

Factores experimentales y biológicos que pueden influenciar nuestras observaciones en los ensayos toxicológicos



Marcelo Javier Wolansky

Toxicología de Mezclas Químicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento Química Biológica
Universidad de Buenos Aires

CONICET



Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas

Toxicología


- *Disciplina que estudia los efectos adversos que los agentes físicos, químicos y biológicos pueden causar en los organismos vivos.*



American Paper & Ink Co.



7 Side Effects of Soda

Phosphoric Acid - Weakens bones and rots teeth		High Fructose Corn Syrup is a Concentrated form of sugar; Fructose derived from corn. It increases body fat, cholesterol and triglycerides and it also makes you hungry.
Excessive artificial sweeteners makes you crave more		Potassium Benzoate = preservative that can be broken down to benzene in your body. Keep your soda in the sun and benzene = Carcinogen
Caramel Color - Made from the chemical caramel, is purely cosmetic, it doesn't add flavor yet is tainted with carcinogens.	Formaldehyde - Carcinogen, it is not added in soda but when you digest aspartame, it will break down into 2 amino acids and methanol : Formic acid - Formaldehyde (diet sodas)	Food Dyes = impaired brain function, hyperactive behavior, difficulty focusing, lack of impulse control.



Estudio Toxicológico: *No tan simple....*

- Modelo, estudio, bioensayo y diseño en Toxicología.
- Condiciones experimentales y biológicas alternativas que se seleccionan en los estudios toxicológicos.
- Relevancia de las condiciones de los bioensayos para las conclusiones de los estudios regulatorios.
- Impacto de las conclusiones de los estudios regulatorios en la seguridad de los productos que usamos cotidianamente.
- Varios ejemplos de la influencia de las condiciones de los bioensayos (insecticidas piretroides)

¿Por qué es importante el diseño del estudio, especialmente cuando el estudio es regulatorio?

- Preciso *información* para poder predecir que ocurriría si una población diversa utiliza productos químicos en contextos diversos (ANTES que se empiecen a comercializar!)
- Preciso *predecir los peligros y riesgos* para asegurar la inocuidad de los productos una vez que se usen por los consumidores (*beneficios* debe ser > > *riesgos*).
- El diseño del *bioensayo* debe ser adecuado a lo que quiero saber (evaluar neurotoxicidad ≠ evaluar carcinogenicidad)
 - Determina la *sensibilidad* y *reproducibilidad* del estudio.
- Los procedimientos para ejecutar el ensayo y la interpretación de *resultados* dependen del diseño.

¿Por qué es importante el diseño del estudio, especialmente cuando el estudio es regulatorio?

- Obtengo información que puede afectar *decisiones de alto impacto!*
 - Los alimentos frescos y los productos alimenticios elaborados que comemos todos los días toda la vida, pueden provocarnos trastornos en la salud?
- Elaboro *reporte* final, y....***se toma decisión!!!***
 - Clasificación toxicológica, autorización para comercializar, autorización para ampliar los usos posibles, restricción o prohibición de venta, prohibición de uso, etc.



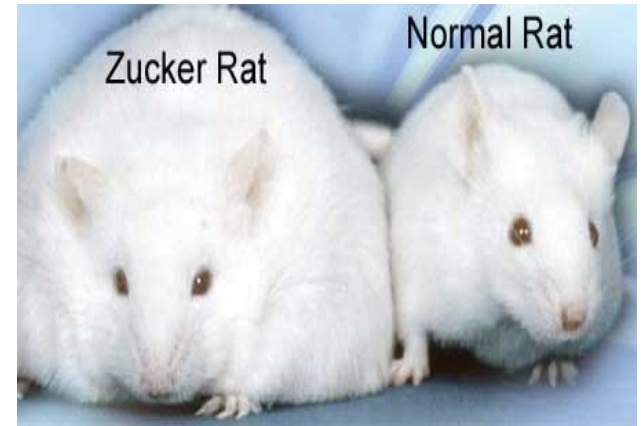
¿Cómo predigo lo que podría ocurrir en la población si no puedo obtener información de respuesta tóxica en humanos?

- Cuestiones éticas/morales
- Variabilidad biológica!! (intra- e inter-individual)
 - Necesito incluir muchos individuos en los estudios

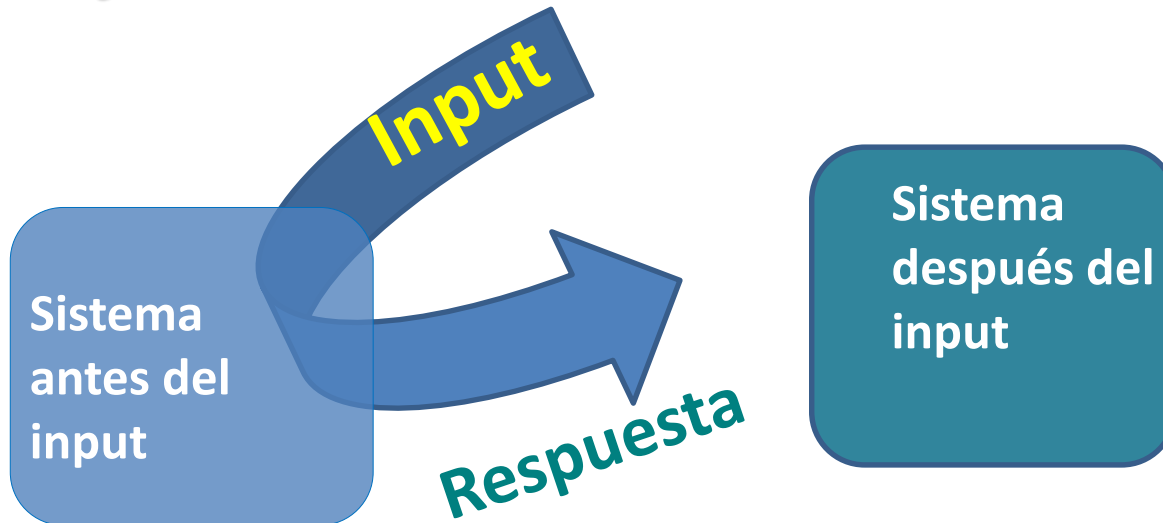


¿Que es un bioensayo?

