



DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE SENSIBILIZACIÓN DÉRMICA EMPLEANDO EL MODELO VITROSKIN

M-152_SE079-23

Cliente: DOWN THERE

Dirección: Panorámica 80,
Huertas la Joya,
Santiago De Querétaro CP:76137.
Contacto: M. en C. Denia María Piña Vázquez
Teléfono: (+52) 442 337 2785
Fax: ---
E-mail: downthere64@gmail.com

Laboratorio evaluador: Laboratorio de Investigación Alternativa S.A.P.I. de C.V.

Dirección: Privada Parandas #11, Int. 4-5,
Col. Ejido, 76904 Los Olvera.
Contacto y responsable: Xitlali García
Teléfono: +52 (442) 214 80 68
Fax: ---
E-mail: xgarcia@lialt.com.mx

CONTENIDO

1. Objetivo	4
2. Introducción	4
2.1. Fundamento	4
2.2. Sistema de prueba VitroSkin.....	4
3. Método	5
3.1. Preparación de los tejidos de cultivo para evaluación	5
3.2. Muestras.....	5
3.3. Dilución de los tratamientos	5
3.4. Exposición a tratamientos.....	5
3.5. Ensayo MTT de viabilidad celular	5
3.6. ELISA IL-18.....	6
3.7. Controles de Calidad del Ensayo	6
3.7.1. Criterio de Aceptación del Ensayo 1: Control Negativo	6
3.7.2. Criterio de Aceptación del Ensayo 2: Control Positivo.....	6
3.8. Criterio de clasificación.....	6
4. Resultados	7
4.1. Ensayo MTT de viabilidad celular e IL-18 SI	7
4.2. Criterios Validados.....	8
5. Conclusiones.....	9
6. Revisión	10
7. Referencias.....	11
8. Glosario	12
9. Apéndice	12

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de muestras	5
Tabla 2. Modelo de Predicción.....	6
Tabla 3. Efecto sensibilizante del tratamiento evaluado en el modelo de EHR VitroSkin de LIALT.....	7
Tabla 4. Clasificación del tratamiento evaluado empleando el modelo de predicción correspondiente al EHR VitroSkin de LIALT	9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de EHR VitroSkin.....	4
Figura 2. Gráfico del % de viabilidad Vs IL-18 SI del del tratamiento evaluado M-152.....	7
Figura 3. Gráfico del % de viabilidad Vs IL-18 SI del control positivo DNBC.....	8

Resumen

Objetivo

Evaluar de manera comparativa el potencial de sensibilidad dérmica de una formulación "LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018" empleando el modelo de Epidermis Humana Reconstituida VitroSkin.

El protocolo de prueba permite predecir el potencial de sensibilización de la piel de una sustancia de prueba desconocida según los siguientes parámetros de medición:

Citotoxicidad (ensayo MTT) expresado como valor EC50 (EC50 = concentración de sustancia efectiva requerida para reducir la actividad metabólica del tejido VitroSkin, correspondiente a la viabilidad celular, hasta el 50% del valor máximo en comparación con los tejidos expuestos al solvente).

Potencial alergénico, \geq Incremento de 5 veces en la liberación de IL-18 (ELISA) en comparación con los tejidos VitroSkin tratados con solventes en la viabilidad celular $\geq 5\%$ y $\leq 40\%$ (EC5-40).

Resultados

Descripción de la muestra	¿Algún ingrediente de interés?	Concentración	Clasificación	
			In vitro ¹	"UN GHS"
LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018	---	---	NS	Sin Categoría

¹ NS: No Sensibilizante

S: Sensibilizante

Conclusiones

Después del tiempo de exposición, bajo el modelo y condiciones empleadas, se manifestó un perfil **No Sensibilizante (In Vitro)** o **Sin Categoría (UN GHS)** para la formulación "LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018".

De acuerdo al estudio realizado el valor EC50 no pudo ser determinado para la muestra "LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018" ya que no presento curva dosis-respuesta.

No se reportó sobreexpresión de la IL-18 en ninguna de las concentraciones empleadas dentro del rango $\geq 5\%$ y $\leq 40\%$ (EC5-40) de la muestra "LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018".

