

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## **Puesta a punto de las técnicas de sensibilización cutánea: DPRA, Kerationosens y h-CLAT**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

*ALUMNA:* Clara Fombuena Sanmiguel

*TUTORA UPV:* Prof. Dra. Patricia Almudéver Folch

*TUTORES EXTERNOS:* Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña. Pilar Ribera Alba

*Curso Académico:* 2018-2019

**Valencia, Julio de 2019**

**Título:** Puesta a punto de las técnicas de sensibilización cutánea: DPRA, Keratinosens y h-CLAT

**Resumen:**

Un compuesto sensibilizante cutáneo es aquel capaz de provocar dermatitis de contacto alérgica (DCA), una reacción cutánea local que se caracteriza por el enrojecimiento, la hinchazón y el picor de la zona expuesta. Los ingredientes cosméticos son un ejemplo de compuestos que podrían desencadenar este tipo de respuesta. Se sabe que en el proceso de sensibilización cutánea existen cuatro eventos clave, tres de los cuales pueden estudiarse hoy en día utilizando técnicas *in vitro* e *in chemico*, sin necesidad de utilizar modelos animales. En este trabajo se pusieron a punto las tres técnicas descritas hasta el momento por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) para determinar el potencial sensibilizante de un compuesto: El *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA), un ensayo *in chemico* basado en HPLC que estudia la capacidad de una sustancia para formar un complejo hapteno-proteína, el primer evento clave del proceso de sensibilización; la técnica *in vitro* Keratinosens, que se centra en la inducción de genes citoprotectores en los keratinocitos tras la exposición a un compuesto de estudio (segundo evento clave) y, por último, el *human Cell Line Activation Test* (h-CLAT), que evalúa mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores de superficie CD86 y CD54 en las células dendríticas utilizando una línea celular monocítica (THP-1), siendo este el tercer evento clave del proceso de sensibilización cutánea .

Skin sensitizers are substances capable of causing allergic contact dermatitis (ACD), a local skin reaction characterized by redness, swelling and itching. Cosmetic ingredients are a clear example of compounds that could trigger this response. It is known that skin sensitization process includes four key events, three of which can be currently evaluated using *in vitro* and *in chemico* approaches, without needing to use animal testing strategies. In this study the fine tuning of three techniques described by the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) was conducted in order to evaluate the sensitization potential of chemical substances: the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), an *in chemico* test based on HPLC that assesses the ability of a substance to form a hapten-protein complex, which is the first key event in the skin sensitization process; the Keratinosens *in vitro* test method assesses the induction of cytoprotective genes in keratinocytes after exposure to a test compound (second key event) and, finally, the third key event of the skin sensitization process that is assessed by the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) that makes use of flow cytometry in order to evaluate CD86 and CD54 expression in dendritic cells, using a human monocytic cell line (THP-1).

**Palabras clave:** Sensibilización cutánea, cosmética, DPRA, Keratinosens, h-CLAT.

**Key words:** Skin sensitization, cosmetics, DPRA, Keratinosens, h-CLAT.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Sensibilización cutánea.....	1
1.2. Antecedentes del estudio de sensibilización cutánea .....	4
1.3. Métodos alternativos a la experimentación animal .....	5
1.3.1. <i>Direct Peptide Reactivity Assay</i> (DPRA): fundamento .....	5
1.3.2. Keratinosens: fundamento .....	6
1.3.3. <i>Human Cell Line Activation Test</i> (h-CLAT): fundamento .....	7
1.4. Modelo de predicción.....	8
1.4.1. Determinación del potencial sensibilizante por DPRA .....	8
1.4.2. Determinación del potencial sensibilizante por Keratinosens .....	9
1.4.3. Determinación del potencial sensibilizante por h-CLAT.....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
3.1. Cultivo Celular Rutinario.....	11
3.1.1. Keratinosens .....	11
3.1.2. THP-1 .....	11
3.2. Compuestos a testar.....	12
3.3. <i>Direct Peptide Reactivity Assay</i> (DPRA) .....	12
3.4. Keratinosens.....	13
3.5. <i>Human Cell Line Activation Test</i> (h-CLAT).....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>16</b>
4.1. Estudio del potencial sensibilizante por DPRA.....	16
4.2. Estudio del potencial sensibilizante por Keratinosens.....	17
4.3. Estudio del potencial sensibilizante por h-CLAT .....	20
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	<b>26</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Fase de inducción del proceso de sensibilización cutánea.....	2
2. Fase de estimulación del proceso de sensibilización cutánea.....	3
3. Formación del complejo hapteno-proteína.....	5
4. Inducción del gen de la luciferasa en keratinosens.....	6
5. Activación de monocitos THP-1 en h-CLAT.....	7
6. Efectos de los compuestos de ensayo sobre la línea celular keratinosens.....	19
7. Análisis citométrico de la expresión de los marcadores de membrana CD86 y CD54 en monocitos THP-1.....	21
8. Efecto de los compuestos de ensayo sobre la línea celular THP-1.....	23

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Porcentajes de disminución peptídica para determinar el potencial sensibilizante de un compuesto.....	9
2. Condiciones del gradiente lineal del sistema de HPLC.....	13
3. Efecto de los compuestos de ensayo sobre los péptidos de cisteína y lisina.....	17
4. Inducción de la luciferasa y citotoxicidad en el ensayo de Keratinosens para 5 compuestos.....	20
5. Resultados del potencial sensibilizante para los compuestos testados por h-CLAT.....	24

## ABREVIATURAS

- **AOP:** secuencia de mecanismos adversos
- **ARE:** elementos de respuesta a estrés oxidativo
- **CV:** Coeficiente de Variación
- **DCA:** dermatitis de contacto alérgica
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DNCB:** 2,4-dinitroclorobenceno
- **DPBS:** Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
- **DPM:** desintegraciones por minuto
- **DPRA:** Direct Peptide Reactivity Assay
- **ECVAM:** centro europeo para la validación de métodos alternativos
- **EGDMA:** etilenglicoldimetacrilato
- **ERK:** extracelular signal-regulated kinase
- **FBS:** Fetal Bovine Serum
- **FCS:** Fetal Calf Serum
- **FITC:** fluoresceína isocianato
- **GMPT:** Guinea Pig Maximisation Test
- **h-CLAT:** Human Cell Line Activation Test
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia
- **I<sub>máx</sub>:** inducción de la actividad luciferasa
- **INF  $\gamma$ :** interferón gamma
- **LCSA:** loose-fit coculture-based sensitization assay
- **LLNA:** ensayo del nódulo linfático local
- **MFI:** media geométrica de la intensidad de fluorescencia (I<sub>máx</sub>)
- **MHC II:** complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
- **MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazol
- **OECD:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
- **PI:** yoduro de propidio
- **p38 MAPK:** p38 mitogen-activated protein kinase
- **RFI:** intensidad relativa de fluorescencia
- **ROS:** especies reactivas del oxígeno
- **RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute

- **SD:** desviación estándar
- **THP-1:** línea celular de leucemia monocítica humana
- **TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa
- **UE:** Unión Europea

## **1. INTRODUCCIÓN**

En la actualidad, la evaluación de la seguridad de un producto químico en la Unión Europea (UE) se basa, mayoritariamente, en datos de cada uno de los ingredientes individuales por los que está compuesto. Así pues, es esencial contar con datos completos acerca del potencial sensibilizante cutáneo de cada uno de estos compuestos químicos cuando hablamos de productos que van a tener contacto directo con la piel, como es el caso de los cosméticos (Henkel AG & Co. KGaA, 2016).

### **1.1. Sensibilización cutánea**

Un compuesto sensibilizante cutáneo es aquel capaz de provocar dermatitis de contacto alérgica (DCA), una reacción cutánea local en la que la zona expuesta muestra síntomas de enrojecimiento, hinchazón y picor (Strickland et al., 2016). Estos compuestos sensibilizantes se caracterizan por ser haptenos, es decir, grupos químicos definidos, de pequeño tamaño, que por sí mismos son incapaces de desencadenar una respuesta inmune, pero que unidos covalentemente a una molécula portadora, forman un complejo que tiene carácter inmunógeno (Pichler, 2019).

El conocimiento que existe acerca de los mecanismos químicos y biológicos asociados a la sensibilización cutánea se ha resumido en lo que se conoce como secuencia de mecanismos adversos (*Adverse Outcome Pathway*; AOP). Un AOP es una secuencia de eventos que abarca desde la estructura química de un compuesto químico hasta el efecto que se ha observado que tiene *in vivo*. Cada AOP recopila el conocimiento que existe acerca de la relación entre un evento molecular inicial, eventos intermedios y el efecto adverso que aparece a nivel individual o poblacional (Strickland et al., 2016).

En el caso de la sensibilización cutánea, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD), resumió detalladamente el mecanismo biológico. La OECD es una organización intergubernamental en la que representantes de 36 países de América del Norte y del Sur, Europa, Asia y la región del Pacífico, así como de la Comisión Europea, se reúnen para coordinar políticas, discutir temas de interés común y trabajar con el fin de responder ante problemas internacionales (OECD, 2012).

En el documento publicado por la OECD, la sensibilización cutánea se describe como un proceso inmunológico que ocurre en dos fases: La fase de inducción de la sensibilización y la de estimulación de la reacción inmune (OECD, 2012).

En la fase de inducción (**Figura 1**), el químico o alérgeno penetra en la epidermis. Durante esta fase, el alérgeno suele sufrir procesos de biotransformación que pueden aumentar o disminuir su potencial alergénico. El compuesto químico interacciona con proteínas transportadoras de la piel, formando un complejo estable hapteno-proteína que es procesado por las células dendríticas epidérmicas (células de Langerhans) y dérmicas, provocando así la maduración y activación de estas células que comienzan a migrar hacia los nódulos linfáticos. Los complejos hapteno-proteína también pueden reaccionar y activar la respuesta en los keratinocitos, que a su vez pueden interaccionar con las células dendríticas. En los nódulos linfáticos, las células dendríticas presentan las moléculas de su complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II),

que incluye parte del complejo hapteno-proteína, a los linfocitos T inmaduros. Esto induce su proliferación y diferenciación a linfocitos T memoria, que empiezan a circular por todo el cuerpo (OECD, 2012).