- **Bioensayo:** *simulación de una situación biológica determinada en un modelo experimental.*
 - Objetivo: determinar *¿cómo responde el sistema cuando modifico una condición?*



Modelo de “rata obesa”

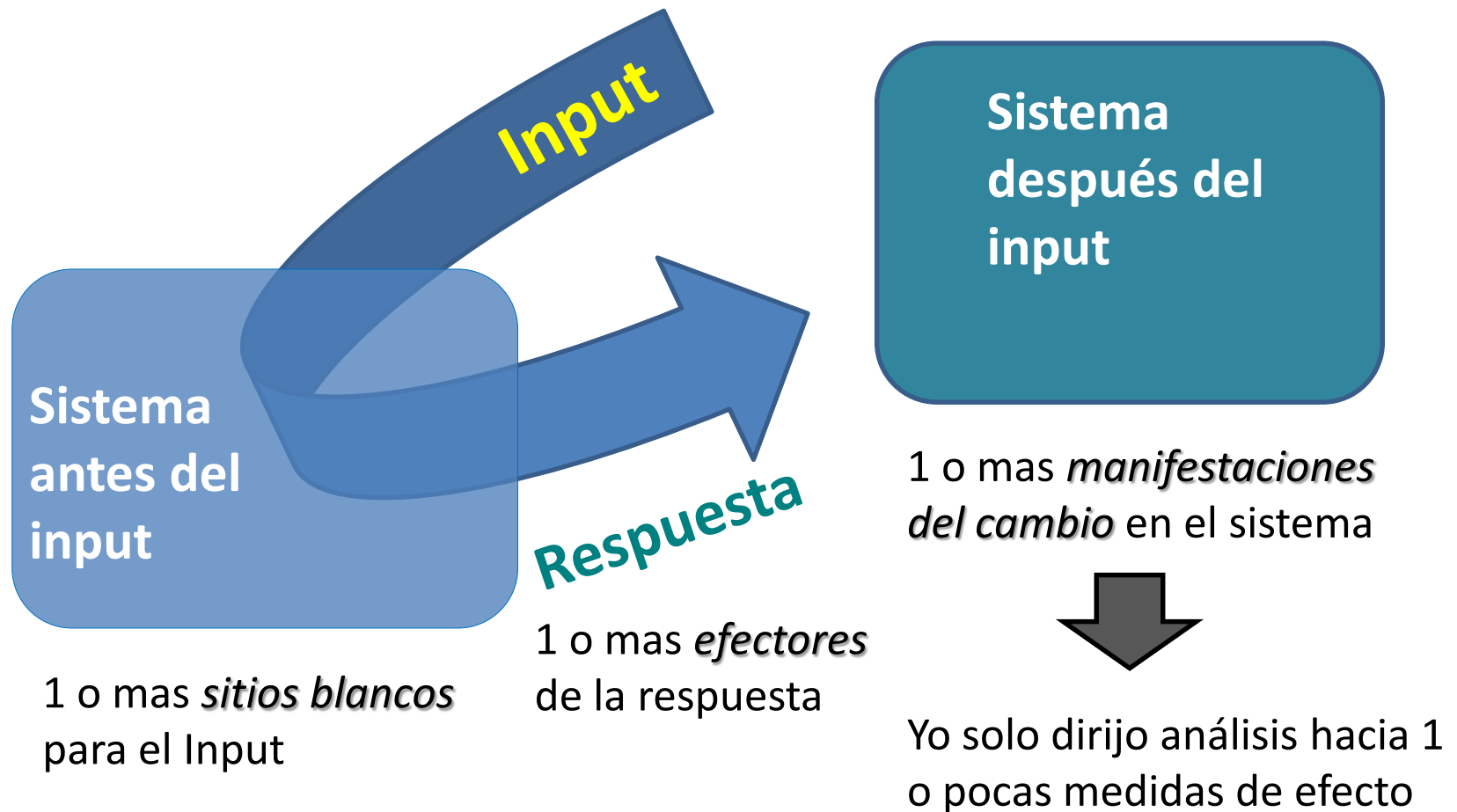


¿Que utilidad tienen los bioensayos?

Me permiten hacer *predicciones*.

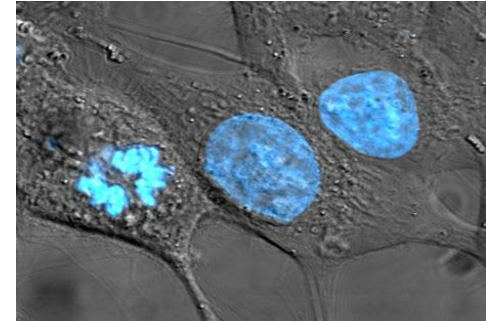
- Estimar rango terapéutico de una droga.
- Estimar umbral de dosis para cada uno de sus efectos colaterales y respuestas tóxicas.
- Estimar la influencia de factores biológicos y experimentales en el *outcome* (consecuencia de la aplicación del estímulo al sistema)
- Estimar potencia relativa para los efectos deseados y no deseados de una familia de drogas y seleccionar la de mejor *costo/beneficio*.

El proceso que *intento* evaluar es mas complejo que lo que observo



Los *sistemas* que evaluó pueden ser muy distintos y muy complejos

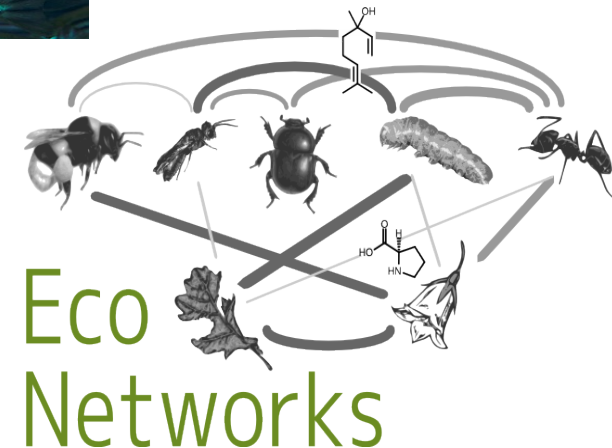
- Células: cultivos primarios; líneas celulares
- Tejidos/Órganos: células interactuando en forma similar a lo que se observa en el organismo vivo.
- Organismos completos
 - Animales
 - Microorganismos
- Ensamblajes - Microcosmos – Mesocosmos (ecotoxicología)



