecto adverso aun cuando nunca se puede hablar de probabilidad estadística. A este respecto hay que tener en cuenta que, si el valor HQ calculado para una sustancia A es 100, y el estimado para una sustancia B es 10, ello no significa matemáticamente que el riesgo sea 10 veces mayor para A que para B. Los umbrales de exposición seguros o DRfs, definidas para cada una de estas sustancias, pueden no estar referidas al mismo efecto crítico (órgano afectado, y gravedad del efecto). Igualmente, un HQ de 10 para una sustancia puede no tener el mismo significado que para otra sustancia con el mismo HQ. Por tanto, al aumentar las exposiciones por encima del umbral de protección ($HQ > 1$), la probabilidad de que se produzcan efectos adversos aumenta, pero no sabemos matemáticamente en qué medida.

Pruebas de toxicidad

Existen varias agencias involucradas en la regulación de tóxicos químicos, de las cuales, varias rigen a nivel mundial, como la FDA la EPA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA del inglés *European Medicines Agency*), entre otras. En nuestro país se puede citar a la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT).

No todas las pruebas son requeridos para todo químico potencialmente tóxico, esto depende del uso que se esté haciendo del mismo o del uso potencial propuesto, de la ruta de exposición y de las propiedades químicas y físicas de la sustancia.

Mediante los ensayos de toxicidad se puede evaluar la toxicocinética o toxicodinámica de la sustancia evaluada, pudiendo determinar su mecanismo de acción; se puede usar diferentes métodos ya sea para evaluar

carcinógenos genotóxicos (por ej. test de Ames), carcinógenos no genotóxicos y efectos no cancerígenos (por ej. métodos *in vivo*).

Es importante tener en cuenta que las pruebas de toxicidad no están concebidas para demostrar que una sustancia es segura, sino para identificar los efectos tóxicos asociados.

Evaluación de las características físicas y químicas

Si bien no constituye una prueba de toxicidad, tiene un gran valoración preliminar, esencial y útil para realizar comparaciones con otros tóxicos conocidos como probables amenazas, para determinar la estabilidad a la luz, calor, frío, agentes reductores u oxidantes y si sus productos de degradación también requieren ser evaluados. Así conocer la solubilidad lipídica o el coeficiente de partición octanol/agua estima preliminarmente el nivel de ingreso y persistencia de una sustancia en un organismo vivo; por ejemplo evaluar la presión de vapor puede indicar si el sistema respiratorio sería una vía posible de ingreso del tóxico.

Para sustancias químicas producidas para uso comercial es necesario realizar este tipo de evaluaciones en sustancias intermediarias de la síntesis o productos de degradación, ya que son posibles contaminantes en el producto final.

Para químicos que son liberados al ambiente, como por ejemplo los pesticidas, es necesario evaluar la exposición y destino ambiental, es decir, predecir una posible exposición en un evento en el que la sustancia puede ser tóxica. Para ello se evalúa el grado de degradación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en aceites de varios tipos, el grado de penetración (*leaching into*) a la superficie del agua desde aceites de varios tipos (lo que permite conocer el grado de hidrofobicidad de la sustancia), el grado de movimiento al agua subterránea, el efecto de factores físicos en la degradación del tóxico por fotólisis e hidrólisis e identificación de productos formados para indicar el grado de pérdida de amenaza o de

possible formación de productos peligrosos. También se realizan pruebas de acumulación en plantas y animales y el movimiento dentro del ecosistema lo que se estudia desde otra área de la Toxicología denominada Ecotoxicología.

Evaluación de la relación estructura-actividad

El enorme costo de evaluaciones multiespecies, multidosis y a lo largo de la vida completa de las especies para el estudio de efectos crónicos es un desafío en la valoración de amenazas relacionadas a todos los químicos con posible uso comercial. Por todo esto resulta de gran importancia el desarrollo de técnicas de alto rendimiento, que permitan investigar varias sustancias simultáneamente. Para ello las herramientas computacionales son de gran utilidad. Estas integran la matemática y modelos computacionales con aproximaciones moleculares, biológicas y químicas, lo que constituye la Bioinformática. Esta integración permite generar relaciones tanto cualitativas como cuantitativas con un poder predictivo muy útil en el desarrollo de nuevos fármacos o en la evaluación del riesgo a sustancias expuestas por el ambiente y la población. Existe un gran interés y esfuerzo en el desarrollo de estos sistemas computacionales llamados sistemas expertos que puedan predecir la toxicidad. Éstos se basan en el principio básico de que la estructura define la actividad y que la reacción de un producto químico con un sistema biológico es impulsada por su estructura molecular. Todos estos sistemas se basan en datos de toxicidad para otros productos químicos que se han ingresado en ellos y en el uso de reglas que se han diseñado a partir de esos datos, o a la luz de esos datos. Existen dos tipos de sistemas expertos basados en la relación estructura-actividad, uno es cuantitativo (QSAR) y el otro es cualitativo (SAR). Este último tipo se basa en el conocimiento y depende de la escritura de un lenguaje que describa el comportamiento de grupos estructurales que no tienen