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba biológica de sensibilización dérmica y de acuerdo al modelo de predicción "In Vitro" (apartado 3.8), se clasifica a la formulación "LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018" como producto **"HIPOALERGENICO"** ya que no causa reacción adversa a la piel de individuos sensibles.

1. Objetivo

Evaluar de manera comparativa el potencial de sensibilidad dérmica de una formulación "LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018" empleando el modelo de Epidermis Humana Reconstituida VitroSkin.

2. Introducción

2.1. Fundamento

La sensibilización dérmica es una reacción inmunitaria ante substancias de bajo peso molecular, involucrando varios tipos de células que participan activamente en las respuestas alergénicas de la piel humana (Cavani, 2007). Los queratinocitos, el principal tipo celular en la epidermis humana, desempeñan un rol en todas las fases de la dermatitis alérgica de contacto, desde la fase de inicio temprano por penetración del estrato córneo y la secreción de citocinas proinflamatorias las cuales son requeridas para la migración de las células de Langerhans y el tráfico de Linfocitos T, resultando en el desarrollo de dermatitis alérgica por contacto.

Esta prueba aborda el punto final de la sensibilización dérmica de la salud humana. La cual consiste en una exposición tópica de sustancias de prueba a un modelo de Epidermis Humana Reconstituida (EHR), que imita de cerca las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las partes superiores de la piel humana, seguida de una prueba de viabilidad celular para determinar el valor de EC50. La viabilidad celular se mide mediante la conversión de deshidrogenasa de MTT [(3-4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil tetrazolio bromuro], presente en las mitocondrias celulares, en una sal de formazán azul que se mide cuantitativamente después de la extracción de tejidos. La reducción de la viabilidad de los tejidos expuestos a sustancias en comparación con los controles negativos (tratados con disolvente) se utiliza para determinar el cálculo de EC50. La interleucina-18 (IL-18) es secretada constitutivamente por los queratinocitos y puede ser inducida por sustancias de prueba en diferentes grados. El nivel de producción de IL-18 inducido por una sustancia de prueba es un parámetro del modelo de predicción para este ensayo.

2.2. Sistema de prueba VitroSkin.

Modelos alternativos de Epidermis Humana Reconstituida (EHR) simulan de manera muy cercana a la piel normal y a partir de que en éstos se ha comprobado la reproducción de la función de barrera de la epidermis humana normal, sobre la premisa de que los irritantes son capaces de penetrar el estrato córneo y causar un efecto citotóxico en las capas siguientes de la epidermis, dichos modelos pueden ser ampliamente utilizados para la investigación de irritantes potenciales para la piel.

El modelo VitroSkin de Laboratorio de Investigación Alternativa (LIALT), emplea queratinocitos de epidermis humana normal de neonato (HEKn; una de las células con mayor presencia en la piel, superficie 0,63 cm²), los cuales son cultivados en insertos especiales y con nutrientes por un periodo de 12 días.



Figura 1. Modelo de EHR VitroSkin.

El producto químico de prueba se aplica de forma tópica a un modelo EHR tridimensional, compuesto por queratinocitos epidérmicos derivados de humanos no transformados, posteriormente se determinará el potencial de sensibilización mediante el ensayo de la viabilidad celular (MTT) y la expresión de la IL-18.

3. Método

3.1. Preparación de los tejidos de cultivo para evaluación

El método de preparación de los tejidos de epidermis humana reconstituida VitroSkin de LIALT es una adaptación del método propuesto por Poumay *et al.*, 2004 (1).

3.2. Muestras

La muestra fue recibida e identificada para la prueba de la siguiente manera:

ID Interno	Descripción de la muestra	Ingrediente de interés		Fecha de recepción	¿Cumple criterios? Si/No*
		Nombre	%		
M-152	LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018	---	---	24-Oct-23	Si

Tabla 1. Identificación de muestras

*Criterios: cantidad de muestra, empaque/identificación.

3.3. Dilución de los tratamientos

Las diluciones se realizan en el siguiente orden: 200 mg / ml, 150 mg / ml, 100 mg / ml, 50 mg / ml, 25 mg / ml, 10 mg / ml, y 1 mg / ml hasta que se alcance una solución clara. El disolvente con la mayor capacidad de disolución se elige para la aplicación de la sustancia, para este estudio el solvente seleccionado fue el DPBS.