<https://www.britannica.com/science/cell-culture>



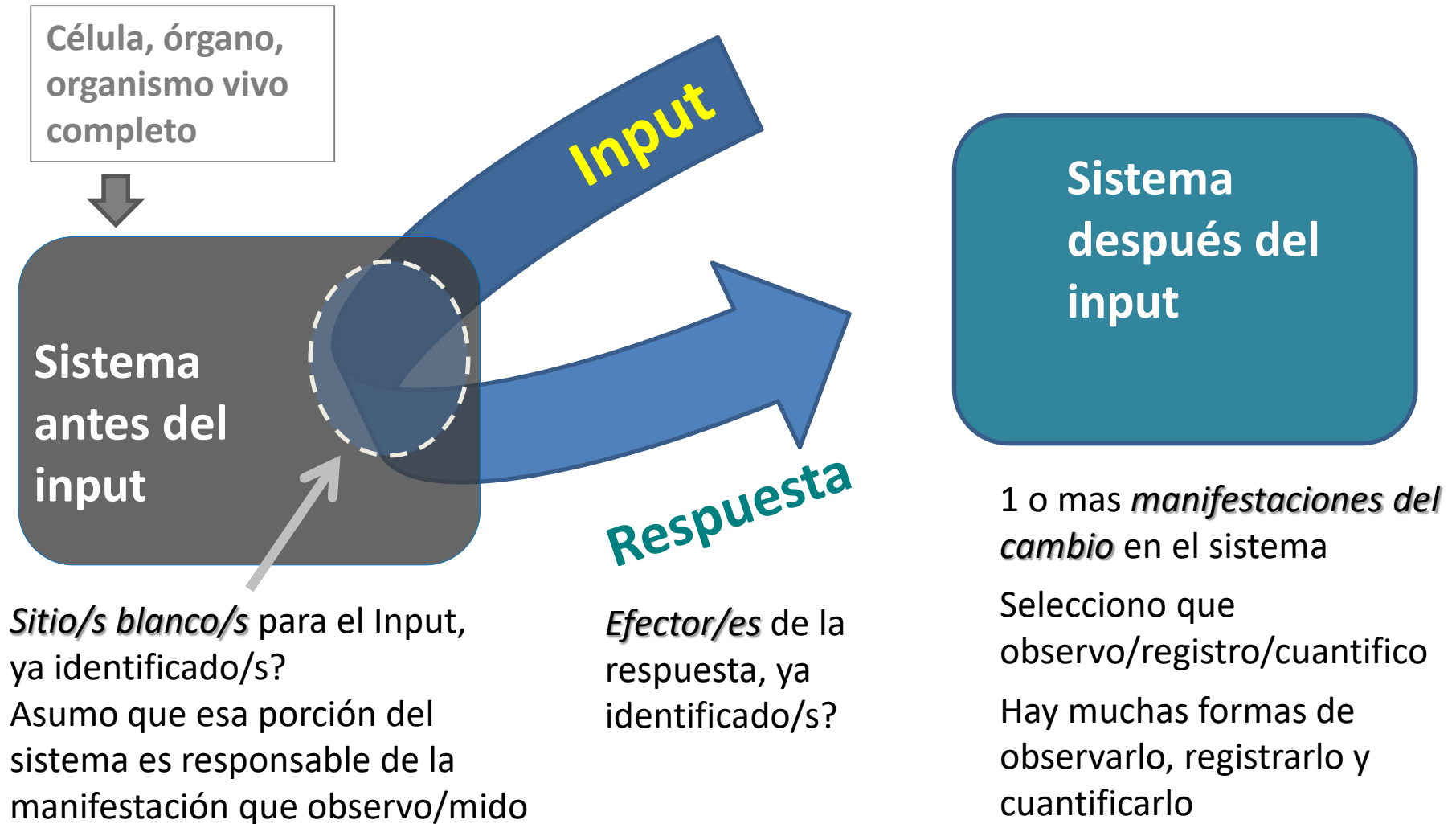
<http://www.howmuchisit.org/how-much-does-a-zebrafish-cost/>



<http://www.bio.tu-darmstadt.de/ag/professuren/bluethgen/Bluethgen.en.jsp>

Entonces...sólo *veo* una parte del proceso

Dependiendo de cómo lo evalúo, puedo *ver* distintas respuestas



Simulación en estudios de laboratorio

- A veces me acerco a condiciones fisiológicas en humanos...

Estudios en humanos

- Ej., administro una dosis (que se considera claramente sub-tóxica) de XX y obtengo muestras de orina a distintos tiempos para evaluar excreción de metabolitos (Eadsforth, C.V. y col., *Xenobiotica* 18(5): 603-14, 1988).
- Estudios en biopsias, necropsias y otras muestras de tejido humano: por ej., comparación de actividad de enzimas metabólicas de rata con las de tejidos de humanos (Scollon, E.J. y col., *Drug Metabolism and Disposition*, 37 (1): 221-28, 2009)

Modelo Experimental

Selecciono **un** sistema que permita testear **una** hipótesis para poder responder **esa** pregunta que me hice.

- Preciso desarrollar una *nueva droga* para controlar fibrilación auricular en humanos.
- Pruebo drogas anti-arrítmicas luego de inducir estados de fibrilación miocárdica.
- *El corazón de cerdo es bastante parecido al humano (anatomía y fisiología).*
- El efecto deseado lo evalúo en cerdos como modelo animal experimental.
- Los efectos colaterales, las interacciones metabólicas, y la toxicidad en otros tejidos (sistema nervioso, hígado, riñón, musculo esquelético, etc.) los puedo estudiar en cerdo o en otras especies (aspectos éticos!!)

Estudio: diseño? *condiciones?*

- ***Fisiológicas***: trato de reproducir lo mas fielmente posible el escenario biológico que se da en la realidad (organismo vivo y en su medio natural).
- ***Farmacológicas***: fuerzo el sistema para que los cambios que observo deriven principalmente de la respuesta a un estímulo potente y en general específico.
- ***Patológicas***: se busca que el sistema simule un estado “enfermo”. Existen perturbaciones similares a la de un proceso patogénico que se quiere estudiar.
La respuesta que resulta luego de agregar el estímulo de interés no es necesariamente extrapolable a lo que ocurriría en el tejido sano.

Ejemplo: estudios de drogas para controlar hipertensión

Situación real de interés biomédico: Hipertensión

- **Condiciones fisiológicas**

Existen animales que tienen distinta susceptibilidad a tener hipertensión: siempre hay *variabilidad!!!*

- **Condiciones farmacológicas**

Veo respuesta de animales “*normales*” luego de administrar droga antagonista de un receptor Adrenérgico.

- **Condición patológica**

Observo respuesta de animales “*hipertensos*” luego de un tratamiento terapéutico experimental.

¿Cuales “condiciones fisiológicas” considero?

Organismo completo

- Dieta – Ambiente
- Estímulo social
- Frecuencia cardíaca
- Frecuencia respiratoria
- Presión arterial
- Viscosidad de la sangre
- Concentración de proteínas y lípidos
- Estado de hidratación; balance hidro-salino
- Termoregulación

Células – Órganos

- ¿Relación a tejido de origen?
- ¿Arquitectura y complejidad celular?
- ¿Nutrientes?
 - Estabilidad, compartimentalización y permeabilidad dentro del sistema?

Condiciones fisiológicas....: ¿Cuáles se deben mantener en los estudios regulatorios?