contexto, pueden indicar únicamente la verosimilitud de los efectos y no ofrecen la comodidad posiblemente falaz de un número derivado de manera dudosa. Los sistemas QSAR usan algoritmos matemáticos para producir resultados cuantitativos. Los principios por los cuales un sistema QSAR funciona se basan en cálculos matemáticos, desde parámetros fisicoquímicos o relaciones usando modelos de regresión, o en conocimiento existente, por ejemplo, la asociación de un grupo o estructura química particular con un punto final específico como mutagenicidad o sensibilización. Mientras que el cálculo de bajo nivel de propagación en un nuevo territorio científico, no puede haber una confianza absoluta en que los errores cometidos al establecer las reglas o al ingresar datos no se magnifiquen con un nuevo cálculo repetido. Por otro lado, las reglas basadas en el conocimiento son solo eso y dependen del aporte de ese conocimiento experto y, hasta cierto punto, del juicio experto. Las reglas y los sistemas matemáticos son adecuados para el análisis QSAR y pueden producir probabilidades de que se realice un punto final o un valor para un nivel de dosis, como una dosis letal 50 (DL50) para toxicidad aguda, α 2-macroglobulina para nefropatía, teratogenicidad, entre otros puntos finales considerados. El beneficio de tales valores es que brindan un número que puede citarse en un contexto apropiado; la desventaja es que la precisión de tales números es a menudo altamente cuestionable y puede ser un poco mejor que el azar, especialmente en el caso de los niveles de dosis. Otro factor es que el proceso por el cual se producen dichos números suele ser opaco para el usuario y hay pocas posibilidades de racionalizar el resultado. En contraste, con los sistemas basados en el conocimiento (SAR), generalmente hay referencias bibliográficas a las que se puede acceder para respaldar una conclusión particular. Esto puede no ser tan reconfortante como un número, pero los resultados son probablemente más confiables ya que no dan una impresión potencialmente falsa de exactitud para la predicción.

Pruebas in vitro

Test de Ames

Es una prueba *in vitro* de mutagenicidad basado en el uso de bacterias, valiéndose de su elevada tasa de crecimiento. Se usa como test de pesquisa preliminar (*screening*) de sustancias químicas con potencial carcinogénico. La cepa de bacteria utilizada es la *Salmonella typhimurium*, la cual crece normalmente en un medio sin aminoácidos. Existe disponibilidad de cepas que no pueden crecer en ausencia de histidina dado por una mutación que induce un defecto metabólico en la biosíntesis de dicho aminoácido. Sustancias mutagénicas y presumiblemente carcinogénicos pueden causar mutaciones que generan que las cepas de bacterias modificadas recuperen la capacidad de sintetizar la histidina y, por lo tanto, de crecer en medios deficientes del aminoácido. Esta prueba también puede realizarse en presencia de una fracción hígado de rata como suministro de enzimas metabólicas para la detección de sustancias promutagénicas.

En la actualidad existen alternativas al uso animal en la evaluación de toxicidad ocular, como el uso de cultivo de células de la córnea o queratocitos para estudios en piel, ya que la EPA redujo de seis a tres el número de animales requeridos para este tipo de test *in vivo*, además de establecer un límite en el pH de las soluciones a evaluar en los animales de experimentación (pH no menor a 2, ni mayor a 10). Es importante considerar que son muchas las ventajas de los modelos *in vitro*, dado que son rápidos, económicos, reproducibles y eficiente, son de fácil manipulación, permitiendo predecir la interacción biológica y la toxicidad de la sustancia en estudio. Permiten relacionar respuestas del tóxico en células o tejidos animal y humano. Facilitan los estudios de estructura-actividad, dado que pueden probarse sustancias con modificaciones estructurales en distintos cultivos de células o tejidos. De todas maneras, también existen limitaciones de estos modelos como lo es la simplificación de sistemas biológicos que en la realidad son más complejos, por lo tanto, no son realistas, son estáticos y pueden sufrir

pérdida de propiedades y funciones respecto al sistema biológico real. En consecuencia son modelos de gran utilidad como pesquisa (*screening*) de sustancias posibles para ser luego evaluados en modelos *in vivo*.

Bioensayos en animales: ensayos preclínicos

Los efectos producidos por un compuesto en animales de laboratorio, adecuadamente evaluados son aplicables al hombre. Como se describió antes, se utilizan factores de seguridad apropiados que pueden ser aplicados para calcular D-R seguras para el hombre. En animales experimentales se puede realizar exposiciones a agentes tóxicos en altas dosis, lo que es un método válido para descubrir potenciales peligros para el hombre.

Las pruebas de toxicidad se determinan luego de administración por vía oral u otra vía relevante para la toxicidad de ese compuesto, teniendo también en cuenta el riesgo de contacto con la piel o inhalación.

Los bioensayos en animales son un requerimiento para las sustancias utilizadas como medicamentos y se describirán a continuación.

Toxicidad por dosis única o toxicidad aguda

La determinación de la letalidad es el índice de evaluación toxicológica inicial. Esta determinación es precisa, cuantal e inequívoca y se realiza siempre al estudiar una sustancia desconocida. Para calcular la letalidad de una sustancia se lleva a cabo la evaluación de la DL 50, es la dosis que causa la muerte en el 50 % de los animales evaluados experimentalmente. Este parámetro es obtenido de las curvas dosis-respuesta. En una distribución normal, la media \pm 1 desviación estándar representa el 50 % poblacional, la media \pm 2 desviaciones estándar el 84 % y la media \pm 3 desviaciones estándar el 95 %.