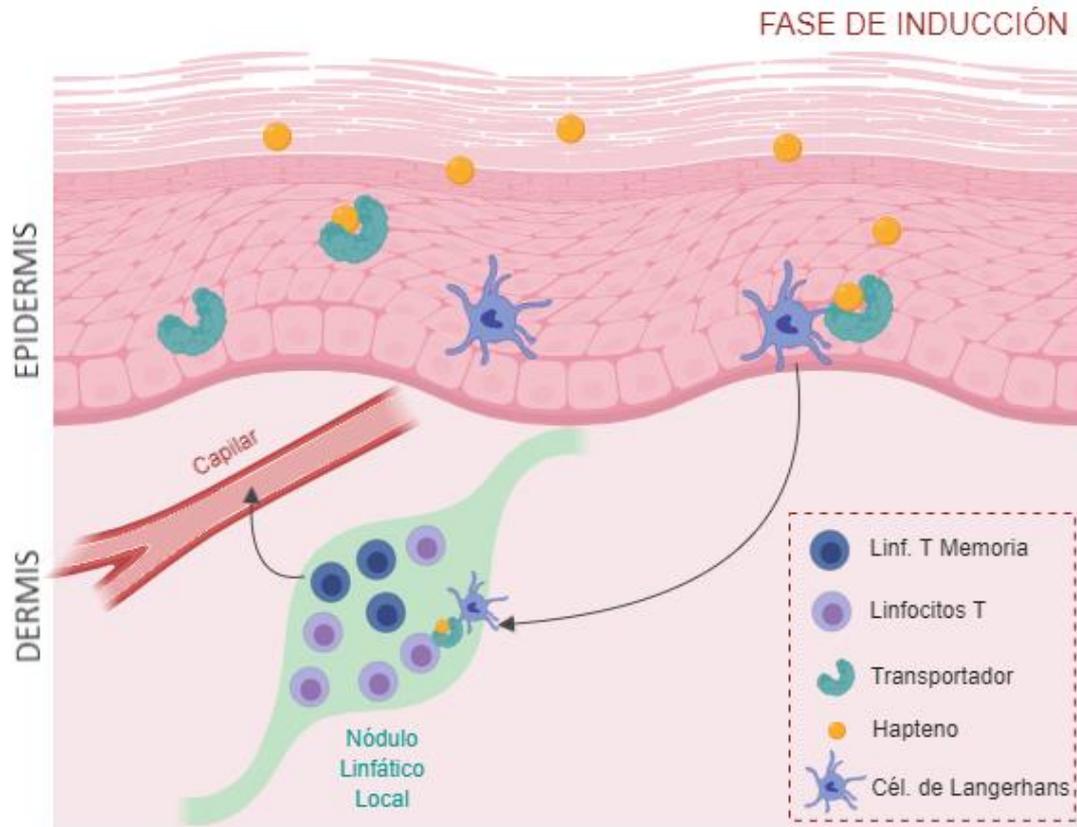


Figura 1. Fase de inducción del proceso de sensibilización cutánea

En la fase de estimulación (**Figura 2**) se produce un segundo contacto con el mismo alérgeno. Se forma el complejo hapteno-proteína de nuevo y es captado por las células dendríticas epidérmicas así como por otras células presentadoras de antígenos. Los linfocitos T memoria, formados en la fase de inducción, empiezan a secretar citoquinas específicas como el interferón gamma ( $INF\gamma$ ), que induce la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) o la IL-1, así como la movilización de linfocitos T citotóxicos y de otras células inflamatorias. Estas células migran a la epidermis e inducen la respuesta inflamatoria característica de la DCA: enrojecimiento, aparición de ronchas, así como picor y ardor en la piel (OECD, 2012).

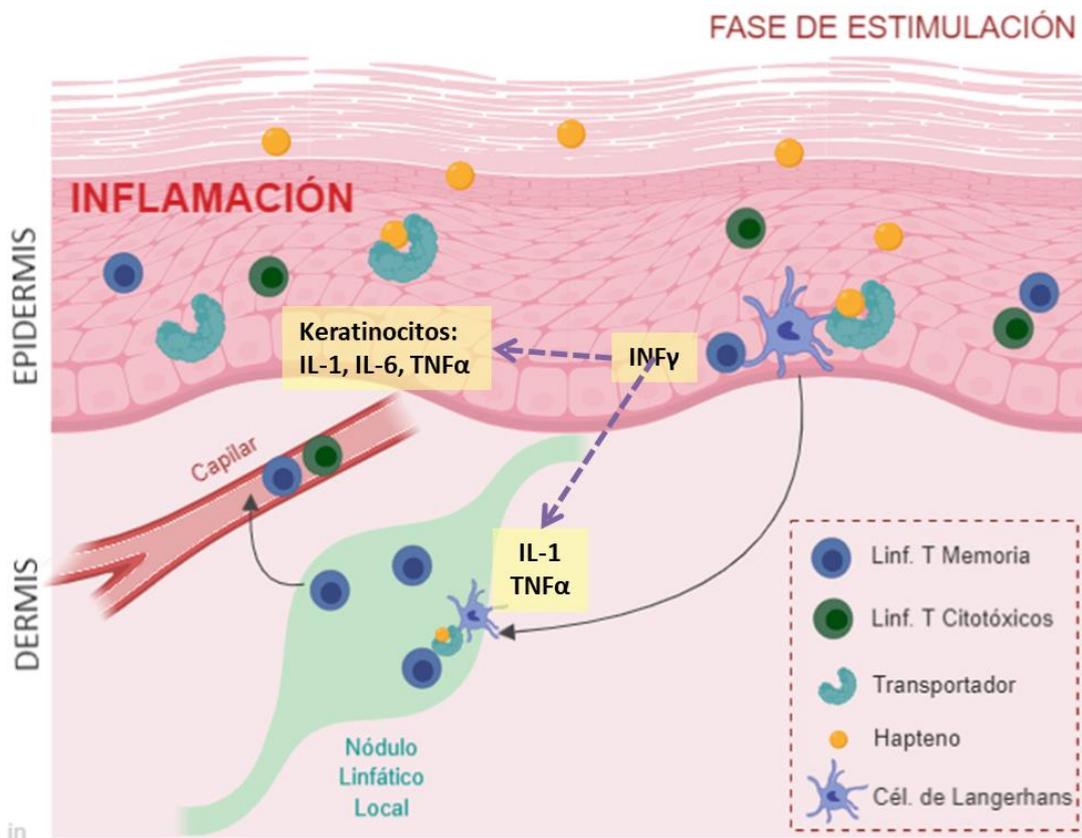


Figura 2. Fase de estimulación del proceso de sensibilización cutánea.

Dentro de este proceso de sensibilización se incluyen cuatro eventos clave (OECD, 2012):

1. El primer evento clave es la interacción molecular con las proteínas de la piel. El hapteno se une específicamente a residuos de cisteína y/o lisina. Esto se puede analizar con el ensayo *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA).
2. El segundo evento clave tiene lugar en los queratinocitos e incluye una respuesta inflamatoria y la expresión génica asociada con ciertas rutas de señalización celular como las dependientes del elemento de respuesta a estrés oxidativo (*Antioxidant Response Elements*; ARE). Esto se puede analizar mediante ensayos *in vitro* con la línea celular Keratinosens.
3. El tercer evento clave es la activación de las células dendríticas, que se puede analizar mediante un ensayo basado en la línea celular de leucemia monocítica humana (THP-1). Este ensayo recibe el nombre de *Human Cell Line Activation Test* (h-CLAT) y evalúa la expresión de marcadores de superficie en la línea celular THP-1.
4. El último evento clave es la proliferación de los linfocitos T, que se mide indirectamente mediante el ensayo del nódulo linfático local (LLNA), que es un ensayo *in vivo*.

## 1.2. Antecedentes del estudio de sensibilización cutánea

Tradicionalmente, el potencial sensibilizante de las sustancias se evaluaba utilizando modelos animales. Las cobayas han sido utilizadas, durante décadas, para realizar pruebas de sensibilización cutánea. Destacan el *Guinea Pig Maximisation Test* (GMPT), desarrollado en 1969 por Magnusson y Kligman y el Test de Buehler, ideado por su homónimo en 1965. En ambos métodos los animales se exponen inicialmente al producto a testar mediante aplicación epidérmica y/o inyección intradérmica. Este primer contacto actúa como inductor y, durante 10-14 días, se desarrollará la respuesta inmune asociada a la fase de inducción. Tras este periodo, los animales reciben la dosis de prueba en forma de parches en la piel, lo que desencadenará la fase de estimulación. Una vez transcurridas 30-48 horas de la aplicación del parche, se compara el grado y extensión de la reacción cutánea con animales control que no han sido sometidos al periodo de inducción (OECD, 1992).

Debido a que el sistema inmune de la cobaya no se ha estudiado en tanta profundidad como el del ratón, se desarrollaron también test murinos como el LLNA nombrado previamente. Es un método *in vivo* en el que se cuantifica la proliferación de los linfocitos como marcador de la fase de inducción en el proceso de sensibilización (OECD, 1992).

La técnica consiste en aplicar al ratón la dilución correspondiente del compuesto a testar en el dorso de cada oreja y repetir el proceso durante los primeros tres días. Tras dos días sin tratamiento, se lleva a cabo una inyección de timidina tritiada en la cola y, tras 5 horas se sacrifican los animales para obtener las células de sus nódulos linfáticos. El protocolo consiste en extraer el ADN celular y cuantificar las desintegraciones por minuto (DPM) ocasionadas por la timidina tritiada que haya podido ser incorporada en el ADN de los linfocitos durante la replicación de su material genético. Esta timidina marcada radiactivamente se incorporará únicamente en el ADN de las nuevas células que se están replicando. De este modo se puede determinar el nivel de proliferación linfocitaria que está teniendo lugar en los nódulos linfáticos como consecuencia de la exposición al compuesto a testar (OECD, 2010).