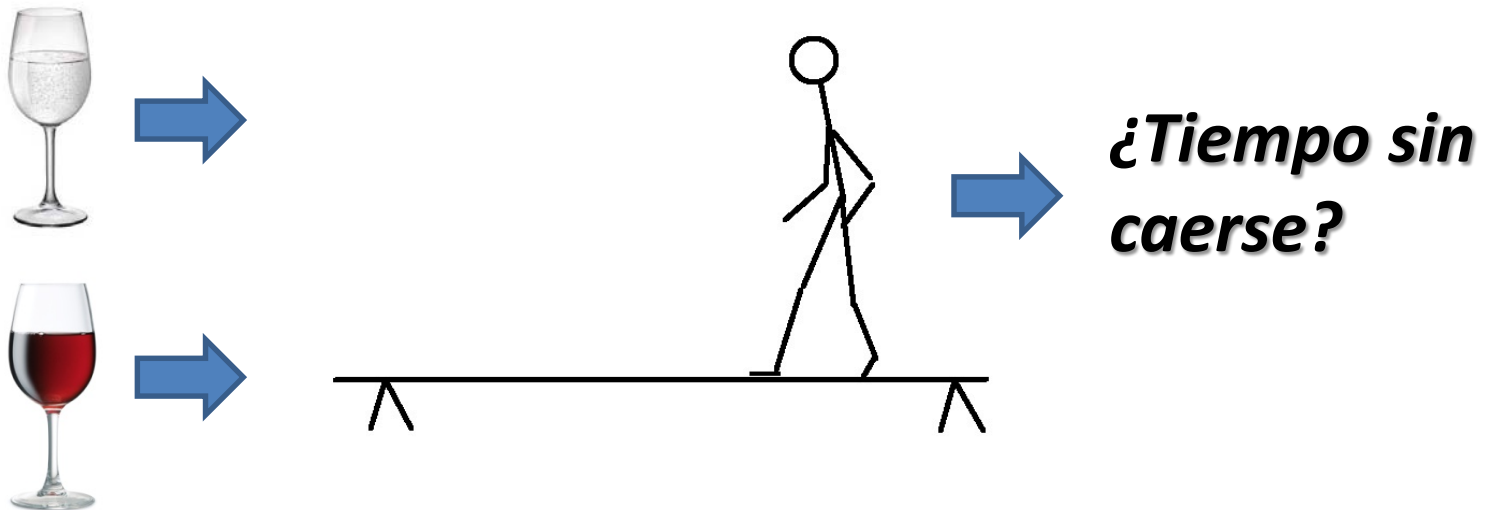
Organismo completo

- Dieta – Ambiente
- Estimulo social
- Frecuencia cardíaca
- Frecuencia respiratoria
- Presión arterial
- Viscosidad de la sangre
- Concentración de proteínas y lípidos
- Estado de hidratación
- Termoregulación; pH

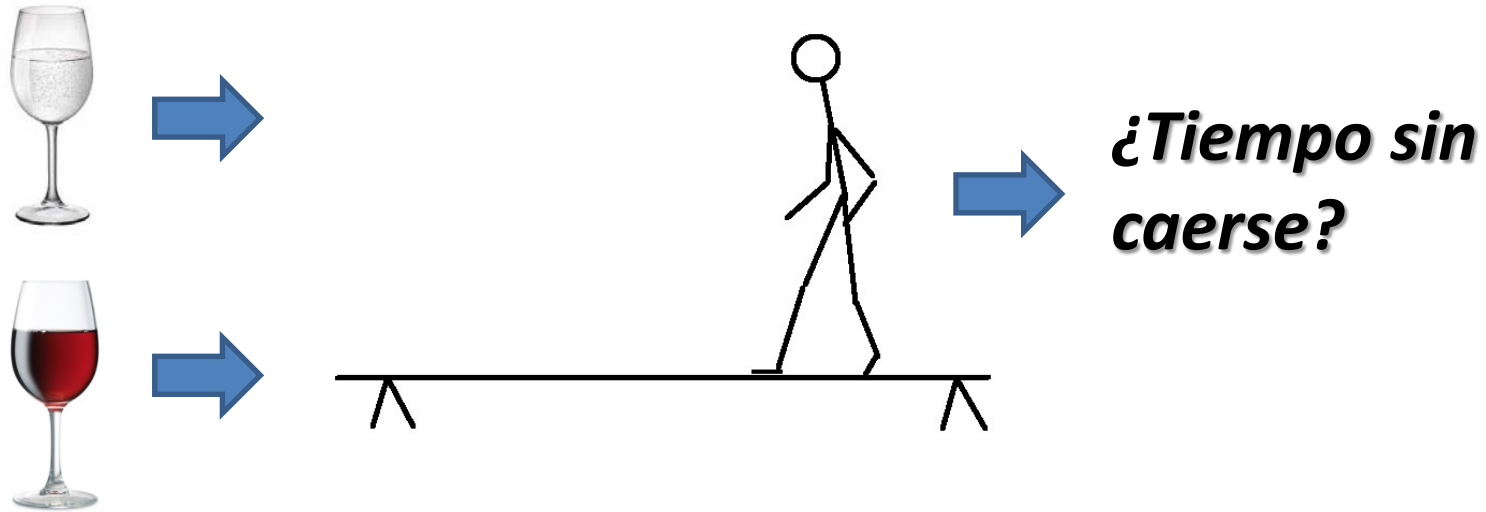
En escenarios realistas, son todas variables con un rango mas o menos amplio de posibilidades según background genético, cambios epigenéticos, condiciones socio-ambientales, dieta, etc.

Estudios regulatorios en animales

- **Grupo control:** simula “condiciones fisiológicas” de funcionamiento del organismo/órgano/tejido/células de interés.
- **Grupo “tratado”** con el agente químico examinado: mostrará una respuesta más cercana o más alejada del grupo control.



Las diferencias se definen con pruebas estadísticas!



- *La “dosis” de vino que produce un determinado % de individuos que “fallan” en la prueba de equilibrio dependerá también de cuántos individuos fallan en el grupo control !!*
- ***Las condiciones basales son tan importantes como el tratamiento en estudio !!!!***

Factores biológicos y experimentales que influyen en la toxicidad observada en los ensayos de laboratorio

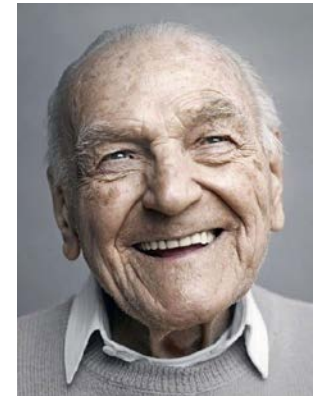
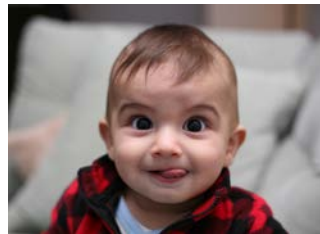
- Estimaciones de toxicidad oral aguda obtenidas en estudios de efectos sub-letales y mortalidad en ratas adultas.
- La influencia de estos factores en otros escenarios de exposición (oral vs. otras vías, dosificación aguda vs. exposición crónica) no es necesariamente igual.

Factores Biológicos

- *Especie / Cepa*



- *Edad*



- *Estado mórbido*



¿La edad influencia la vulnerabilidad?



Infancia

- Menor capacidad enzimática
- BHE inmadura
- Mayor relación grasa/ músculo
- Menor cantidad de nefrones por riñón
- Tejidos “cambian” su morfología y fisiología constantemente!