Se determina la DL50 y otros efectos tóxicos agudos luego de una o más vías de administración, en una o más especies, que establecen los distintos organismos, rata/ratón (EPA) y conejo/perro (FDA) y se estudia durante

14 días luego de la administración, se controla los animales a diario registrando todo tipo de alteración, incluso las muertes y se realizan autopsias.

Este tipo de estudios aporta el cálculo cuantitativo de la toxicidad de una sustancia (DL50), permite la identificación de órganos diana y establecer la reversibilidad de la respuesta. Además, las dosis probadas en el ensayo de toxicidad aguda son orientativas para definir los intervalos de dosis para otros estudios.

Es importante considerar que, si existe la probabilidad de exposición por vía dérmica o inhalación, se determina también la DL 50. La toxicidad dérmica aguda se evalúa en conejos, realizando un contacto dérmico con la sustancia durante 24 h y se estudian los animales durante 14 días. La inhalación aguda se evalúa por exposición de las vías aéreas a la sustancia en estudio durante 4 h.

Test de toxicidad local

Test de Draize o test de irritación dérmica: esta es una prueba que se lleva a cabo en seis conejos a los que se les realiza una aplicación de 0,5 g o 0,5 ml de la sustancia en estudio en un área (5 cm^2) de la piel intacta y rasurada. Se tapa con gasa la región expuesta a la droga y se colocan collares plásticos alrededor del cuello de los conejos para evitar que se rasquen o laman. Luego de cuatro a 24 hs, se retiran los parches y se observa el desarrollo de irritación, volviéndose a controlar luego de las 72 h, calculando finalmente un puntaje de irritación primaria.

Tipos de irritación:

La irritación primaria aguda es una reacción inflamatoria local no inmunológica caracterizada por eritema, edema e induración luego de una o repetidas aplicaciones de la sustancia química.

La irritación acumulada es aquella resultante de exposiciones repetidas del material que por sí mismo no causa irritación primaria aguda.

La corrosión se define como una acción química directa sobre la piel que da como resultado una desintegración y alteración irreversible

en el sitio de contacto. Las manifestaciones más importantes en los animales testeados son ulceraciones, necrosis y la formación de escaras.

La irritación fotoquímica inducida o fotoalergia consiste en una irritación primaria resultante de cambios moleculares fotoinducidos en la estructura de la sustancia química aplicada en la piel.

La sensibilización dérmica, es aquella que se produce por varios contactos con la sustancia química. Este tipo de evaluación es necesaria cuando la sustancia será utilizada mediante un contacto dérmico prolongado. Se realizan en cobayos múltiples aplicaciones durante dos a cuatro semanas, exponiendo luego la piel de los cobayos a concentraciones no irritantes de la sustancia y evaluando el desarrollo de respuestas eritematosas.

El acné es una erupción folicular producida en humanos conocido como cloracné, que se manifiesta con puntos negros en la cara y el cuello parecidos al acné de la pubertad.

El test de irritación ocular es una variante del test de Draize, se realiza por aplicación tópica, preferentemente en conejos albinos. La sustancia en estudio se aplica en el saco conjuntival de un ojo y a las 24 h de la aplicación se lava y se observa a diario durante tres días consecutivos si existe desarrollo de: opacidad corneal, reacción del iris por exposición a la luz, enrojecimiento de la conjuntiva, alteración en vasos sanguíneos. A los 21 días se evalúa la recuperación.

Dado que en la actualidad existen comités de ética que regulan el uso de animales de experimentación exigiendo como una de las premisas principales, la reducción del número de animales utilizados en los ensayos, se han desarrollado alternativas al uso animal para evaluar la irritación ocular o dérmica, mediante el uso de cultivo de células de la córnea o queratinocitos para estudios en piel. La EPA redujo de seis a tres el número de animales requeridos para este tipo de test *in vivo*, además de establecer un límite en el pH de las soluciones a testear en los animales de experimentación (pH no menor a 2, ni mayor a 10). Es importante considerar que son muchas las ventajas de los modelos *in vitro*, dado que

son rápidos, económicos, reproducibles y eficiente, son de fácil manipulación, permitiendo predecir la interacción biológica y la toxicidad de la sustancia en estudio. Permiten relacionar respuestas del tóxico en células o tejidos animal y humano. Facilitan los estudios de estructura-actividad, dado que pueden probarse sustancias con modificaciones estructurales en distintos cultivos de células o tejidos. Sin embargo, existen ciertas limitaciones de estos modelos principalmente la simplificación de sistemas biológicos que en la realidad son más complejos, por lo tanto, no son realistas, son estáticos y pueden sufrir pérdida de propiedades y funciones respecto al sistema biológico real. Por lo que son de gran utilidad como pesquisa (*screening*) de sustancias posibles para ser luego testeadas en modelos *in vivo*, los cuales, como se dijo anteriormente, son requisito para la evaluación de sustancias farmacológicas.