Como se centra exclusivamente en el estudio de la fase de inducción, en el LLNA no es necesario que se produzcan las reacciones de hipersensibilidad asociadas a la fase de estimulación, disminuyendo así el tiempo de duración del experimento. Además, con esta técnica no solo mejora el bienestar animal al reducir el tiempo de experimentación, sino que también se reduce el número de animales utilizado en comparación con las pruebas en cobayas (OECD, 2010).

Es por todo ello que, con la aparición del LLNA, se pasó a utilizar como técnica principal para el estudio de la sensibilización cutánea en cosmética y, en caso de obtener resultados positivos, se etiquetaba el producto como potencial sensibilizante. Si el resultado era negativo se repetía el compuesto utilizando una de las técnicas con cobayas nombradas previamente (OECD, 1992).

Un aumento de la demanda política y ética para reemplazar los experimentos animales, ha llevado a que fuera necesaria una regulación europea para evaluar la seguridad de ingredientes cosméticos sin ser testados *in vivo* (Hoffman et al., 2018). Desde 2004, con la Directiva 2003/15/CE, existe la prohibición en la Unión Europea (UE) de probar cosméticos acabados e ingredientes de los mismos utilizando modelos animales (UE, 2003). En 2009 entró

en vigor en la UE el Reglamento (CE) Nº 1223/2009 con el que se prohibió la comercialización de productos cosméticos que contuvieran ingredientes que hubiesen sido testados en animales. Por último, en 2013 se culminó la última fase para la eliminación de los ensayos de productos cosméticos *in vivo*, por lo que ya no se podía comercializar en la UE ningún producto cosmético que se hubiera experimentado en animales (UE, 2009). La prohibición se aplicó a todos los cosméticos comercializados en la UE, es decir, a los producidos dentro del marco europeo y a los importados (UE, 2009).

### 1.3. Métodos alternativos a la experimentación animal

En la actualidad, existen métodos alternativos a la experimentación animal que ya han sido descritos por la OECD y validados por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM). Entre ellos se encuentran el DPRA, un método *in chemico* que mide el agotamiento de péptidos sintéticos (primer evento clave), Keratinosens, un método *in vitro* basado en la activación de la ruta Keap-Nrf2-ARE (segundo evento clave) y h-CLAT, un método *in vitro* basado en la medición de marcadores de superficie asociados a la activación de las células dendríticas (tercer evento clave). Por el momento no se ha validado ningún método alternativo para el estudio del cuarto evento clave (OECD, 2012).

Debido a la complejidad del proceso de sensibilización cutánea y la dificultad que existe para reproducir todos los mecanismos en un único método *in vitro*, la aproximación más cercana a lo que ocurre en un modelo *in vivo*, se consigue con la aplicación de una combinación del conjunto de técnicas *in vitro* e *in chemico* que existen en la actualidad (Sakaguchi et al., 2009).

#### 1.3.1. Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): fundamento

Los haptenos son moléculas que actúan como electrófilos que tienden a unirse a los residuos de lisina y cisteína que se encuentran en las zonas nucleofílicas de las proteínas de la piel. El DPRA es un método *in chemico* que se basa en la cuantificación de la concentración de estos péptidos de lisina y cisteína que quedan libres tras haber sido incubados con las distintas sustancias a testar (Figura 3). Esta concentración relativa de péptido se cuantifica utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (OECD, 2015a).

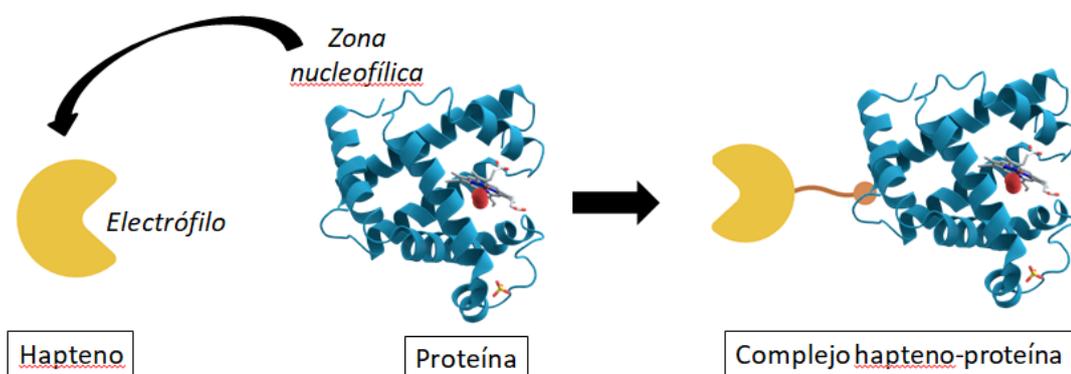


Figura 3. Formación del complejo hapteno-proteína.

### 1.3.2. Keratinosens: fundamento

Los keratinosens son células transfectadas con el gen de la luciferasa unido a un promotor que contiene las secuencia reguladora ARE (*Antioxidant Response Elements*) y al que se une Nrf2 (**Figura 4**). Nrf2 es un factor transcripcional que se encuentra unido a Keap1 en el citoplasma y que se activa en presencia de estrés oxidativo (entre otros factores). Esta activación provoca que se separe de Keap1 y viaje al núcleo para unirse al promotor de los genes regulados por las secuencia ARE. De esta forma cuando haya estrés oxidativo se transcribirán, no solo los genes de respuesta a estrés, sino también el gen de la luciferasa. Cuando los haptenos se unen a las proteínas transportadoras de la piel, son capaces de activar a los keratinocitos, uniéndose a Keap1 y rompiendo por tanto la unión de esta proteína a Nrf2. Cuando Nrf2 quede libre, se translocará al núcleo para ejercer su función como factor transcripcional. Al añadir luciferina, las células que hayan expresado el gen de la luciferasa bajo condiciones de estrés, serán capaces de oxidar este sustrato y convertirlo en oxiluciferina. Esta reacción produce energía luminosa que puede ser cuantificada con un luminómetro (OECD, 2015b).

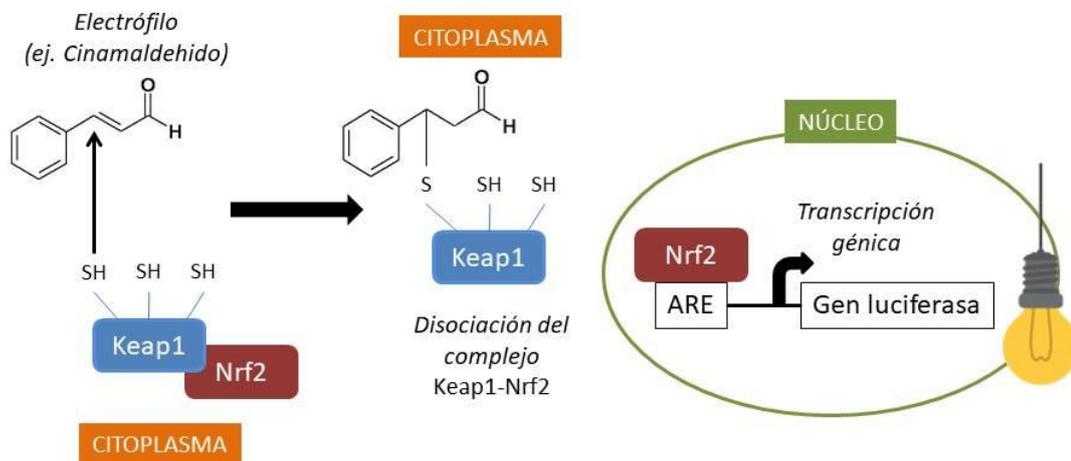


Figura 4. Inducción del gen de la luciferasa en Keratinosens

### 1.3.3. Human Cell Line Activation Test (h-CLAT): fundamento

El método de h-CLAT se basa en un ensayo *in vitro* en el que se cuantifican, mediante citometría de flujo, los cambios en la expresión de los marcadores de membrana CD86 y CD54 en la línea celular de monocitos humanos de leucemia (THP-1), tras exponerse a los compuestos a testar durante 24h (OECD, 2017) (Figura 5). Estas moléculas de superficie son típicas de la activación de las células dendríticas durante el proceso de sensibilización cutánea y juegan un papel fundamental en la activación de los linfocitos T. La razón por la que se utilizan monocitos como modelo y no células dendríticas es la dificultad que existe para obtener estas últimas a partir de sus precursores hematoyéticos. La línea THP-1 también expresa CD86 y CD54 en su membrana, por lo que mimetiza el proceso y sirve para determinar la activación celular tras la exposición a los compuestos (Sakaguchi et al., 2009).

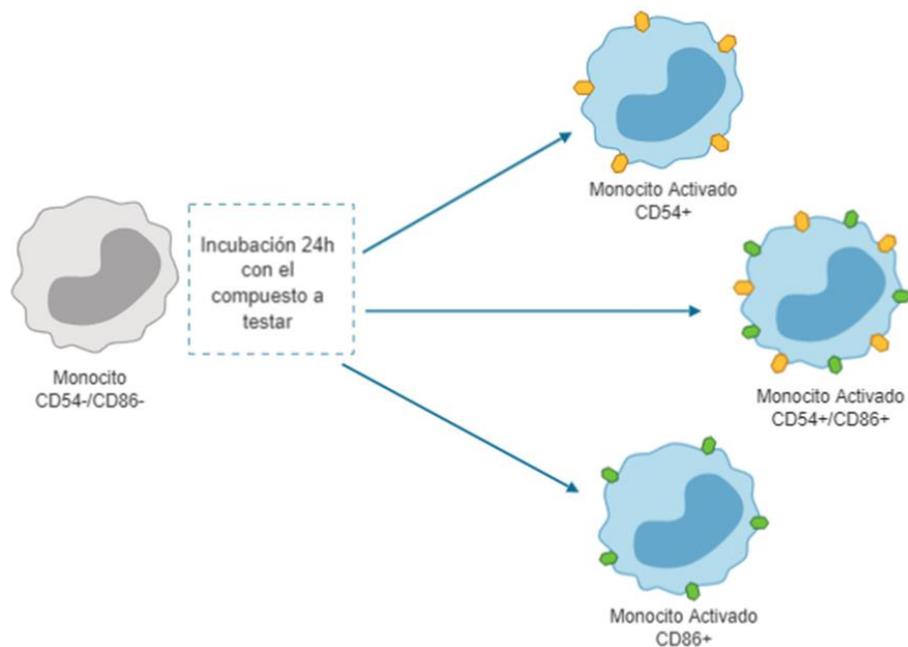


Figura 5. Activación de monocitos THP-1 en h-CLAT.