Adulthood temprana

- Optimización de capacidades homeostáticas y respuesta al ambiente interno y externo



Hasta **12** veces de variación en potencia (estudios de insecticidas piretroides en ratas)

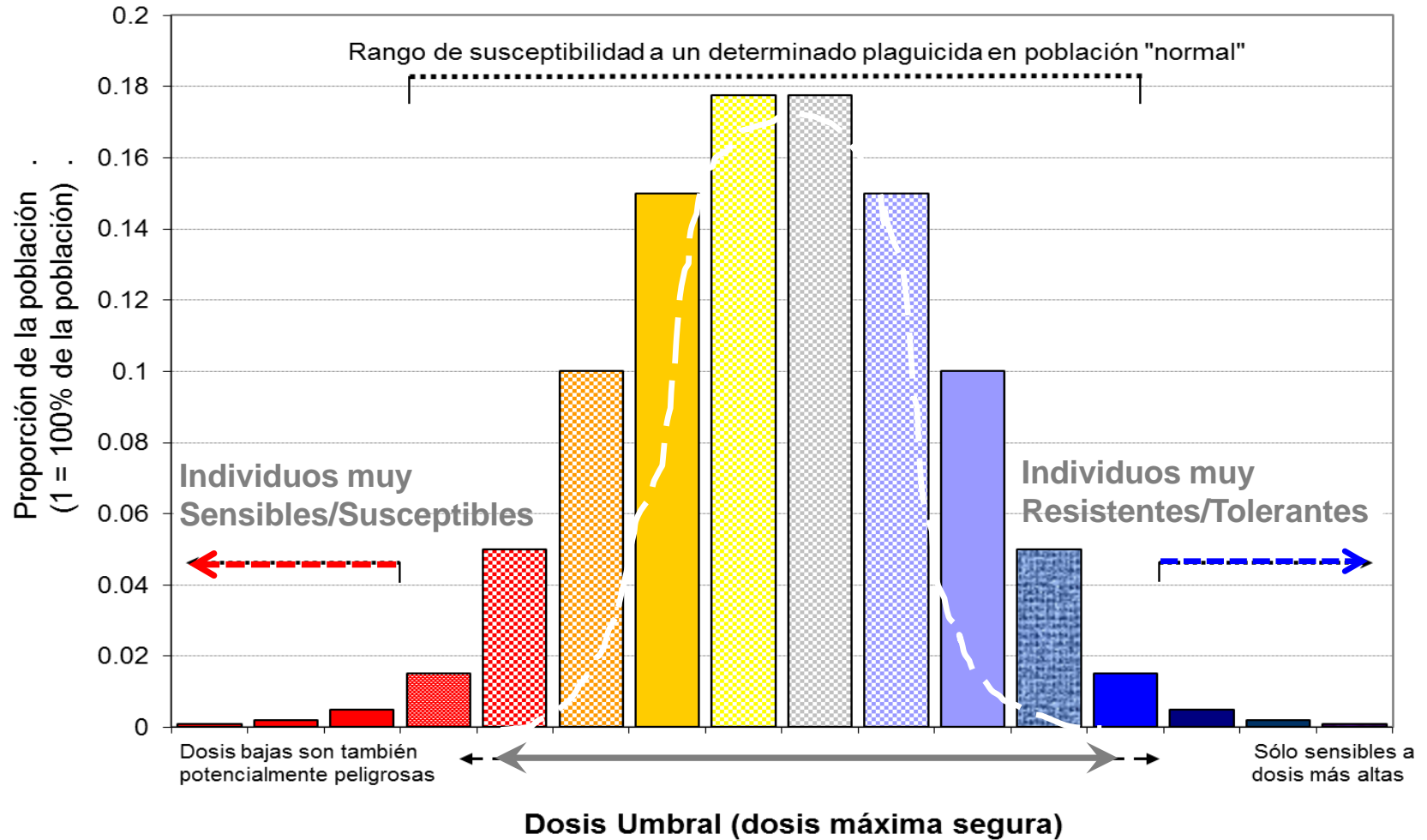


Vejez

- Manifestación de la huella que deja el haber vivido por muchos años.
- Deterioro gradual de funciones vitales, de la capacidad detoxificante, y de la capacidad homeostática en general

Factores Biológicos

Otro punto importante: Susceptibilidad en Población General



Población “normal”.... ¿Quién es normal?

- Se busca proteger a la población en general.
- Hay alta prevalencia de trastornos crónicos:
 - Diabetes Mellitus, 46,4 millones
 - Anemia (deficiencia de hierro), 66,4 millones
 - Asma, 53,3 millones

Región: América (WHO, 2004)

- ¿Dónde quedan representados esos humanos de la población general en los grupos controles y tratados de los estudios regulatorios en animales?

¿Un ratón es siempre un ratón?

- Los animales utilizados en estudios toxicológicos regulatorios son “calidad *spf*” (libres de patógenos)
- Hay muchos factores de la cría de animales que pueden afectar su respuesta tóxica, no sólo la infección con patógenos.
- Existe debate creciente sobre la racionalidad de utilizar ratones *extremadamente sanos* para representar poblaciones humanas con alta proporción de enfermedades agudas y crónicas.



<https://arturogoicochea.com/2009/05/12/conducta-de-enfermedad/>



<http://saikualternativo.blogspot.com.ar/2015/07/millones-de-personas-se-creen-enfermas.html>

Factores Experimentales

- Manejos en las colonias de animales (husbandry)
- Composición de la muestra
 - ¿Presencia de carbonos quirales?
 - Pureza del ingrediente de interés (XX)
- Vehículo/Portador para disolver XX
- Volumen de dosis
- Esquema de dosificación
 - Tiempo entre dosificación y evaluación de respuesta
 - Dosificación vs. Repetida
 - Esquema de dosis seleccionadas para el ensayo dosis-respuesta

Más Factores Experimentales!!

- Temperatura ambiente
(colonia de animales y laboratorio experimental)
- Aparato para evaluar efectos
- Sistema de registro de datos

Factores experimentales

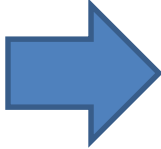
Colonia de animales (husbandry)

- Dieta
- Ambiente
 - Luz – Ruidos - Olores
 - Temperatura ambiente
- Calidad de barreras de bioseguridad
- Tipo de jaulas
- Presencia de elementos de estimulación social y ambiental
 - Número de individuos por jaula
 - Material de lecho (madera, arcilla, alambre de acero)
 - Túneles, texturas, oportunidades para ejercicio

¿La **temperatura de la sala experimental** afecta la respuesta tóxica en el animal?

La temperatura ambiente influencia muchos aspectos fisiológicos:

- Consumo de agua
- Dieta, cantidad de calorías consumidas
- Mecanismos termoregulatorios
- Actividad metabólica basal
- Actividad social y motora

 Hasta **6** veces de variación en DL50

Wolansky y Tornero-Velez, 2013

Puede afectar los procesos de absorción, metabolismo, distribución y excreción de sustancias químicas!

¿Cómo afecta la alimentación el efecto de la sustancia tóxica?