Si bien este tipo de pruebas en modelos animales son de naturaleza controvertida, la FDA las apoya indicando que a la fecha no existe una prueba aprobada científicamente que reemplace al test de Draize. Sin embargo, se han establecido variantes en la que utilizan anestésicos tópicos y no se permite la prueba *in vivo* de sustancias cuyas pruebas *in vitro* indiquen propiedades irritantes. El uso de este test ha declinado en los últimos años en EE.UU. y Europa y en la actualidad se continúa la búsqueda de nuevas alternativas.

La evaluación de toxicidad local es necesaria para establecer la seguridad también de ingredientes cosméticos, sin embargo, el 11 de marzo de 2009 se estableció como fecha límite para la prohibición para comercializar productos cosméticos cuya formulación final, ingredientes o combinaciones de ingredientes hayan sido experimentados en animales, por lo que consciente del trabajo y las prioridades en este campo, la Comisión Europea y las autoridades competentes continúan haciendo un esfuerzo para validar científicamente métodos alternativos que permitan llevar a cabo una rigurosa evaluación de la seguridad de los productos con fines cosméticos.

Si bien el método original de Draize, el cual data de los años 40, ha tenido diferentes adaptaciones a lo largo de los años, incluso consideraciones de reducción y refinamiento, se han desarrollado numerosos métodos para suplir los animales en los ensayos de irritación ocular y dérmica. Los métodos validados y aceptados son pocos en comparación con los métodos propuestos y no existe ningún método alternativo que pueda sustituir de forma única al ensayo con animales, por ello se tiene que utilizar una batería de ensayos y una estrategia para descartar efectos irritantes. Como ejemplo se puede nombrar algunos métodos para toxicidad ocular de tipo *ex vivo*, como el Ensayo de Opacidad Corneal en córnea aislada bovina y el Ensayo del Ojo Aislado de Pollo, otros *in vitro* como el Método de Pérdida de Fluoresceína para identificar corrosivos e irritantes severos (en monocapa de células de riñón canino Madyn-Darby) y para toxicidad dérmica, el Método de Corrosión Dérmica *in vitro* utilizando piel humana reconstituida, el Método de la Resistencia Eléctrica Transcutánea para valorar la corrosión de la piel (*ex vivo*) o el Ensayo de Ojo Aislado de Conejo. Es importante volver a aclarar que ningún método que utilice animales o derivados de los mismos está permitido para la valoración de riesgo de sustancias con fines cosméticos.

Toxicidad subaguda

En el ensayo de toxicidad subaguda se realizan administraciones repetidas una vez al día durante 14 días y se evalúan los animales luego de dicho período. Este ensayo, además de aportar otros órganos afectados por una administración de este tipo y las dosis que se utilizan para estudios siguientes.

Toxicidad subcrónica

En este tipo de estudio las administraciones son repetidas y se realizan a diario durante un total de 90 días. La toxicidad subcrónica permite establecer los parámetros LOAEL y NOAEL, además de identificar y

caracterizar la afección de los órganos luego de este tipo de administración. Se utilizan dos especies, según el organismo y tres dosis, alta (que genere una mortalidad menor al 10 %), intermedia y baja (sin efectos evidentes), los animales se observan una o dos veces por día para la detección de signos de toxicidad como cambios en el peso corporal, consumo de la dieta, cambios en el color de la piel, alteración de la respuesta cardiovascular o respiratoria, anormalidades conductuales, motoras, aparición de tumores, se registran las muertes y se realiza autopsia. Al finalizar el período de 90 días, se recoge la sangre para posterior análisis. La condición microscópica y grosera de alrededor de 15 a 20 órganos y el peso de los principales (12 órganos) son los evaluados.

Los análisis a realizar son:

- Hematología: hemoglobina, hematocrito, glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas, tiempo de coagulación, tiempo de protrombina.
- Química clínica: glucosa, calcio, potasio, urea, nitrógeno, aminoalanino-transferasa, aminoaspartatotransferasa, gamma-glutamiltranspeptidasa, sorbitoldehidrogenasa, lácticodehidrogenasa, alcalinofosfatasa, creatinina, bilirrubina, triglicéridos, colesterol, albúmina, globulina, proteínas totales.
- Orina: osmolaridad, pH, glucosa, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno.

Si no mueren antes, a los 90 días se sacrifican los animales y se evalúan.

LOAEL y NOAEL tienen implicancias regulatorias, por ejemplo, la EPA utiliza el NOAEL para calcular la dosis de referencia, que se usa para establecer niveles aceptables en determinados contaminantes.

Para las sustancias químicas que van a ser registradas como fármacos, los estudios subcrónicos y agudos deben realizarse antes que se apruebe la aplicación en la FDA. Cuando esto es aprobado comienzan las pruebas clínicas (Fase I, II, III) al mismo tiempo que comienzan estudios crónicos en animales de laboratorio.

Toxicidad crónica

La evaluación de toxicidad crónica difiere de la anterior en que las administraciones también son repetidas a diario, pero durante un período de entre seis meses a dos años, dependiendo del período al que estarán expuestos los seres humanos, por ejemplo, para un antimicrobiano propuesto a ser usado durante un período corto, seis de meses de administración en animales es suficiente; si el agente en estudio fuese un aditivo alimentario, lo requerido es un estudio de dos años.