Para cada una de estas técnicas, la OECD proporciona una lista de compuestos para los que ya se han descrito los distintos parámetros necesarios para determinar su potencial sensibilizante. Cada uno de los compuestos se define como no sensibilizante, sensibilizante débil, moderado, fuerte o extremo. Antes de aplicar de forma rutinaria cualquiera de estos métodos alternativos en el laboratorio, se debe demostrar que se ha adquirido la capacidad de obtener los valores esperados para las sustancias recomendadas en las guías de la OECD.

Además de las técnicas expuestas en este trabajo, en la actualidad, existen aproximaciones que tratan de integrar todo el conocimiento recabado durante el desarrollo de estas técnicas con el fin de desarrollar un único ensayo que contemple los 4 eventos clave del proceso de

sensibilización cutánea. Es el caso del *loose-fit coculture-based sensitization assay* (LCSA), en el que se plantea un experimento basado en una capa de keratinocitos cocultivada con monocitos en suspensión en presencia de un cóctel de citoquinas (IL-4, GM-CSF y TGF- $\beta$ ). Se ha visto que, con el paso de los días, el cocultivo se transforma en un sistema sensible a alérgenos que consiste en keratinocitos activados y células dendríticas (Schreiner et al., 2007). A esta aproximación, se le añaden otros estudios (Frombach et al., 2018) donde se ofrece la opción adicional de añadir linfocitos al cocultivo (LCSA-ly) con el fin de tener presente el último evento clave del proceso de sensibilización cutánea. Hasta el momento el LLNA era la única técnica que, pese a ser *in vivo*, se centraba en la importancia de los linfocitos en este proceso inflamatorio. El LCSA-ly, además de estar basado en un estudio *in vitro*, no cuantifica la proliferación linfocitaria como lo hacía el LLNA, sino que propone la liberación de INF $\gamma$  por parte de los linfocitos activados como un nuevo parámetro para determinar el potencial sensibilizante.

#### **1.4. Modelo de predicción**

Para poder discriminar si un compuesto es o no sensibilizante, las técnicas descritas previamente deben ser llevadas a cabo en el laboratorio siguiendo una serie de criterios de aceptación para dar por válido cada uno de los experimentos. Por su parte, los resultados obtenidos para cada compuesto tendrán que cumplir ciertos requisitos para poder determinar si es o no sensibilizante cutáneo. Estos estudios suelen centrarse en una clasificación binaria (Natsch, 2014), es decir, la realización de uno de los métodos deberá respaldarse por los datos obtenidos, como mínimo, por una segunda técnica. Si una sustancia da positiva o negativa en al menos 2 de los distintos ensayos, se clasificará como sensibilizante o no sensibilizante respectivamente. Este hecho se debe a la gran complejidad del proceso de sensibilización, que no puede ser englobado en una única técnica *in vitro* y crea la necesidad de integrar distintas aproximaciones que representen diferentes eventos clave de la AOP (Roberts y Patlewicz, 2017).

##### **1.4.1. Determinación del potencial sensibilizante por DPRA**

Para poder dar como válido un experimento de DPRA se debe cumplir con los siguientes criterios de aceptación (OECD, 2015a):

- La curva de calibración de cada péptido debe tener una  $r^2 > 0,99$ .
- La media del porcentaje de disminución peptídica de las repeticiones para el control positivo (aldehído cinámico) debe estar entre 60,8% y 100% para el péptido de cisteína y entre 40,2% y 69% para el péptido de lisina. La desviación estándar (SD) no debe ser mayor del 14,9% en el caso de la disminución de cisteína y de 11,6% en el caso de la lisina.
- La concentración media del péptido en el control de referencia A debe ser de  $0,5 \pm 0,05$  mM y el coeficiente de variación (CV) para las áreas de los picos de los controles de referencia B y C en acetonitrilo debe ser  $< 15\%$ .
- La SD para los replicados del compuesto a testar debe ser  $< 14,9\%$  para el porcentaje de disminución peptídica de la cisteína y  $< 11,6\%$  para el de la lisina.

- La concentración media de los controles de referencia C en el solvente adecuado debe ser de  $0,5 \pm 0,05 \text{ mM}$ .

Para discriminar entre un producto sensibilizante y uno no sensibilizante, la técnica de DPRA se basa en el porcentaje de disminución peptídica tras la incubación con el compuesto (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Porcentajes de disminución peptídica para determinar el potencial sensibilizante de un compuesto.**

Media del % de depleción peptídica (Cisteína y Lisina)	Tipo de Reactividad	Predicción con DPRA
$0\% \leq \% \text{ depleción} \leq 6,38\%$	Reactividad mínima o nula	Negativo
$6,38\% \leq \% \text{ depleción} \leq 22,62\%$	Baja reactividad	Positivo
$22,62\% \leq \% \text{ depleción} \leq 42,47\%$	Reactividad moderada	
$42,47\% \leq \% \text{ depleción} \leq 100\%$	Alta reactividad	

#### 1.4.2. Determinación del potencial sensibilizante por Keratinosens

Para poder dar como válido un experimento de Keratinosens se debe cumplir con los siguientes criterios de aceptación (OECD, 2015b):

- La inducción de la actividad luciferasa ( $I_{\text{máx}}$ ) obtenida para el control positivo (aldehído cinámico) debe ser estadísticamente significativa con respecto al control negativo (solvente, DMSO) y estar por encima del umbral de 1,5 en al menos una de las concentraciones testadas en el experimento (de 4 a 64  $\mu\text{M}$ ).
- Teniendo en cuenta que el concepto de EC1.5 hace referencia a la concentración para la cual la  $I_{\text{máx}}$  es un 50% mayor que la del solvente, el valor de EC1.5 para el aldehído cinámico debe estar entre 7  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ . Además, la EC1.5 tiene que ser menor que la IC30, lo que indicará que existe una reducción de la viabilidad celular menor del 30%.
- La inducción promedio de las tres repeticiones para el aldehído cinámico a 64  $\mu\text{M}$  debería estar entre 2 y 8. Si no se cumple este último criterio, la relación dosis-respuesta del aldehído cinámico debe ser revisada cuidadosamente. En este caso, la prueba puede ser aceptada solo si existe una respuesta clara a la dosis, es decir, un aumento de la inducción de la actividad luciferasa a concentraciones crecientes del control positivo.
- Finalmente, el coeficiente de variación promedio de la lectura de luminiscencia para el control negativo (solvente, DMSO) debe estar por debajo del 20% en cada repetición que consta de 6 pocillos probados por triplicado. Si la variabilidad es mayor, los resultados deben descartarse.

Una vez dado por válido el experimento, para considerar un compuesto como sensibilizante mediante una predicción realizada por Keratinosens, se deben cumplir en, al menos 2 repeticiones del experimento, las siguientes cuatro condiciones (OECD, 2015b):

- La  $I_{\text{máx}}$  debe tener un valor mayor de 1,5 y ser estadísticamente significativa con respecto al valor obtenido del control negativo (solvente, DMSO).

- La viabilidad celular debe estar por encima del 70% para la concentración de compuesto más baja con una  $I_{m\acute{a}x}$  por encima del 1,5.
- El valor de la EC1.5 debe ser menor de 1000 $\mu$ M
- Debe haber una relación dosis-respuesta clara para la inducción de la luciferasa.

Así pues, si se obtienen resultados positivos para las dos repeticiones del experimento, la predicción basada en Keratinosens se considera positiva para el compuesto en cuestión. Del mismo modo, si los resultados son negativos, la predicción se considera negativa. Sin embargo, si no existe concordancia entre los resultados de los dos experimentos independientes, es necesario llevar a cabo una tercera repetición y la predicción final se basará en lo que indique la mayoría de los resultados de los tres experimentos independientes.

### **1.4.3. Determinación del potencial sensibilizante por h-CLAT**

Para poder dar como válido un experimento de h-CLAT hay que cumplir con los siguientes criterios de aceptación (OECD, 2017):

- Las viabilidades de los controles negativos, tanto con medio de cultivo como con DMSO deben ser mayores del 90%.
- En el control positivo 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB), además de no tener una viabilidad celular menor del 50%, los valores de la intensidad relativa de fluorescencia (RFI) para CD86 y CD54, deben estar por encima del 150% en el caso del CD86 y del 200% para el CD54. La RFI se calcula a partir de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MFI).

Para cuantificar la expresión de CD86 y CD54, cada compuesto se debe testar al menos dos veces para llegar a una predicción consistente, ya sea positiva o negativa. Con h-CLAT, un compuesto se considera positivo como sensibilizante cutáneo si cumple las siguientes condiciones en dos experimentos independientes (OECD, 2017):

- La intensidad relativa de fluorescencia (RFI) para CD86 es igual o mayor del 150% para cualquiera de las concentraciones testadas, con una viabilidad celular mayor o igual del 50%)
- La intensidad relativa de fluorescencia (RFI) para CD54 es igual o mayor del 200% para cualquiera de las concentraciones testadas, con una viabilidad celular mayor o igual del 50%)

Así pues, si las dos repeticiones del experimento son positivas para el marcador CD86 y/o CD54, la predicción basada en h-CLAT se considera positiva. Del mismo modo, si se obtienen resultados negativos para ambos marcadores, la predicción se considera negativa. Sin embargo, si los datos de los dos primeros experimentos no son concordantes para, por lo menos, uno de los marcadores, es necesario llevar a cabo una tercera repetición. En este caso, la predicción final se basará en lo que indique la mayoría de los

resultados de los tres experimentos independientes. Es importante destacar que en el caso de obtener un resultado positivo para CD86 en la primera repetición, uno positivo para CD54 en la segunda y la tercera repetición ser negativa para ambos marcadores, la predicción se considerará negativa. Por otro lado, si la tercera repetición es positiva para cualquiera de los dos marcadores o para ambos, la predicción por h-CLAT será positiva.