Ayuno largo versus corto antes de la dosificación

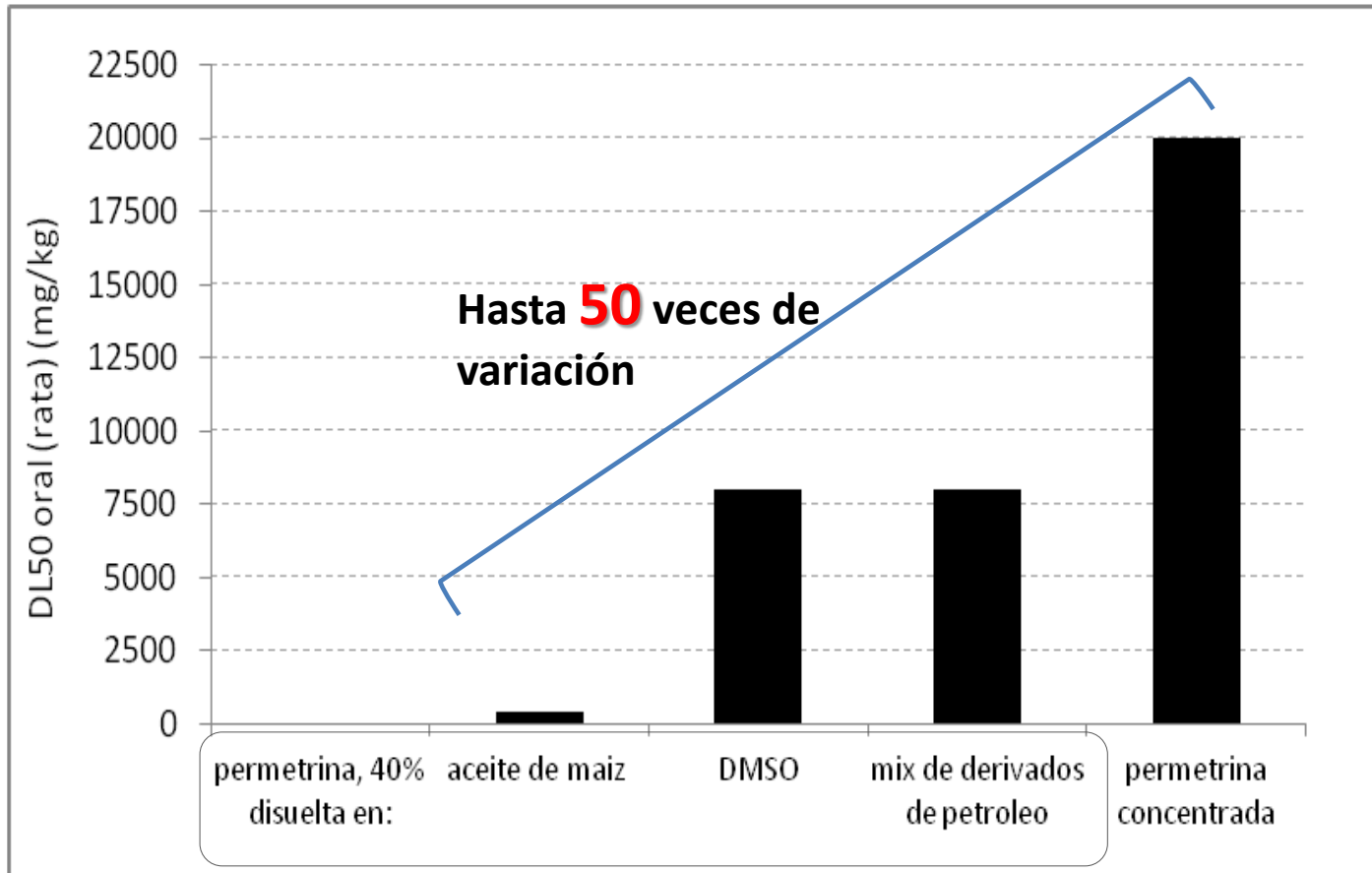
- Interacción con materia orgánica e inorgánica.
 - I. Reducción o aumento de biodisponibilidad
 - II. Degradación no enzimática
- Cambios en velocidad de absorción gastrointestinal de la sustancia.
 - Superficie de epitelio intestinal disponible para que se produzca el ingreso de XX (vegetales de hojas duras y/o con mucha fibra).
 - Interacciones toxicocinéticas (ejemplo: Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+})

Consumo	pH
Vinagre	2-3
Jugo de limón	
Refrescos tipo "XXcola"	

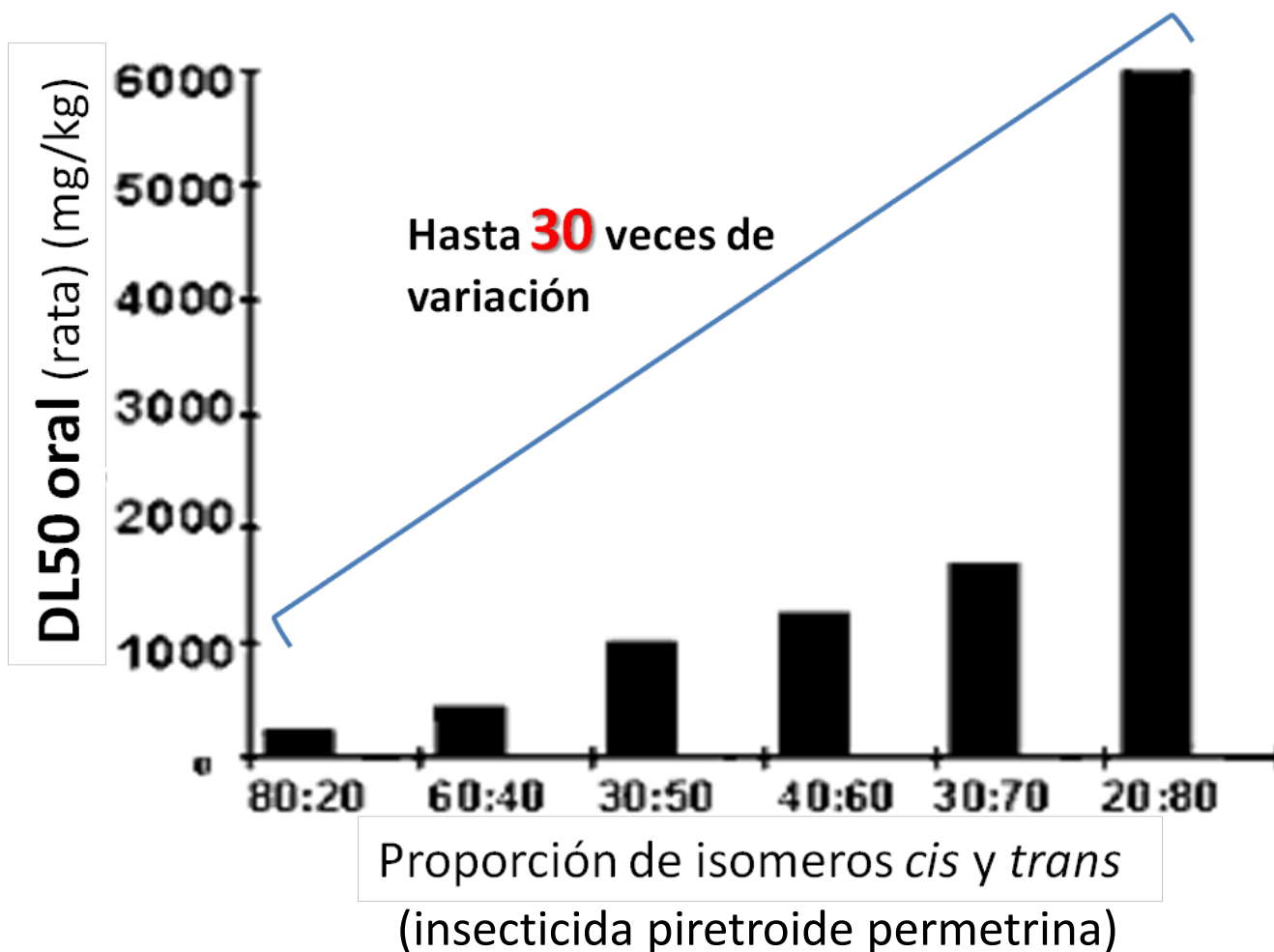
¿Cómo afecta lo que comió el animal antes del experimento el efecto de la sustancia tóxica?