Este tipo de ensayo permite evaluar toxicidad acumulada y potencial carcinogénico de la sustancia en estudio, comunicando la formación de tumores tanto benignos como malignos. Se utiliza como máxima dosis aquella que inhibe en un 10 % el aumento del peso corporal en los animales, la cual se denomina dosis máxima tolerada (DMT), la cual se obtiene de los estudios subcrónicos de 90 días. Se utiliza también un medio y un cuarto del valor de la DMT.

Toxicidad del desarrollo, reproductiva y teratogenicidad

La Toxicología del desarrollo estudia los efectos adversos sobre el organismo en desarrollo que resulta de la exposición al agente químico antes de la concepción, durante el desarrollo prenatal o postnatal hasta el momento de la pubertad.

La Teratología estudia los defectos inducidos durante el desarrollo entre la concepción y el nacimiento. La Toxicología reproductiva estudia la ocurrencia de efectos adversos sobre el sistema reproductivo del macho o la hembra que ocurre por exposición a agentes químicos.

Este tipo de estudios consta de tres segmentos o fases de evaluación, que se describen a continuación.

Fase I: test de performance reproductiva y fertilidad general.

Se tratan los animales adultos en período previo a la fertilización y opcionalmente se continúa en las hembras durante la implantación o en período de lactancia.

Se lleva a cabo en ratas con tres dosis diferentes (20 ratas por sexo y por dosis). A los machos se les administra la sustancia química durante 60 días y a las hembras 14 días antes de cruzarlas, pudiendo también administrar durante la gestación y la lactancia.

En los adultos se observa el desarrollo de huevos maduros y esperma, el porcentaje de hembras preñadas, el número de crías muertas y vivas, periodo de lactancia.

En los organismos en desarrollo se estudia el desarrollo fetal, la formación de órganos, el crecimiento intrauterino y postnatal, estudiando también al nacer, el peso, crecimiento, sobrevida, condiciones generales durante los primeros tres meses de vida, incluyendo estudios conductuales y de la función reproductiva.

Fase II: evaluación del potencial teratogénico.

Se estudia la hembra preñada durante el período de organogénesis (primer trimestre de la preñez), período en que los teratógenos son más efectivos. Se utilizan 12 conejos y 20 ratas por grupo, los cuales son expuestos a una de tres dosis durante la organogénesis (del día 6 al 15 en ratas y del día 6 al 18 en conejos). Los fetos se obtienen por cesárea un día antes de la fecha estimada de nacimiento (día 31 en conejos y 32 en ratas). Finalmente, se pesan y examinan los úteros de las madres. Se registran los fetos vivos, muertos o reabsorbidos. La mitad de la camada se utiliza para estudiar anomalías esqueléticas y la otra mitad para el estudio de tejidos blandos.

Fase III: estudio del período peri y postnatal.

Es una prueba compleja realizada desde el día 15 de gestación y durante la lactancia. Se evalúa el peso al nacer, la sobrevida, el crecimiento de las crías durante los primeros tres meses de vida.

Consiste en un estudio multigeneracional realizado para determinar el efecto de la sustancia evaluada sobre el sistema reproductivo.

Se administran tres dosis a grupos de 25 hembras y 25 machos después del destete (30 a 40 días de edad), a este grupo se lo llama Generación

F0. Se continúa la dosificación durante el apareamiento, gestación y lactancia, a las crías nacidas y que fueron expuestas en el útero, vía lactancia y continuando en la comida, se las llama Generación F1. Luego, 25 hembras y 25 machos F1 son cruzados para producir la Generación F2, la cual continúa expuesta al tóxico. Se observa el porcentaje de hembras preñadas F0 y F1, el número de éstas que llegan a término, tamaño de las camadas nacidas, números de abortos, número de crías vivas, pesos de las crías al nacer a los 4, 7, 14 y 21 días de edad, obteniéndose un índice de fertilidad, un índice de gestación, un índice de viabilidad y de lactancia.

Además se realizan estudios histopatológicos y de necropsia grosera en los padres (generaciones F0 y F1) fundamentalmente en los órganos reproductivos, al igual que se evalúan todas las crías destetadas.

También se llevan a cabo estudios de corto término mediante el cultivo de embriones, órganos o células de los distintos tejidos.

Estudio de mutagenicidad

La mutagenicidad se define como la capacidad de los químicos de causar cambios en el material genético del núcleo de células, de forma tal que los cambios se transmiten durante la división celular. Las mutaciones en diferentes tipos de células tienen consecuencias sustancialmente diferentes, las mutaciones en células germinales influyen la división meiótica y esto se transmite a futuras generaciones, las mutaciones somáticas no son hereditarias, pero pueden resultar en la muerte de células o transmisión de un defecto genético a otras células en el mismo tejido a través de división mitótica.

La iniciación de la carcinogénesis química ocurre con una mutagenesis, los test mutagénicos se utilizan para hacer una pesquisa (*screening*) de potenciales carcinógenos, para ello existen test cortos e *in vitro* como el test de Ames.