La extraordinaria demanda actual del mercado hacia la búsqueda de nuevos ingredientes cosméticos que todavía no han sido testados como sensibilizantes, se pretende responder mediante la diversificación hacia este campo de grupos de investigación dermatológica altamente equipados para ello.

En este trabajo se exponen los resultados de la puesta a punto de las técnicas DPRA, Keratinosens y h-CLAT para su aplicación en el laboratorio como tests de sensibilización cutánea en cosmética.

## **2. OBJETIVOS**

- Puesta a punto de la técnica *in chemico* DPRA para su utilización como test de sensibilidad cutánea en cosmética siguiendo los criterios de la OECD.
- Puesta a punto de la técnica *in vitro* Keratinosens para su utilización como test de sensibilidad cutánea en cosmética siguiendo los criterios de la OECD.
- Puesta a punto de la técnica *in vitro* h-CLAT para su utilización como test de sensibilidad cutánea en cosmética siguiendo los criterios de la OECD.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Cultivo Celular Rutinario**

#### **3.1.1. Keratinosens**

Para el cultivo rutinario de keratinosens (Givaudan Schweiz AG) se utilizaron frascos de 75cm<sup>2</sup> con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), low glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (Gibco, 11570586) 9,1% Fetal Calf Serum (FCS) (Amimed, 2-01F00-I) con Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (50mg/mL) (Gibco, 11558616) y se dejaron crecer hasta alcanzar el número celular deseado.

#### **3.1.2. THP-1**

Para el cultivo rutinario de la línea celular de monocitos humanos de leucemia (THP-1) (LGC Standards, ATCC-TIB-202) se utilizaron frascos de 175 cm<sup>2</sup> con medio RPMI-1640 (ATCC, 30-2001) suplementado con un 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, SV30160.03), con un cóctel de 100 unidades/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomina (Lonza, DE 17-602E). Las células se dejaron crecer hasta alcanzar el número celular deseado.

### 3.2. Compuestos a testar

De la lista de 10 compuestos propuestos por la OECD en sus guías para el estudio de la sensibilización cutánea, en este trabajo se seleccionaron los siguientes: para DPRA (OECD, 2015a) se testaron 3 compuestos: ácido láctico (Sigma Aldrich, W261114-1KG-K), bencilidenoacetona (Sigma Aldrich, W288101-SAMPLE-K), DNCB (Sigma Aldrich, 237329-10G). En Keratinosens (OECD, 2015b) se testaron 5 compuestos: ácido láctico (Sigma Aldrich, W261114-1KG-K), isopropanol (Sigma Aldrich, I9516-25ML), etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) (Sigma Aldrich, 335681-5ML), 4-metilaminofenolsulfato (Sigma Aldrich, 320013-100G), DNCB (Sigma Aldrich, 237329-10G) y, por último, para poner a punto la técnica de h-CLAT (OECD, 2017) se utilizaron también 5 compuestos: ácido láctico (Sigma Aldrich, W261114-1KG-K), isopropanol (Sigma Aldrich, I9516-25ML), sulfato de níquel (Sigma Aldrich, N4882-1KG), 4-fenildiamina (Sigma Aldrich, P6001-100G) y R(+)-limoneno (Sigma Aldrich, 183164-100ML).

### 3.3. *Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)*

Para llevar a cabo la técnica de DPRA se precisaron dos soluciones peptídicas preparadas en fresco antes del experimento, una con un péptido sintético de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) (Genosphere Biotechnologies) y otra con un péptido de lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) (Genosphere Bioechnologies). La solución de cisteína se preparó en tampón fosfato pH 7,5 a una concentración final de 0,667mM, mientras que la de lisina en tampón de acetato de amonio a pH 10,2 y a una concentración de 0,667mM. El compuesto a testar debe prepararse en un vial de cristal (Agilent Technologies, 5190-9062) a una concentración de 100mM. Las soluciones de cisteína y lisina se incubaron en viales de cristal con el compuesto a testar en una relación 1:10 para la cisteína y 1:50 para la lisina. La mezcla se permaneció en oscuridad a  $25\pm 2,5^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 2$  horas antes de llevar a cabo el análisis con el HPLC.

Se utilizaron 3 controles diferentes: Control de referencia A (determina la estabilidad de los controles de referencia a lo largo del tiempo. Se realiza con acetonitrilo y se usa para verificar la precisión de la curva de calibración para la cuantificación de péptidos), control de referencia B (para verificar que el solvente utilizado para disolver el producto químico de prueba no afecta al % de disminución peptídica del péptido. Se realiza con acetonitrilo y sus réplicas se inyectan al principio y al final de la prueba experimental para verificar la estabilidad del péptido durante el tiempo de análisis) y el control de referencia C (para verificar que el disolvente utilizado para disolver el producto químico no afecta al porcentaje de disminución peptídica. Se harán controles C por cada solvente utilizado para solubilizar los distintos productos químicos a testar). Además, se realizó un control de co-elución preparado únicamente con el compuesto a testar para asegurar que ninguno de los químicos testados tenía un tiempo de retención demasiado similar al de los péptidos de lisina y/o cisteína.

Para poder interpretar los resultados obtenidos se generó previamente una curva de calibrado para cada uno de los péptidos. Se utilizaron 6 diluciones seriadas estándar de la solución peptídica (0,667mM) para cubrir el rango de 0,534 a 0,0167mM.

Para monitorizar la disminución del péptido se utilizó un HPLC (Shimadzu 10AD) conectado a un detector UV (Shimadzu 10AV) para medir la absorbancia a una longitud de onda de 220nm. La columna utilizada fue una columna de fase reversa Zorbax SB-C-18 2,1mm x 100mm x 3,5 $\mu\text{m}$  (Agilent, 861753-902).

El sistema se equilibró a 30°C con una fase móvil compuesta por: 50% de fase A (0,1% (v/v) ácido trifluoroacético en agua) y un 50% de fase B (0,085% (v/v) ácido trifluoroacético en acetonitrilo). Para llevar a cabo el análisis se fijó un flujo de 0,35mL/min y un volumen de inyección de muestra de 10µL. Las condiciones del flujo se basaron en un gradiente lineal (**Tabla 2**) de un 10% a un 25% de acetonitrilo durante 10 minutos seguido de un rápido aumento a un 90% de acetonitrilo para eliminar posibles restos acumulados en la columna.

**Tabla 2. Condiciones del gradiente lineal del sistema de HPLC**

Tiempo	Flujo	%A	%B
0 min	0,35 mL/min	90	10
10 min	0,35 mL/min	75	25
11 min	0,35 mL/min	10	90
13 min	0,35 mL/min	10	90
13,5 min	0,35 mL/min	90	10
20 min	Final del análisis	-	-

La concentración de péptido de cisteína o lisina se determinó por el área del pico (área debajo de la curva) obtenido en el cromatograma e interpolando en la curva de calibrado correspondiente a cada péptido.

Por otro lado, el porcentaje de disminución peptídica fue calculado para cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Disminución peptídica} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Área del pico (muestra)}}{\text{Media del área de los controles C}} \right) \right] \times 100$$

### 3.4. Keratinosens

Una vez alcanzado el número celular deseado, se llevó a cabo la tripsinización con TrypLE™ Select Enzyme (1X) (Gibco, 12563029) y se sembraron a una concentración de 10.000 células/pocillo. Para cada estudio de 7 compuestos a testar se sembraron 4 placas de 96 pocillos, 3 opacas (Greiner Bio-One, 655083) y una transparente (Sigma Aldrich, CLS3595-50EA). Se incubaron durante 24 horas con DMEM 1% FCS sin antibióticos. A continuación las células se cultivaron con los productos químicos a testar en 12 concentraciones desde 2000µM a 0,98µM. Se llevó a cabo una incubación de 48h al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Pasado el tiempo de incubación, las placas opacas se utilizaron para la prueba de luciferasa y las transparentes para la prueba de viabilidad celular utilizando bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazol (MTT).

Para el ensayo de luciferasa se utilizó el kit Luciferase Assay System 10-pack (Promega, E1501) y el Passive Lysis 5X Buffer (Promega, E1941). Se realizaron dos lavados con DPBS (Biowest, L0615-500) para eliminar los restos de medio de cultivo y se llevó a cabo una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente en agitación tras añadir 20µl de solución de lisis en cada pocillo. Sin retirar la solución de lisis, se añadieron 50µl de sustrato y se midió la luminiscencia en un luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech).

La inducción de la actividad luciferasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$I_{m\acute{a}x} = \frac{L_{muestra} - L_{blanco}}{L_{solvente} - L_{blanco}}$$

$L_{muestra}$  = Lectura de luminiscencia en el pocillo del compuesto testado.

$L_{blanco}$  = Lectura de luminiscencia del pocillo que no contiene ni células ni compuesto.

$L_{solvente}$  = Es la media de las lecturas de los pocillos de control negativo, que contienen células y solvente (DMSO) pero no compuesto.

Para obtener la EC1.5 como valor comparativo de la inducción de la actividad luciferasa entre los diferentes compuestos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$EC1.5 = (C_b - C_a) \times \left( \frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

$C_a$  = Concentración menor (en  $\mu M$ ) con una  $I_{m\acute{a}x}$  mayor de 1,5.

$C_b$  = Concentración mayor (en  $\mu M$ ) con una  $I_{m\acute{a}x}$  menor de 1,5.

$I_a$  = Es el valor de  $I_{m\acute{a}x}$  para la concentración menor (en  $\mu M$ ) con una  $I_{m\acute{a}x}$  mayor de 1,5 ( $C_a$ ).