3.4. Exposición a tratamientos

Los tejidos fueron expuestos al producto a prueba (25 μ l) de manera directa en la superficie del modelo de epidermis humana reconstituida e incubados a 37°C por un periodo de 24h. Tejidos control sin tratamiento (CST) fueron tratados de la misma forma aplicando el solvente en curso (DPBS), así como el control positivo DNBC (2,4-dinitroclorobenceno) fueron incluidos en el estudio con el objetivo de evaluar una respuesta relacionada a la dosis de aplicación.

Los tejidos se enjuagan a fondo, se secan para eliminar las sustancias de ensayo, posteriormente se realizan los ensayos de viabilidad celular (MTT) y Elisa (IL-18).

3.5. Ensayo MTT de viabilidad celular

El principio del modelo de Epidermis Humana Reconstituida (EHR) se basa nuevamente en la premisa de que los sensibilizantes son capaces de penetrar el estrato córneo y causar un efecto citotóxico en las capas siguientes de la epidermis. El ensayo de viabilidad celular en los modelos EHR se mide mediante la conversión enzimática del colorante vital MTT bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo; CAS número 298-93-1], en una sal azul de formazán que se mide cuantitativamente después de la extracción de los tejidos.

La absorbancia de la solución resultante es medida a 570nm empleando un lector de micro placas de Thermo Fisher Scientific VarioskanFlash. Los valores de absorbancia son capturados empleando el programa Skanlt Software 2.4.5 y el análisis estadístico es llevado a cabo posteriormente, empleando el programa GraphPadPrism v7.

3.6. ELISA IL-18

Se ha demostrado que la IL-18 favorece la respuesta inmune de tipo Th-1 al aumentar la secreción de mediadores proinflamatorios como el TNF-, la IL-8 y el IFN- γ , y desempeña un papel proximal clave en la inducción del contacto alérgico dermatitis (Cumberbatch et al., 2001).

El ensayo para determinar la expresión de la enzima IL-18 fue de acuerdo a las instrucciones del proveedor del kit ab215539 Human IL-18 SimpleStep ELISA® Kit de fabricante ABCam.

La absorbancia de la solución resultante es medida a 450nm empleando un lector de micro placas de Thermo Fisher Scientific VarioskanFlash. Los valores de absorbancia son capturados empleando el programa Skanlt Software 2.4.5.

3.7. Controles de Calidad del Ensayo

3.7.1. Criterio de Aceptación del Ensayo 1: Control Negativo

La Densidad Óptica absoluta de los tejidos de control sin tratamiento (CST) (tratados con el solvente DPBS estéril) en el ensayo MTT es un indicador de viabilidad de tejido obtenido en el laboratorio de ensayo después de los procedimientos de transporte y almacenamiento y bajo condiciones específicas de uso.

El ensayo cumple el criterio de aceptación si la OD570 media de los tejidos CST es >0.8 Y <2.5 .

Los tejidos CST expuestos con el solvente (DPBS) no debe resultar en una disminución de más del 30% en la viabilidad celular relativa en comparación con los tejidos CST son solvente.

3.7.2. Criterio de Aceptación del Ensayo 2: Control Positivo

Se utilizaron las diluciones de acuerdo al punto 3.3 para la preparación del DNBC (en DPBS) como control positivo (CP) y se prueba simultáneamente con los productos químicos de ensayo.

Concurrente significa que el CP tiene que ser probado en cada ensayo, pero no se requiere más de un CP por día de prueba

El ensayo cumple el criterio de aceptación si el aumento en IL-18 intracelular es ≥ 5.0 cuando la viabilidad celular $\geq 5\%$ y $\leq 40\%$ (EC5-40) en al menos una de las concentraciones probadas, la sustancia es clasificada como sensibilizador de contacto (R43).