- Dilución en carga alimenticia
 - Se influyen los fenómenos que dependen de concentración en punto de absorción.
 - Solubilidad en el bolo alimenticio
- Influye equilibrio entre mantenimiento en tránsito del bolo alimenticio y afinidad/permeabilidad en el punto de absorción
 - Alto contenido lipídico (carnes, frituras)
 - Alto contenido de agua (frutas, verduras, jugos)

Composición de la muestra: ¿Qué proveedor? ¿Qué proceso de síntesis? ¿Qué lote? ¿Qué muestra?



Composición de la muestra: ¿Qué proveedor?
¿Qué proceso de síntesis? ¿Qué lote? ¿Qué muestra?



Clasificación de sustancias según su letalidad

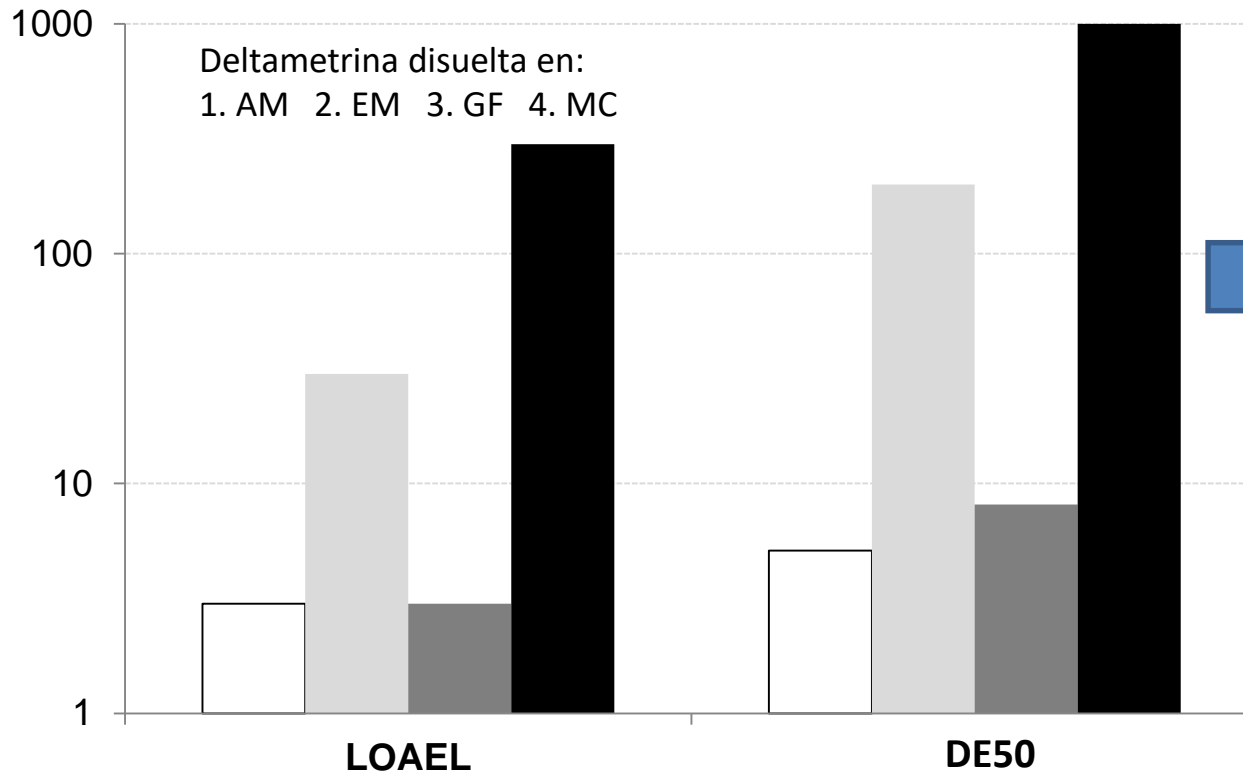
DL50 oral (rata) (mg/kg)

	Vía de exposición	
	ORAL	DERMAL
Ia Extremadamente peligroso	< 5	< 50
Ib Altamente peligroso	5 a 50	50 a 200
II Moderadamente peligroso	>50 a 2000	>200 a 2000
III Ligeramente peligroso	>2000 a 5000	>2000 a 5000
IV Producto que normalmente no ofrece peligro	>5000	>5000

- La estimación de toxicidad que resulta del bioensayo, se considera al clasificar toxicidad aguda (peligrosidad).
- La clasificación de peligrosidad determina numerosas recomendaciones de envasado, transporte, uso y descarte, marcos legales, estrategias de control preventivo, procedimientos y decisiones en sala de emergencias, etc.

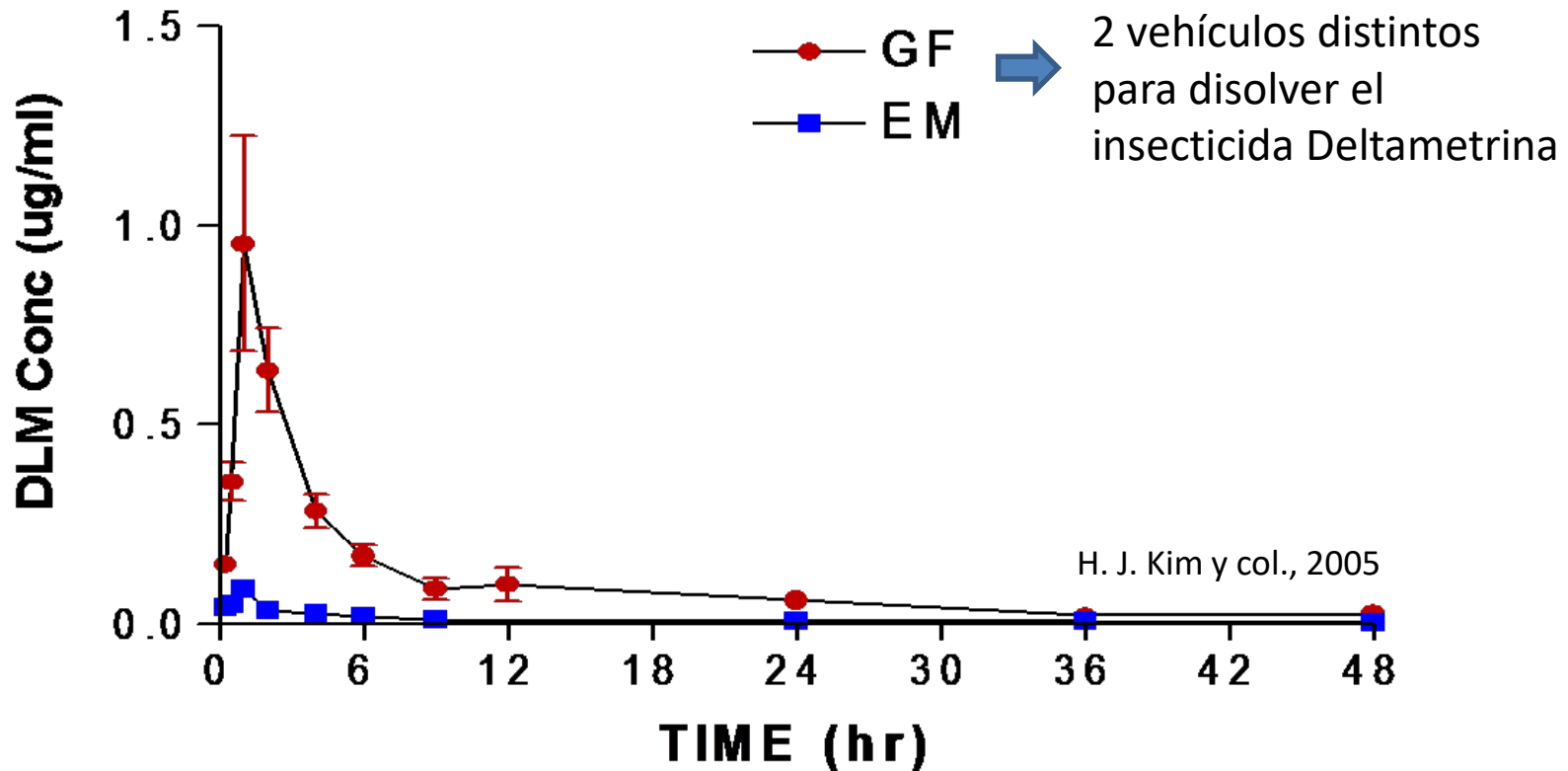
Solución administrada: ¿en que vehículo disuelvo la sustancia tóxica?