Es importante considerar que el diseño de un ensayo toxicológico preclínico debe permitir conocer todos los efectos tóxicos que la

sustancias en estudio puede producir, reproducir todas las condiciones evaluadas en los animales, en humanos (dosis, vías de administración, tipo de exposición, etc.) y estimar el riesgo para la especie humana, teniendo en cuenta los efectos con y sin umbral, los parámetros obtenidos experimentalmente y los factores de seguridad establecidos. Esto permite establecer niveles de dosis aceptables para ser administrados en humanos, es decir para iniciar los ensayos clínicos de la sustancia en estudio. Los métodos en animales proporcionan datos que, si bien son experimentales, son teóricos para humanos, por tanto, ningún método teórico para estimar el riesgo en humanos es infalible, aun habiendo testeado dosis altas, por lo que es de gran importancia la precaución y el seguimiento durante los primeros estudios clínicos.

Ensayos en humanos

Los ensayos en humanos pueden ser clínicos a doble ciego, es decir ni el médico, ni el paciente saben si está tomando el fármaco en estudio o el placebo o control, sólo puede realizarse con fines terapéutico. Otro tipo de estudios clínicos son los de casos aislados, para los que es muy difícil establecer la causa-efecto hasta que se ve afectado un gran número de la población (ejemplo de lo que sucedió en la década del 60 en Europa por efecto de la talidomida).

En caso de desarrollo de un medicamento nuevo, son varias las etapas a cumplir dentro del proceso de evaluación de dicha sustancia antes de que sea comercializado. Luego de los estudios preclínicos en animales las etapas que forman parte de los estudios clínicos ya realizando pruebas de la sustancia en estudio en seres humanos son las siguientes:

Etapa I: de 20 a 50 voluntarios sanos para reunir datos preliminares de los efectos del fármaco en estudio.

Etapa II: de 150 a 350 enfermos, para definir las recomendaciones sobre seguridad y posología.

Etapa III: de 250 a 4000 pacientes en grupos más heterogéneos, para determinar la seguridad y eficacia a corto plazo.

Etapa IV: Estudios posteriores a la aprobación (fármaco ya registrado por las agencias de seguridad de cada lugar) sobre determinados detalles de seguridad.

Una vez comercializado, el fármaco deja atrás el seguro y resguardado medio científico en el que discurren los ensayos clínicos para convertirse legalmente en un producto de consumo público. Lo más frecuente es que en ese momento sólo se haya comprobado la eficacia y seguridad a corto plazo del medicamento en un pequeño número de personas cuidadosamente seleccionadas. En ocasiones son apenas 500, y rara vez superan los 5.000, quienes han recibido el fármaco antes de su salida al mercado. Por tal razón es fundamental controlar la eficacia y seguridad que presentan en condiciones reales, una vez puestos a la venta, los tratamientos nuevos y todavía poco contrastados desde el punto de vista médico.

Resulta de gran importancia entonces, agregar una etapa posterior a la comercialización del medicamento llamada farmacovigilancia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como la ciencia y las actividades relativas a la detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos adversos de los medicamentos o cualquier otro problema relacionado con ellos. Es un elemento clave para que los sistemas de reglamentación farmacéutica, la práctica clínica y los programas de salud pública resulten eficaces. Episodios como la tragedia de la talidomida ponen de relieve la gran importancia de contar con sistemas eficaces de control de los medicamentos ya utilizados en la clínica y de una manera sostenida en el tiempo; por lo que la farmacovigilancia pone de manifiesto el concepto de proceso continuo dentro de la valoración de un riesgo.

Otros estudios posibles en humanos son los epidemiológicos, los cuales sirven para establecer la relación causal entre factores de riesgo

o la exposición y la enfermedad. Estos últimos se pueden clasificar en tres tipos:

1. De cohortes o prospectivos: estudian grupos de individuos elegidos en función de su exposición al agente en estudio (sanos) y se los evalúa para ver si desarrollan la enfermedad. Se comparan expuestos-no expuestos para determinar la incidencia de la enfermedad.
2. De casos y controles o retrospectivos: se seleccionan los individuos en función de la enfermedad y controles sanos pareados. Se comparan sanos- enfermos, sus historias de exposición para determinar factores de riesgo consistentes.
3. Transversales: evalúan grupos poblacionales para identificar factores de riesgo (exposición) y enfermedad, pero no son útiles para establecer relaciones causales. Determina prevalencia de enfermedad.

Los estudios epidemiológicos aportan datos orientativos, pero determinar una relación causal no puede establecerse mediante la utilización de uno solo de ellos. La epidemiología permite sugerir hipótesis que deberán comprobarse.

Existen limitaciones importantes de este tipo de estudios. Si el estudio es exploratorio generalmente las hipótesis son débiles. Las exposiciones estimadas son generalmente retrospectivas y asociadas a gran incertidumbre, en especial para aquellas enfermedades de latencia prolongada, es decir que las manifestaciones clínicas tardan bastante tiempo en aparecer. Normalmente las exposiciones a sustancias no son únicas, sobre todo cuando el estudio abarca períodos de semanas o incluso todo el ciclo de vida. La contribución de los hábitos de los individuos, como el tabaquismo, la dieta, etc., es difícil de clasificar de manera precisa. Existe variación también en la susceptibilidad de los distintos individuos. Sin embargo, a pesar de las limitaciones, los estudios epidemiológicos son de gran utilidad para la identificación de peligros y en ocasiones aportan información cuantitativa para caracterizar los datos. En los diseños de estudios de este tipo se debe valorar el poder de

detección, la idoneidad de las respuestas, la verificación de la evaluación de la exposición, factores de confusión y la posible aplicabilidad general de los resultados a otras poblaciones en riesgo. El poder de detección se calcula teniendo en cuenta el tamaño del estudio, la variabilidad, los límites de detección aceptados para las variables en estudio y el nivel de significación especificado.