3.8. Criterio de clasificación

% DE VIABILIDAD	IL-18 (ELISA)	CLASIFICACIÓN	
		In vitro	“UN GHS”
$\geq 5\%$ y $\leq 40\%$ (EC5-40)	<5	No Sensibilizante (NS)	Sin Categoría
$\geq 5\%$ y $\leq 40\%$ (EC5-40)	≥ 5	Sensibilizante (S)	Categoría 2

Tabla 2. Modelo de Predicción

4. Resultados

4.1. Ensayo MTT de viabilidad celular e IL-18 SI

El potencial citotóxico del tratamiento evaluado fue empleando el modelo de EHR VitroSkin expresado en forma de porcentaje en relación a tejidos control sin tratamiento (con solvente).

Para la evaluación de la alergenicidad (IL-18 SI): La cantidad relativa de proteína IL-18 presente en los sobrenadantes pg/ml en relación tejidos control sin tratamiento (con solvente).

[] LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018	% Viabilidad celular ¹	DS % ²	CONC. IL-18 (pg/mL)	IL-18 SI ³
1 mg/mL	58.53	0.85	-37.07	1.21
10 mg/mL	59.89	1.25	-33.83	1.10
25 mg/mL	58.36	0.66	-30.70	1.00
50 mg/mL	78.95	5.58	-34.78	1.13
100 mg/mL	79.06	8.46	-32.79	1.07
200 mg/mL	56.39	0.07	-21.67	0.71

¹promedio de 3 réplicas

²DS: Desviación estándar

³ IL-18 SI = IL-18 pg/ml del tratamiento evaluado / IL-18 pg/ml con Solvente

Tabla 3. Efecto sensibilizante del tratamiento evaluado en el modelo de EHR VitroSkin de LIALT.

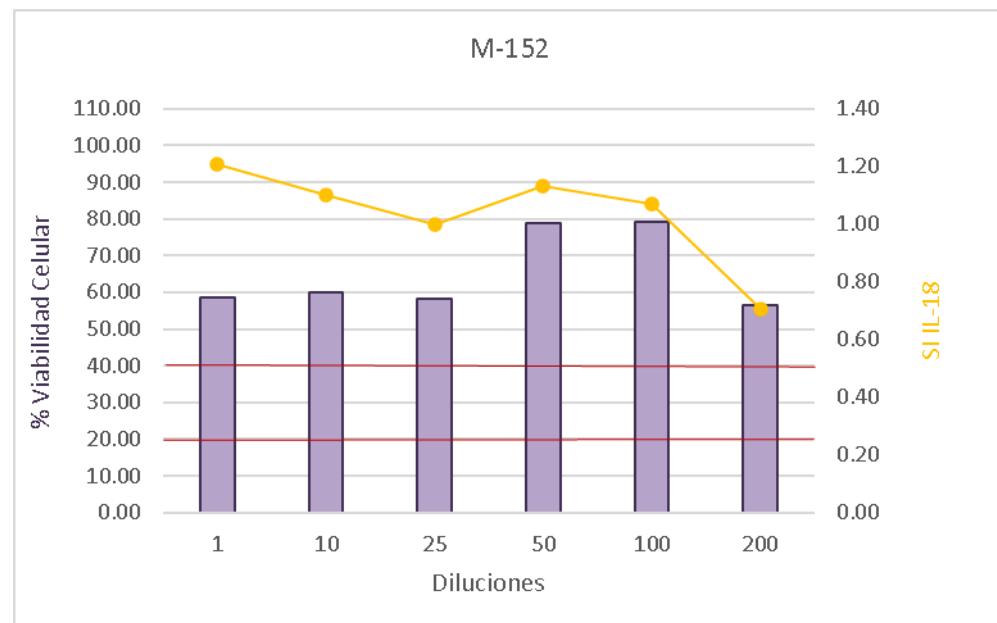


Figura 2. Gráfico del **% de viabilidad** Vs **IL-18 SI** del del tratamiento evaluado M-152.

$EC50 = ND \text{ mg/mL}$ (este es el valor $EC50 \text{ mg/mL}$ que reduce la viabilidad celular al 50%).

4.2. Criterios Validados.

- ✓ El valor obtenido OD570 para el CST fue: **1.87** (cumple).
- ✓ No se observó una disminución en la viabilidad celular mayo al 30% en los tejidos CST con solvente (cumple).
- ✓ El CP fue clasificado como Sensibilizante (cumple).