LOAEL y DE50 (mg/Kg; escala log)
Efecto evaluado: actividad motora en laberinto



Hasta **200** veces de variación en potencia del piretroide Deltametrina

Vehículo utilizado para disolver la dosis de la sustancia de interés



Se afecta eficacia de absorción, concentración máxima en sangre, concentración máxima en tejido blanco, y respuesta tóxica!

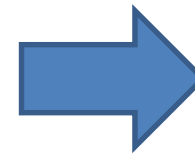
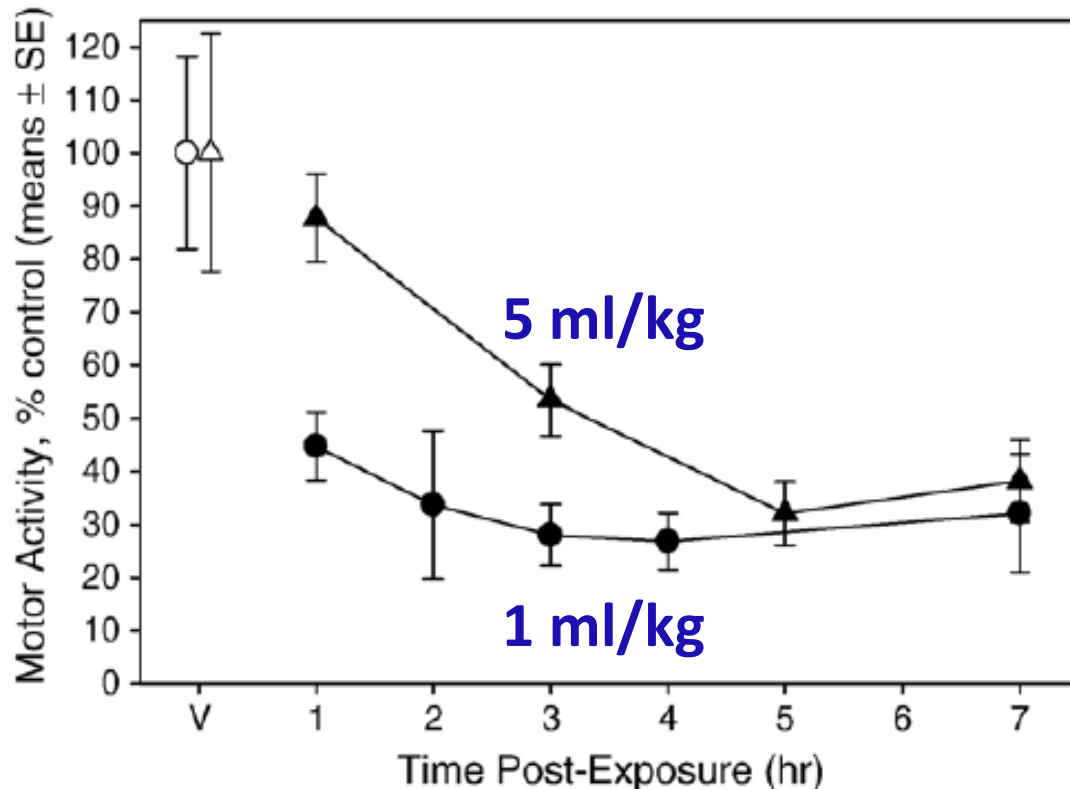
Solución administrada: ¿Cuánto volumen “carga” la dosis administrada de XX?



- Si es muy **poco**, puede afectar la **reproducibilidad** experimental
 - Error volumétrico al cargar dosis!!
 - ¿Llega o no llega a solubilizar esa dosis de XX?
 - Se afectan los fenómenos de partición entre solvente y punto de absorción
- Si es **mucho**, puede confundir la **interpretación** de los resultados
 - Puede causar estrés mecánico en esófago y estómago (desde estrés moderado a trauma).
 - Facilita el ingreso accidental por vía respiratoria (aspiración)

Volumen que porta una dosis oral

- Cambio en la depresión de actividad que se observa en la rata dentro de un laberinto al modificar el volumen que lleva la dosis administrada por vía oral (insecticida piretroide bifentrina).



Hasta **2-3** veces de variación en potencia (DE30)

Wolansky y col., 2007

Resumiendo

- Los **estudios toxicológicos** (sean o no regulatorios) son útiles para estimar cual es el **máximo nivel de exposición** (aguda o crónica) a productos químicos que **un ser humano susceptible puede tolerar**.
- La **variabilidad** en los bioensayos puede ser **MUY** grande.
 - Existen múltiples fuentes experimentales y biológicas de variabilidad dentro y entre individuos.

Resumiendo

- Se puede afectar la clasificación de toxicidad aguda, en bioensayos de letalidad oral.
- También se puede afectar la clasificación de una sustancia según su peligrosidad (teratogenicidad, carcinogenicidad, perturbación endócrina, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, etc.).
 - Ej., al no seleccionar las condiciones experimentales de mayor sensibilidad para un bioensayo, las dosis que pruebo pueden llegar a ser sub-efectivas para daños en estructura o función renal

Resumiendo

- Se trata de estandarizar (acotar) las condiciones que deben respetarse para los estudios regulatorios.
- Se busca tener alta sensibilidad, repetitividad y reproducibilidad dentro y entre laboratorios.
- ***Si no se reconocen estas fuentes de variabilidad, se pueden cometer errores*** menores o **mayores** (hasta ~1000 veces) en la estimación de la dosis máxima segura.

Gracias por la atención!!!



*“No estudio por saber más,
sino por ignorar menos”*

Sor Juana Inés de la Cruz