$I_b$  = Es el valor de  $I_{m\acute{a}x}$  para la concentración mayor (en  $\mu M$ ) con una  $I_{m\acute{a}x}$  menor de 1,5 ( $C_b$ ).

Para la prueba de viabilidad celular se reemplazó el medio de cultivo por 200 $\mu$ l de medio fresco DMEM 1% FCS sin antibióticos. A continuación, se añadieron 27 $\mu$ l de una solución de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma Aldrich, M2128-1G) (5mg/ml en DPBS) directamente a cada pocillo y se incubó durante 4 horas en oscuridad al 5% CO<sub>2</sub> y 37°C. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se añadieron 100 $\mu$ l de DMSO (Sigma Aldrich, 34869-1L-M). Se dejó la placa en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos en oscuridad. Tras este tiempo se midió la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro (Infinite M200, Tecan). Las medidas de absorbancia se utilizaron para calcular la viabilidad celular resultante de la incubación con el compuesto a testar:

$$Viabilidad\ Celular = \frac{(V_{muestra} - V_{blanco})}{(V_{solvente} - V_{blanco})} \times 100$$

$V_{muestra}$  = Lectura de la absorbancia del MTT en el pocillo del compuesto testado.

$V_{blanco}$  = Lectura de la absorbancia del MTT en el pocillo que no contiene ni células ni compuesto.

$V_{solvente}$  = Es la media de las lecturas de los pocillos de control negativo, que contienen células y solvente (DMSO) pero no compuesto.

Utilizando los valores de viabilidad celular obtenidos para las distintas dosis testadas de cada compuesto, se calculó la concentración mínima necesaria para provocar una disminución de la viabilidad celular del X% (50% y 30% para la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>30</sub> respectivamente).

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left( \frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

$C_a$  = Concentración menor (en  $\mu M$ ) con una reducción de la viabilidad mayor del X%.

$C_b$  = Concentración mayor (en  $\mu M$ ) con una reducción de la viabilidad menor del X%.

$V_a$  = Es el % de viabilidad a la concentración menor con una reducción de la viabilidad mayor del X% ( $C_a$ ).

$V_b$  = Es el % de viabilidad a la concentración mayor con una reducción de la viabilidad menor del X% ( $C_b$ ).

### 3.5. Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

Las células THP-1 se sembraron en placas transparentes de 24 pocillos (Corning, 3526) a una concentración de 500.000 células/pocillo. Las concentraciones de los distintos compuestos a testar se determinaron mediante un ensayo previo de citotoxicidad para conocer su CV75, es decir, la concentración de compuesto para la que se obtiene un 75% de viabilidad celular (25% de citotoxicidad). Se calculó utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Viabilidad Celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

$a$  = Valor mínimo de viabilidad celular por encima del 75%.

$c$  = Valor máximo de viabilidad por debajo del 75%.

$b$  y  $d$  = Concentraciones que dan lugar a los valores de viabilidad celular  $a$  y  $c$  respectivamente.

Conociendo la CV75 de cada compuesto, se calcularon las 8 concentraciones a testar: CV75 x 1,2 ; CV75 x 1 ; CV75/1,2 ; CV75/1,2<sup>2</sup> ; CV75/1,2<sup>3</sup> ; CV75/1,2<sup>4</sup> ; CV75/1,2<sup>5</sup> ; CV75/1,2<sup>6</sup>. Después de tratar las células con el compuesto, se incubaron durante 24h al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C.

Se llevó a cabo el bloqueo de los receptores Fc utilizando un tampón con globulina (Sigma-Aldrich, G2388-10G) al 0,01% en Staining Buffer (Invitrogen, 00-4222-26) durante 15 minutos a 4°C. La tinción con anticuerpos se realizó con los siguientes anticuerpos monoclonales anti-humano conjugados con fluoresceína isocianato (FITC): CD86 (Dako, F7205) en una proporción 3:25 (v/v) y CD54 (Dako, F7143) e IgG (Dako, X0927) en una proporción 3:50 (v/v), siendo éste último un control de isotipo. Cada anticuerpo se añadió a 8 muestras con las distintas concentraciones del producto, a un control negativo, a un control con DMSO y a un control positivo con DNCB. Tras una incubación de 30 minutos en oscuridad a 4°C, se realizaron dos lavados con Staining Buffer y se montó una placa transparente de 96 pocillos (Corning, 3590) añadiendo yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich, P4170-100MG) (1mg/mL) a cada uno de los pocillos donde se añadieron las muestras.

La intensidad de fluorescencia de los marcadores de superficie de las células THP-1 se analizó por citometría de flujo (BD LSR Fortessa X-20). El valor de la RFI se utilizó como indicador de la expresión de CD86 y CD54 y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$RFI = \frac{MFI \text{ de las cél. tratadas} - MFI \text{ del control de isotipo de las cél. tratadas}}{MFI \text{ de las cél. control} - MFI \text{ del control de isotipo de las cél. control}} \times 100$$

**MFI** = Media Geométrica de la intensidad de fluorescencia

Utilizando los valores de RFI de cada compuesto, se calculó la concentración mínima necesaria para inducir una respuesta sensibilizante positiva: RFI=150 para CD86 y RFI=200 para CD54. La primera es la concentración mínima estimada para obtener una RFI=150 [EC150 (CD86)] y la segunda es la concentración mínima estimada para una RFI=200 [EC200 (CD54)]. Para ello se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$EC150 \text{ (para CD86)} = B_{conc} + \left[ \frac{150 - B_{RFI}}{(A_{RFI} - B_{RFI})} \times (A_{conc} - B_{conc}) \right]$$

$$EC200 \text{ (para CD54)} = B_{conc} + \left[ \frac{200 - B_{RFI}}{(A_{RFI} - B_{RFI})} \times (A_{conc} - B_{conc}) \right]$$

**A<sub>conc</sub>** = Concentración menor (en µg/mL ) para la que se obtiene una RFI>150 (CD86) o 200 (CD54).

**B<sub>conc</sub>** = Concentración mayor (en µg/mL ) para la que se obtiene una RFI<150 (CD86) o 200 (CD54).

**A<sub>RFI</sub>** = Es el valor de RFI para la concentración más baja con un RFI>150 (CD86) o 200 (CD54)

**B<sub>RFI</sub>** = Es el valor de RFI para la concentración más alta con un RFI<150 (CD86) o 200 (CD54).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Estudio del potencial sensibilizante por DPRA

Para el estudio de la interacción existente entre los compuestos sensibilizantes y las proteínas de la piel, se llevó a cabo una incubación de 24 horas de los péptidos con cada una de las sustancias. Una vez transcurrido este tiempo, se inyectaron las muestras en el HPLC para determinar el porcentaje de péptido que quedaba libre. Se sabe que las moléculas de bajo peso molecular solo son capaces de inducir una respuesta inmune tras unirse covalentemente a proteínas (Weltzien et al., 1996), habiendo sido identificadas distintas reacciones químicas que determinan el mecanismo de acción biológico de la molécula en cuestión (Aptula y Roberts, 2006). Al ser los compuestos sensibilizantes moléculas electrofílicas se utilizan aminoácidos con grupos químicos nucleofílicos en su cadena lateral como la lisina (-NH<sub>2</sub>) y la cisteína (-SH) (Troutman et al., 2011).

En este trabajo se utilizaron el ácido láctico, la bencilidenoacetona y el DNCB para poner a punto la técnica de DPRA en el laboratorio. Se obtuvo el porcentaje de disminución peptídica de cada compuesto para ambos péptidos (**Tabla 3**) y se comprobó que los valores se

encontraban dentro de los rangos marcados por la OECD (OECD, 2015a). Cabe destacar que, tomando un porcentaje de 6,38% como valor límite para discriminar un compuesto no sensibilizante de uno sensibilizante, los resultados obtenidos para el ácido láctico, como ejemplo de compuesto no sensibilizante, se encuentran por debajo del umbral, mientras que sensibilizantes como la bencilidenoacetona y el DNCB se encuentran muy por encima del umbral de 6,38% (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Efecto de los compuestos de ensayo sobre los péptidos de cisteína y lisina

Compuesto	Potencial Sensibilizante	% disminución peptídica (cisteína)	% disminución peptídica (lisina)	Media % disminución peptídica
Ácido láctico	No sensibilizante	5,2% (Rango 0-7%)	4,27% (Rango 0-5,5%)	4,74%
Bencilidenoacetona	Sensibilizante moderado	89,97% (Rango 80-100%)	5,26% (Rango 0-7%)	47,62%
DNCB	Sensibilizante extremo	93,42% (Rango 90-100%)	19,84% (Rango 15-45%)	56,63%

#### 4.2. Estudio del potencial sensibilizante por Keratinosens

Ya es conocida la importancia de la ruta Nrf2-Keap1-ARE en el proceso de sensibilización cutánea (Natsch, 2010). La acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células tras haber entrado en contacto con un sensibilizante es una de las causas de la degradación del ácido hialurónico presente en la matriz extracelular, iniciando el proceso inflamatorio en la piel (Esser et al., 2012). Para prevenir este aumento de estrés oxidativo, Nrf2 es el encargado de inducir la transcripción de genes como *AKR1C2*, que da lugar a una reductasa relacionada con la prevención del estrés oxidativo (El Ali et al., 2013). Se ha visto que la eliminación del factor Nrf2 en ratones *knockout* da lugar a una disminución de la reacción sensibilizante cutánea (Kim et al., 2008) pero no a una desaparición total de los síntomas. La explicación de este hecho sigue todavía sin conocerse con exactitud, aunque se cree que puede tener relación con la afinidad de los haptenos a distintos residuos peptídicos y las rutas de señalización que son capaces de activar en los keratinocitos de la piel (Natsch, 2010).

En este trabajo se testaron 5 compuestos de la lista proporcionada por la OECD para el estudio del potencial sensibilizante con Keratinosens (OECD, 2015b): ácido láctico, isopropanol, 4-metilaminofenolsulfato, DNCB y EGDMA. Para cada uno ellos se testaron 12 concentraciones dentro de un rango de 0,98µM a 2000µM, tanto en el ensayo de viabilidad celular (MTT) como en el de la inducción de la luciferasa.