Los recientes avances aportados por el Proyecto del Genoma Humano, la sofisticación de biomarcadores moleculares y la mejora en principios mecanicistas para las hipótesis epidemiológicas han permitido ampliar los conocimientos de verosimilitud biológica y trascendencia clínica. La Epidemiología molecular es un nuevo enfoque de los estudios de seres humanos que se basa en el uso de biomarcadores moleculares de exposición, de efecto y de susceptibilidad para lograr vincular más eficazmente los acontecimientos moleculares en la vía etiológica de la enfermedad en estudio.

Nuevas tecnologías en la valoración de medicamentos

La Toxicología, a pesar de su uso en la exploración de la mayoría de los mecanismos moleculares fundamentales de la acción de un tóxico, es una ciencia aplicada al servicio y las necesidades de la sociedad. Este servicio se logra mediante distintas formas, que incluyen la protección de la salud humana, la protección del medio ambiente, el desarrollo de químicos nuevos y seguros para uso clínico y ocupacional y la manufactura segura de productos de consumo ausentes de efectos tóxicos.

Como consecuencia del gran número de sustancias químicas que deben ser analizadas surge la necesidad del desarrollo de ensayos rápidos de alto rendimiento (*high-throughput assays*) con los que se pueda evaluar muchos químicos en forma simultánea. Dado el costo y las limitaciones éticas del uso de animales, no es posible la evaluación de todas las sustancias mediante ensayos *in vivo*, pudiendo utilizarse, sin duda, el

estudio de proteínas humanas y líneas celulares. En la actualidad están siendo desarrollados sistemas de testeo basados en el estudio cuantitativo de la relación estructura-actividad (QSAR), usando la ingeniería de líneas celulares humanas y las técnicas de genómica, proteómica, metabolómica, así como la bioinformática.

El éxito del proyecto de secuenciamiento del genoma humano completo junto al progreso del *International HapMap Project* para la identificación de polimorfismos en genes codificantes del genoma humano de enzimas que metabolizan xenobióticos y otras proteínas ha permitido clasificar poblaciones o individuos con un mayor riesgo a insultos químicos en particular. Esta posibilidad ha sido reforzada con bases moleculares gracias a los avances en las nuevas disciplinas como la genómica, metabolómica y la proteómica.

El futuro inmediato en la evaluación del riesgo se enfocará en la difícil, pero necesaria tarea de integrar los datos experimentales, obtenidos a distintos niveles, al proceso de evaluación del riesgo. Un desafío constante para los toxicólogos comprometidos con la valoración del riesgo o amenazas, es el riesgo proveniente de la mezcla de sustancias químicas. Tanto humanos como ecosistemas están expuestos a varios químicos a la vez. La lógica dicta el estudio de riesgo inicial de la toxicidad con la evaluación de cada químico individual. La solución a este problema planteado requerirá un trabajo considerable a todos los niveles, *in vivo* e *in vitro*, teniendo en cuenta la implicancia de las interacciones químicas en la expresión de la toxicidad, particularmente en la toxicidad crónica.

En la actualidad, gracias a los avances en las Ciencias Biológicas, el paradigma de las pruebas de toxicidad ha progresado en la última década desde las planteadas por el NRC de EE. UU. a partir del informe del año 2007. Se propone para la próxima generación de ciencia de riesgos incorporar metodologías de evaluación de riesgos adecuadas para el análisis de nuevos datos toxicológicos y de exposición, que dan como

resultado pautas de exposición humana. Se plantea a futuro, la evolución continua de las pruebas de toxicidad para fortalecer la evaluación de riesgos reglamentarios.

Toxicogenómica

La Toxicogenómica abarca el estudio de la interacción entre el genoma y las respuestas biológicas de los organismos expuestos a sustancias químicas.

Es el paso inicial en una aproximación mediante el uso de un sistema toxicológico que abarca el estudio a distintos niveles:

1. El perfil de expresión del ADN o genómica, del mensajero de ácido ribonucleico (ARNm) o transcriptómica, mediante el estudio de arreglos genéticos (del inglés *microarrays*).
2. El perfil de la expresión de las proteínas (proteómica), utilizando técnicas de separación como la electroforesis en dos dimensiones en gel de poliacrilamida y de identificación como la espectrometría de masa.
3. El perfil de metabolitos (metabolómica), identificando y cuantificando los mismos en sangre y orina por espectrometría de masa.
4. El perfil de fenómenos celulares ocasionados por el ambiente que regulan la expresión de los genes, independientemente del promotor (epigenómica).

Todas estas disciplinas, junto a la Bioinformática y a la Toxicología/patología convencional permiten dilucidar las interacciones entre genes y ambiente o la identificación de biomarcadores de toxicidad.