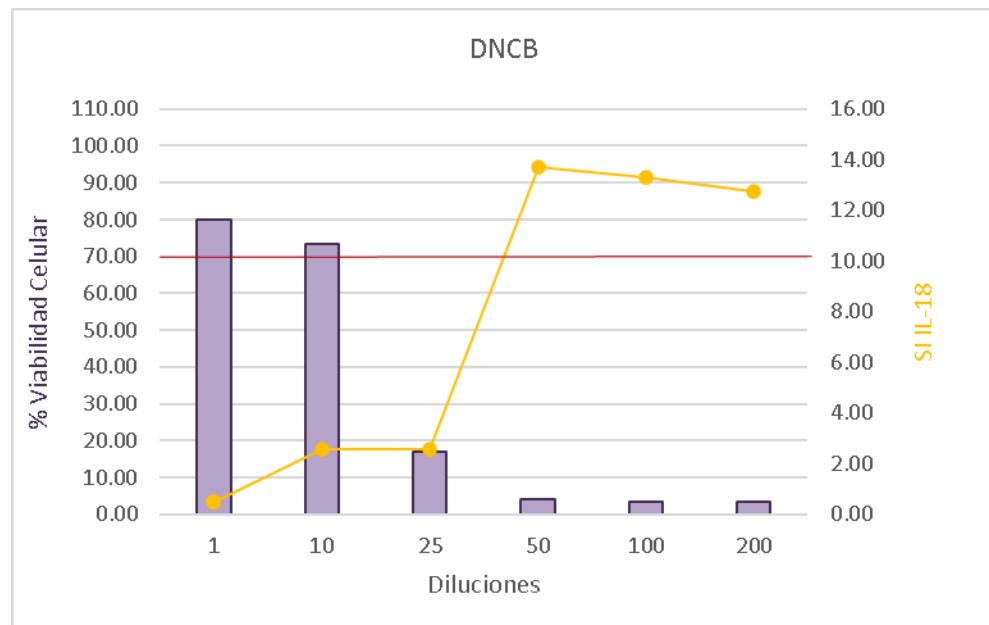


Figura 3. Gráfico del **% de viabilidad** Vs **IL-18 SI** del control positivo DNBC.

EC50= 14.36 mg/mL (este es el valor EC50 mg/mL que reduce la viabilidad celular al 50%).

5. Conclusiones

La clasificación del tratamiento evaluado fue llevada a cabo acorde al diagrama de decisión anexo en el apéndice de este reporte (ver Apéndice).

[] LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018	% Viabilidad celular		IL-18 SI	Clasificación	
	Promedio	DS		In vitro ¹	"UN GHS"
1 mg/mL	58.53	0.85	1.21	NS	Sin Categoría
10 mg/mL	59.89	1.25	1.10		
25 mg/mL	58.36	0.66	1.00		
50 mg/mL	78.95	5.58	1.13		
100 mg/mL	79.06	8.46	1.07		
200 mg/mL	56.39	0.07	0.71		

¹ NS: No Sensibilizante

S: Sensibilizante

Tabla 4. Clasificación del tratamiento evaluado empleando el modelo de predicción correspondiente al EHR VitroSkin de LIALT.

Después del tiempo de exposición, bajo el modelo y condiciones empleadas, se manifestó un perfil **No Sensibilizante** (In Vitro) o **Sin Categoría** (UN GHS) para la formulación “LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018”.

De acuerdo al estudio realizado el valor EC50 no pudo ser determinado para la muestra “LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018” ya que no presento curva dosis-respuesta.

No se reportó sobreexpresión de la IL-18 en ninguna de las concentraciones empleadas dentro del rango $\geq 5\%$ y $\leq 40\%$ (EC5-40) de la muestra “LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018”.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba biológica de sensibilización dérmica y de acuerdo al modelo de predicción “In Vitro” (apartado 3.8), se clasifica a la formulación “LUBRICANTE ÍNTIMO CORPORAL / 231018” como producto **“HIPOALERGENICO”** ya que no causa reacción adversa a la piel de individuos sensibles.

6. Revisión

El trabajo detallado en este estudio ha sido realizado siguiendo los métodos estándar del Laboratorio de Investigación alternativa. Todos los resultados han sido revisados por el responsable del Laboratorio y de Calidad.