En la **Figura 6** se muestran los valores de viabilidad y de  $I_{m\acute{a}x}$  frente a las distintas concentraciones testadas para cada compuesto. La exposición de los keratinosens durante 48 horas a sustancias no sensibilizantes se sabe que no tiene un impacto significativo sobre la viabilidad celular ni sobre la inducción de la expresión del gen de la luciferasa mediado por Nrf2. Este es el caso del ácido láctico (**Figura 6A**) y el isopropanol (**Figura 6B**), donde se ha

comprobado que ni siquiera las concentraciones más altas provocan la muerte del cultivo celular ni un pico de señal de luminiscencia por encima del 1,5 necesario para ser considerado como positivo según los criterios de la OECD (OECD, 2015b). Por lo tanto, como se muestra en la **Tabla 4**, donde aparecen los valores obtenidos para los parámetros de estudio para cada uno de los experimentos independientes de cada compuesto, en el caso del ácido láctico y el isopropanol, no se pudo calcular su EC1.5, IC<sub>50</sub> ni IC<sub>30</sub>.

Para los compuestos sensibilizantes testados en este estudio (4-metilaminofenolsulfato, DNCB y EGDMA) se observó (**Figura 6**) una respuesta acorde a lo esperado por su potencial sensibilizante. EGDMA es un sensibilizante débil que no empezó a inducir la expresión de la luciferasa hasta que no se alcanzó una concentración de 125µM en el cultivo celular (**Figura 6E**). En cuanto a la viabilidad celular, tampoco se observó un efecto citotóxico a bajas concentraciones, pero sí a partir de 250µM y 500µM, donde coincide con el pico de máxima luminiscencia a 500µM. La explicación de que la viabilidad celular empieza a disminuir junto con la intensidad de luminiscencia tras haberse alcanzado el punto más alto de I<sub>máx</sub> se explica basándose en el hecho de que los keratinosens han alcanzado un alto nivel de estrés que ya no son capaces de revertir y empieza a disminuir su viabilidad en el cultivo. En el ensayo para EGDMA, el valor de EC1.5 para el aldehído cinámico no estaba dentro del rango para dar como válido el experimento (7-30µM) (OECD, 2015b), por eso se comprobó (**Figura 6F**) la existencia de una clara respuesta a la dosis, es decir, un aumento de la I<sub>máx</sub> conforme se aumentaban las concentraciones de aldehído cinámico en el medio de cultivo.

El 4-metilaminofenolsulfato es un sensibilizante fuerte, por lo que se observó una respuesta mucho más temprana (**Figura 6C**), en cuanto a dosis se refiere, en comparación con EGDMA. El pico de luminiscencia se alcanzó a una dosis de 31,25µM, coincidiendo con una disminución del porcentaje de viabilidad. Una vez se alcanzaron porcentajes de viabilidad cercanos al 0, la inducción de la luciferasa también fue nula, tal y como cabe esperar. Existe una gran diferencia entre el potencial del 4-metilaminofenolsulfato y el DNCB (**Figura 6D**), considerado un sensibilizante extremo. El DNCB es un compuesto para el que existen muchos estudios en los que lo han relacionado con la sensibilización cutánea a lo largo de las últimas décadas (Cassimos et al., 1980; Popov et al., 2011). Es una sustancia tan potente que a una concentración de 7,8µM ya no quedaron células vivas ni presencia de luminiscencia en el cultivo, la cual alcanzó su máximo a 3,9µM, justo antes de provocar una disminución drástica de la viabilidad y de la I<sub>máx</sub>.

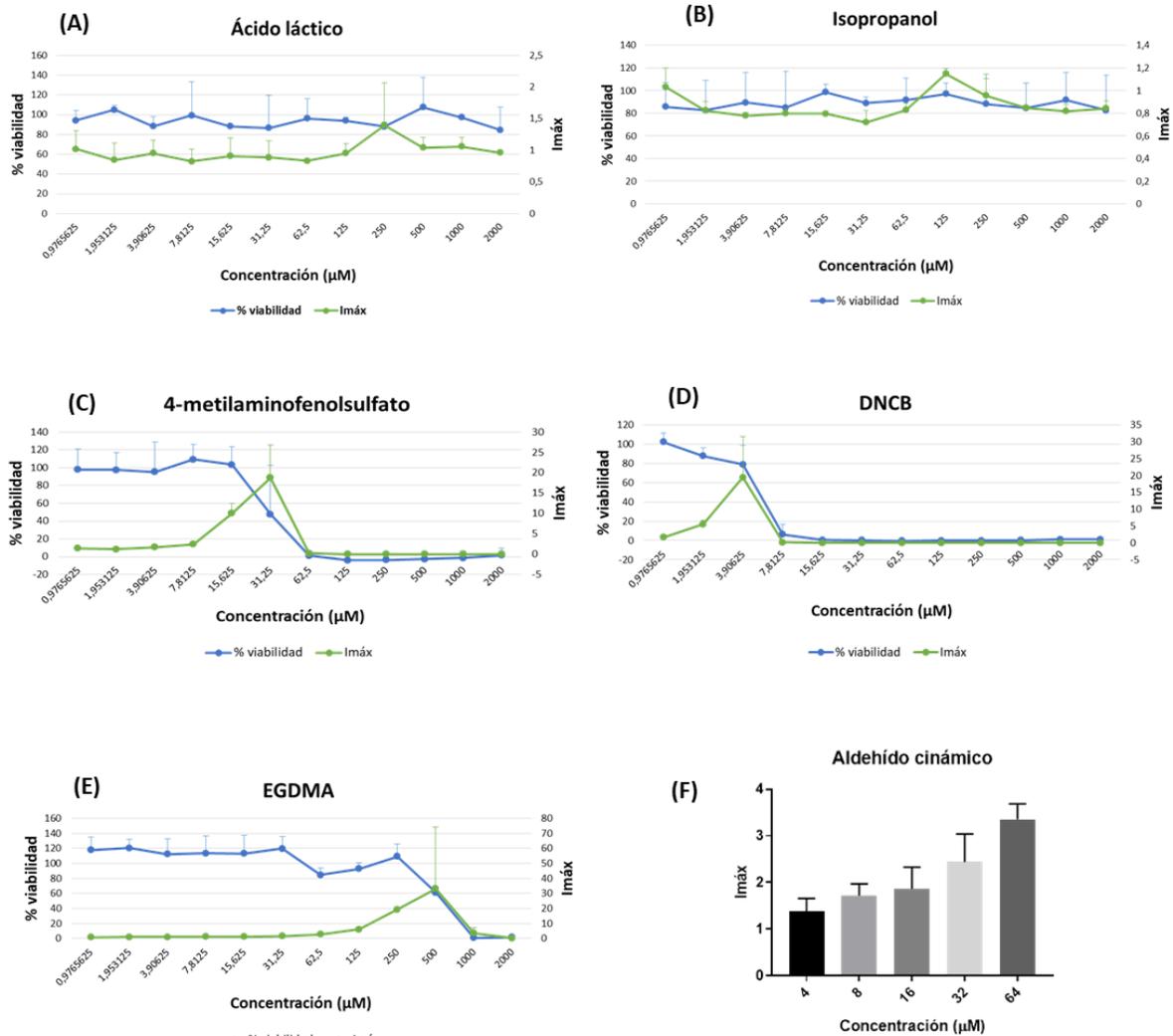


Figura 6. Efectos de los compuestos de ensayo sobre la línea celular keratinosens. Análisis de la expresión de luciferasa ( $I_{máx}$ ) y viabilidad celular tras una incubación de 48 horas con: ácido láctico (A), isopropanol (B), 4-metilaminofenolsulfato (C), 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) (D) y etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) (E). Los resultados se expresaron como la media de dos experimentos independientes  $\pm$  SD. (F) Análisis de la  $I_{máx}$  tras 48 horas de incubación con aldehído cinámico.

En la **Tabla 4** se muestra el análisis numérico ( $EC_{1.5}$ ,  $IC_{50}$  e  $IC_{30}$ ) de los datos obtenidos para cada compuesto, con el fin de poder comparar objetivamente su potencial sensibilizante. Una  $EC_{1.5}$  menor significa que esa sustancia precisa de una concentración más baja para dar lugar a una respuesta que aquellas que cuentan con una  $EC_{1.5}$  más elevadas. Del mismo modo, la  $IC_{50}$  e  $IC_{30}$  son también inversamente proporcionales al potencial sensibilizante de los compuestos.

**Tabla 4. Inducción de la luciferasa y citotoxicidad en el ensayo de Keratinosens para 5 compuestos.**

Compuesto	Potencial sensibilizante	Experimento	EC1.5 (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>30</sub> (μM)
Ácido láctico	No sensibilizante	1	>1000	>1000	>1000
		2	>1000	>1000	>1000
Isopropanol	No sensibilizante	1	>1000	>1000	>1000
		2	>1000	>1000	>1000
4-metilaminofenolsulfato	Sensibilizante fuerte	1	6,7	44,6	37,3
		2	3,9	25,3	22,4
DNCB	Sensibilizante extremo	1	0,2	6,0	5,0
		2	0,9	5,2	4,1
EGDMA	Sensibilizante débil	1	26,8	569,7	213,4
		2	37,8	610,8	474,5

Los resultados obtenidos coinciden con los mostrados en un estudio llevado a cabo por varios laboratorios de Europa y Estados Unidos para asegurar la reproducibilidad de la técnica (Natsch et al., 2011). A su vez, también cumplen con los criterios de aceptación marcados por la OECD en su guía referente a Keratinosens (OECD, 2015b).