De esta manera, el mayor aporte de la Toxicogenómica es permitir entender los mecanismos que subyacen a los efectos tóxicos y explicar la relación entre el ambiente o químico estresor y la enfermedad humana.

Históricamente era posible el conocimiento de un gen a la vez, lo que permitió el desarrollo de ratones transgénicos y *knock-out*. Con el desarrollo de nuevas herramientas genómicas es posible establecer complejas

interacciones entre el fenotipo y el ambiente. De todas maneras, también es importante el análisis de los eventos no transcripcionales que ocurren en el proteoma (ej. fosforilación o glicosilación de proteínas) y el análisis de los productos resultantes, metabolomas y epigenomas (ej. modificación de histonas, metilación de la ADN).

La forma más común de variación genética es los llamados polimorfismos de nucleótidos simples o SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), los cuales se producen por sustitución de un solo par de bases en el ADN. Hasta el momento se han descubierto 2,8 millones, los cuales se encuentran registrados en una base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Estas nuevas metodologías son una alternativa al uso de gran cantidad de animales, si bien el uso de los mismos es un requerimiento por parte de los organismos de control (FDA, EPA) para la valoración de sustancias con fines farmacológicos. Estas técnicas pueden ser desarrolladas en tejidos congelados, permiten probar dosis muy altas para evaluar los efectos tóxicos, medias para determinar los efectos farmacológicos y bajas para determinar dosis sin efectos adversos, y relacionar dichos efectos con cambios en la expresión génica o proteica, en busca de biomarcadores de toxicidad, pudiendo caracterizar los mecanismos de toxicidad a nivel molecular, permitiendo una extrapolación más certera al ser humano e incluso poder identificar poblaciones más sensibles o más resistentes a una sustancia (mediante la identificación de SNPs).

Exposómica

El estudio del exposoma tiene el objetivo de documentar la totalidad de las exposiciones humanas a lo largo del curso de la vida. Este campo ha avanzado rápidamente en los últimos años, aunque carece aún de aplicación práctica para la evaluación de riesgos, en particular para la salud de los niños.

Los esfuerzos actuales en valorar la exposición se enfocan predominantemente en el objetivo de documentar exposiciones humanas totales a lo largo del tiempo aunque, consecuentemente, el campo aún no ha

abordado cómo aplicar la información del exposoma a la evaluación de riesgos y las regulaciones de salud pública.

Recientemente, al explorar el valor del exposoma en la epidemiología perinatal y reproductiva, se destacó la importancia de evaluar las exposiciones durante ventanas críticas de susceptibilidad bien definidas que pueden vincularse con enfermedades de la vida posterior. Durante estas ventanas, las personas son más vulnerables a los efectos de las exposiciones químicas. Por ejemplo, la talidomida causa daño al embrión cuando la exposición ocurre entre los días 20 y 36 después de la fertilización, que coincide con un período importante de desarrollo embrionario; no se ha encontrado que las exposiciones antes o después de este período causen embriotoxicidad. Por lo tanto, la suma de las exposiciones durante dichos períodos críticos, en lugar de la suma de las exposiciones a lo largo de todo el ciclo de vida, puede ser un determinante particularmente significativo del riesgo de enfermedad.

Numerosas publicaciones ilustran la importancia de mirar más allá de un mecanismo de acción estrecho cuando se evalúa el riesgo. Por ejemplo, recientemente se identificaron 10 factores estresantes que representan diferentes clases y mecanismos químicos, incluidos el plomo, los organofosforados y los bifenilos policlorados, que pueden contribuir al desarrollo de los trastornos del espectro autista. Tradicionalmente, estos productos químicos no se evaluarían juntos en una evaluación de riesgos. Sin embargo, dado su potencial de estrés acumulativo y su acción en el sistema nervioso durante períodos críticos de desarrollo, un análisis más integrador y basado en un mapeo de exposiciones por la evaluación de riesgos a través de instantáneas de exposoma a través de etapas de la vida a lo que se le llama LEnS por las siglas en inglés de *Lifestage Exposome Snapshots*. El concepto LEnS es una aproximación práctica de la exposición, que explica las exposiciones totales durante ventanas particulares de susceptibilidad en sistemas de órganos diana. Un reciente estudio propone, que la aplicación del marco LEnS en la evaluación y regulación

de riesgos optimizará el cuidado de la salud de los niños, mejorando la protección de los sistemas sensibles de órganos en desarrollo que son fundamentales para la salud y el bienestar de por vida.

Conclusiones

Como puede apreciarse a lo largo del desarrollo del tema, la evaluación del riesgo necesita de la investigación, y la información obtenida a través de ésta, modifica luego los resultados de la propia evaluación del riesgo. Con las bases científicas se realiza un cálculo del riesgo que sumado a factores legales, técnicos, económicos, sociales y políticos, permitirá a los gestores del riesgo evaluar las alternativas posibles, elegir las opciones, implementarlas y controlar el posterior cumplimiento de normas y leyes que pudieran ponerse en marcha, con el fin último de disminuir el riesgo planteado. Se puede afirmar entonces, que las decisiones públicas concernientes al uso de sustancias químicas continuarán siendo de interés para la ciencia, la política y la ley.