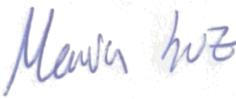
Elaborado por:



Fecha: 17.11.23

Ricardo Fosado Rodríguez
Responsable del estudio.

Revisado por:



Fecha: 17.11.23

María Luz Núñez Morales
Responsable de Calidad.

Aprobado por:



Fecha: 17.11.23

Martha Xitlali García López
Director del estudio.

Las conclusiones y recomendaciones realizadas o implícitas en este estudio, se basan solamente en la información obtenida a partir del análisis de las muestras identificadas en el mismo.

***Esta información se declara como **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL** por lo que el emisor y receptor no podrán hacer uso inapropiado de ninguna manera y por ningún medio; en parte o en su totalidad de la **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL** generada o proporcionada directa o indirectamente por la compañía, sus filiales, o convenidas por motivos de contratación comercial o de negocios que justifiquen el intercambio de información. La presente se emite en inteligencia de la responsabilidad de los daños y perjuicios que tal incumplimiento ocasionare, sin perjuicio de las demás acciones legales que procedan, por violación a los derechos de propiedad intelectual o industrial, incluyendo el delito de revelación de secretos contemplado en los artículos 210, 211 y demás relativos del Código Penal Federal, y en los artículos 223, 223 bis y demás relativos de la Ley de la Propiedad Industrial.

7. Referencias

1. Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S., Leclerk-Smekens, M., Herin, M. and Coquette, A. (2004). A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch. Dermatol. Res.* 296: 203-211.
2. dos Santos GG, Spiekstra SW, Sampat-Sardjoepersad SC, Reinders J, Scheper RJ, Gibbs S, 2011. A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicol In Vitro.* 25: 347-57.)
3. Antonopoulos, C., Cumberbatch, M., Mee, J.B., Dearman, R.J., Wei, X., Liew, F.Y., Kimber, I., Groves, R.W., 2008. IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. *J. Leukoc. Biol.* 83: 361-367.
4. Procedimiento Operativo Estándar, SIV-RE-004_Reconstitución de los modelos VitroSkin y VitroCorneal.
5. Procedimiento Operativo Estándar, ETS-RE-013_Exposición a tratamientos Sensibilidad Dérmica.
6. Procedimiento Operativo Estándar, EPI-RE-0014_Ensayo de Proliferación Celular SD.
7. Procedimiento Operativo Estándar, RPD-RE-015_Resultados de la Proliferación Celular SD.
8. Procedimiento Operativo Estándar, RPD-RE-016_ Ensayo para la determinación de expresión de la IL-18.
9. Procedimiento Operativo Estándar, RPD-RE-017_ Resultados de expresión de la IL-18.

8. Glosario

Viabilidad celular: parámetro que mide la actividad total de una población de células, p. como la capacidad de deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante vital MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo), que dependiendo del punto final medido y el diseño de prueba utilizado, se correlaciona con el número total y / o la vitalidad de las células vivas.

Químico: significa una sustancia o una mezcla.

GHS (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos por las Naciones Unidas): Un sistema que propone la clasificación de productos químicos (sustancias y mezclas) de acuerdo con tipos y niveles estandarizados de peligros físicos, de salud y ambientales, y aborda la comunicación correspondiente elementos, como pictogramas, palabras de advertencia, declaraciones de peligro, declaraciones de precaución y fichas de datos de seguridad, para transmitir información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a las personas (incluidos empleadores, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de respuesta de emergencia) y el medio ambiente

Mezcla: significa una mezcla o una solución compuesta de dos o más sustancias en las que no reaccionan.

MTT: bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio; Tiazolil Bromuro azul de tetrazolio.

CP: Control Positivo, una réplica que contiene todos los componentes de un sistema de prueba y tratada con una sustancia conocida por inducir una respuesta positiva. Para garantizar que se pueda evaluar la variabilidad en la respuesta de control positivo a lo largo del tiempo, la magnitud de la respuesta positiva no debe ser excesiva.

CST: Control Sin Tratamiento, tejidos que serán expuestos con DPBS 1X o solución salina, para garantizar un tejido sin daño, siendo esta la referencia normalizada para este ensayo.

9. Apéndice

Diagrama de decisión para clasificación de tratamientos evaluados.