#### **4.3. Estudio del potencial sensibilizante por h-CLAT**

En este trabajo se testaron 5 compuestos de la lista proporcionada por la OECD para el estudio del potencial sensibilizante con h-CLAT (OECD, 2017): ácido láctico, isopropanol, sulfato de níquel, 4-fenildiamina y R(+)-limoneno. Tras una estimulación de los monocitos THP-1 durante 24 horas con los distintos compuestos a testar, en ocho concentraciones diferentes basadas en su CV75, se llevó a cabo el análisis citométrico. Los resultados obtenidos evidencian los efectos de los químicos sobre la expresión de los marcadores de membrana CD86 y CD54 en las células. Se sabe que, para los casos en los que existe una respuesta positiva tras la incubación con los químicos a testar, se pueden apreciar tres patrones diferentes en función del compuesto: El primer patrón muestra un aumento de los dos marcadores (CD86 y CD54), el segundo se caracteriza por un aumento, únicamente de CD86, mientras en el tercero solo se observa la expresión de CD54 (Aiba et al., 1997).

En la **Figura 7** se pretende identificar la intensidad de fluorescencia emitida por CD86 y CD54 en la población viva de THP-1 para cada compuesto (PE-CY7 negativo). En los plots se hace referencia a FSC como la luz dispersada hacia delante por las células, que determina el tamaño y a SSC como la luz dispersada lateralmente y que determina su complejidad celular. Al representar la complejidad (SSC) frente al tamaño celular (FSC) se pueden seleccionar aquellos eventos que se consideran células y no los fragmentos celulares. Los picos que aparecen en estos plots muestran el número de eventos celulares que han pasado por el citómetro

(contaje) frente a la intensidad de fluorescencia detectada para cada uno de los marcadores (FITC-CD86/CD54).

En la **Figura 7B**, control positivo, se muestra el desplazamiento del pico hacia la derecha en el eje de abscisas, lo que indica un aumento en la expresión de los marcadores CD86 y CD54 en comparación con el control negativo (**Figura 7A**). El sulfato de níquel (**Figura 7C**) mostró un comportamiento similar al control positivo, algo que cabía esperar al ser un compuesto sensibilizante. Sin embargo, para el ácido láctico (**Figura 7D**), se obtuvieron resultados muy similares a los del control negativo, ya que no se detectó un aumento de la fluorescencia para ninguno de los dos marcadores.

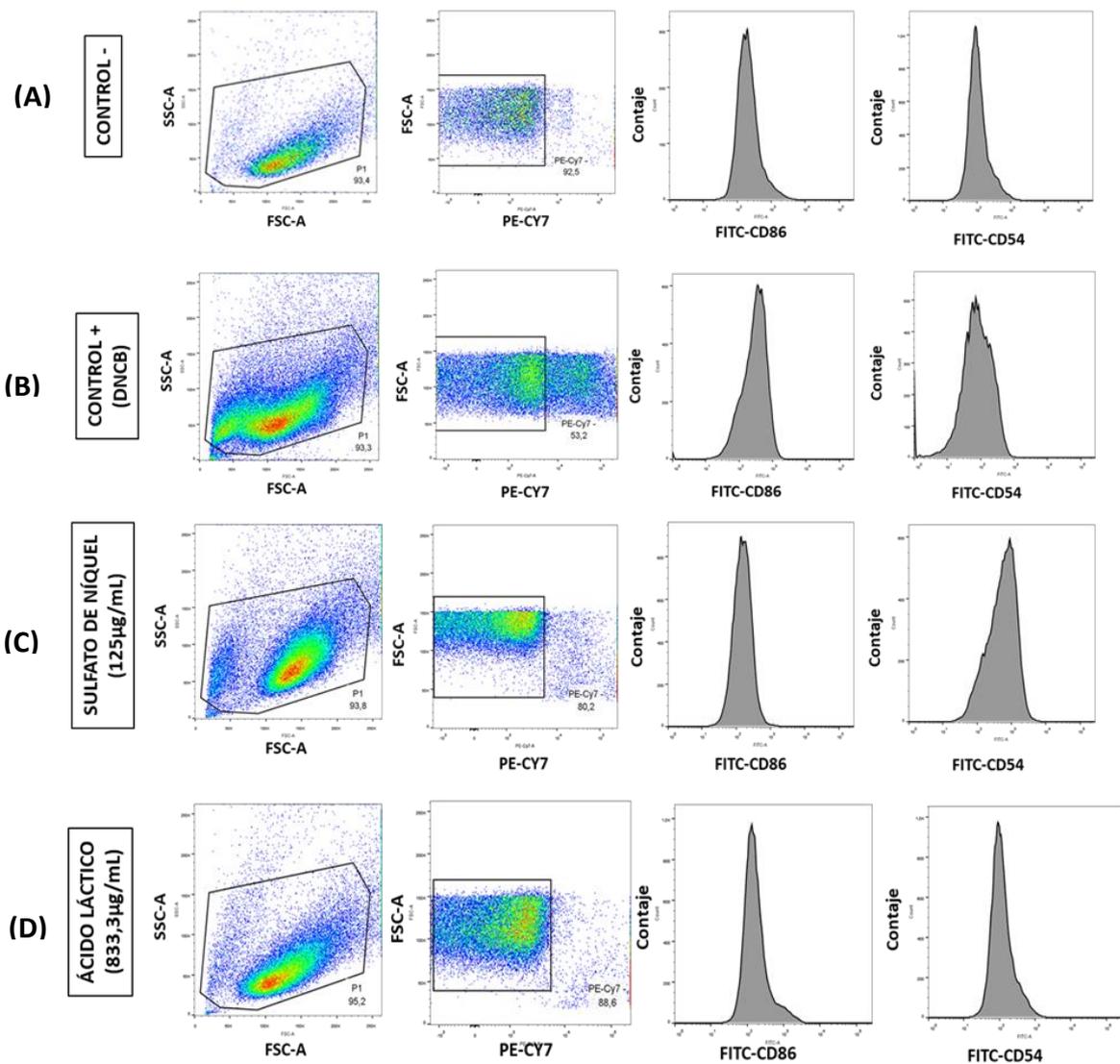


Figura 7. Análisis citométrico de la expresión de los marcadores de membrana CD86 y CD54 en monocitos THP-1 tras 24 horas de estimulación con los compuestos a testar: (A) control negativo; (B) control positivo (2,4-dinitroclorobenceno (DNCB)); (C) sulfato de níquel (125 µg/mL) y (D) ácido láctico (833,3 µg/mL).

En el estudio del potencial sensibilizante se observó una alteración de la expresión de CD86 y/o CD54 dependiente de dosis (**Figura 8**). Dependiendo del compuesto el patrón de expresión fue diferente. En el caso de compuestos no sensibilizantes como el ácido láctico (**Figura 8A**), los resultados obtenidos coincidieron con los marcados por la guía de la OECD, ya que se trata de un compuesto no sensibilizante con una RFI<150% para CD86 y RFI<200% para CD54. En lo que respecta a la viabilidad, para las 8 concentraciones testadas dentro del rango de 334,9µg/mL y 1200µg/mL, se obtuvo un porcentaje por encima del 50%, valor límite determinado por los criterios de aceptación de la OECD. Del mismo modo, siguiendo con los compuestos no sensibilizantes, el isopropanol (**Figura 8B**) no dio positivo para ninguno de los dos marcadores (RFI<150% para CD86 y RFI<200% para CD54). Los valores de viabilidad se encontraron dentro de los límites marcados por la OECD (OECD, 2017), ya que para ninguna de las concentraciones entre 1395,4µg/mL y 5000µg/mL dio por debajo del 50%.

El sulfato de níquel (**Figura 8C**), considerado como sensibilizante moderado y cumpliendo con los datos proporcionados por la OECD (OECD, 2017), dio resultados positivos para CD86 y CD54, ya que se obtuvo una RFI>150% para CD86 y una RFI>200% para CD54 en varias concentraciones testadas sin afectar significativamente a la viabilidad celular, que se mantuvo siempre por encima del 50%. Se estudió en un rango de 50,23µg/mL y 180µg/mL. A partir de estos resultados, se calculó la concentración mínima necesaria para que el sulfato de níquel indujera una respuesta sensibilizante positiva basándose en la expresión de CD86 (CD150=70±18,34µg/mL) y en la de CD54 (EC200=57,91±3,27µg/mL) (**Tabla 5**).

Continuando con los compuestos sensibilizantes, para la 4-fenildiamina (**Figura 8D**), considerado un sensibilizante fuerte, se obtuvieron, tal y como se esperaba (OECD, 2017), resultados positivos para CD86 (RFI>150%) pero negativos para CD54 (RFI<200%). Pese a la disminución de la viabilidad celular al aumentar la concentración de compuesto, se mantuvo dentro de los límites requeridos, ya que no disminuyó por debajo del 50% dentro del rango de 34,93µg/mL a 125,16µg/mL. Teniendo en cuenta el efecto sensibilizante evidenciado por la expresión de CD86, se calculó la EC150, dando una concentración mínima de 47,23±30,81µg/mL para que la 4-fenildiamina desencadene el proceso de sensibilización cutánea (**Tabla 5**).

Por último, para el R(+)-limoneno (**Figura 8E**), que es un sensibilizante débil, se obtuvieron resultados positivos para CD54 (RFI>200%) pero no para CD86 (RFI<150%). Los valores de viabilidad celular fueron óptimos (>50%) para todas las concentraciones testadas (de 292,37µg/mL a 1047,6µg/mL). Como para el resto de compuestos sensibilizantes, se calculó, a partir de los resultados de CD54 en este caso, la concentración mínima necesaria de R(+)-limoneno para inducir el proceso de sensibilización cutánea, obteniendo un valor de 986,04±78,92µg/mL para la EC200 (**Tabla 5**).

El cálculo de la EC200 y la EC150 sirve para poder comparar el potencial sensibilizante de los distintos compuestos testados en el estudio, puesto que un menor valor de cualquiera de estos dos parámetros indica que con una concentración menor de compuesto es capaz de inducir la misma respuesta sensibilizante que otro químico con una EC200 o EC150 más alta. Así pues, los resultados obtenidos (**Tabla 5**) son reflejo de ello, ya que la 4-fenildiamina es el sensibilizante más fuerte que fue testado y es el que cuenta con un valor menor de EC150. Del

mismo modo, el R(+)-limoneno presenta una EC200 considerablemente más alta al tratarse de un sensibilizante débil.

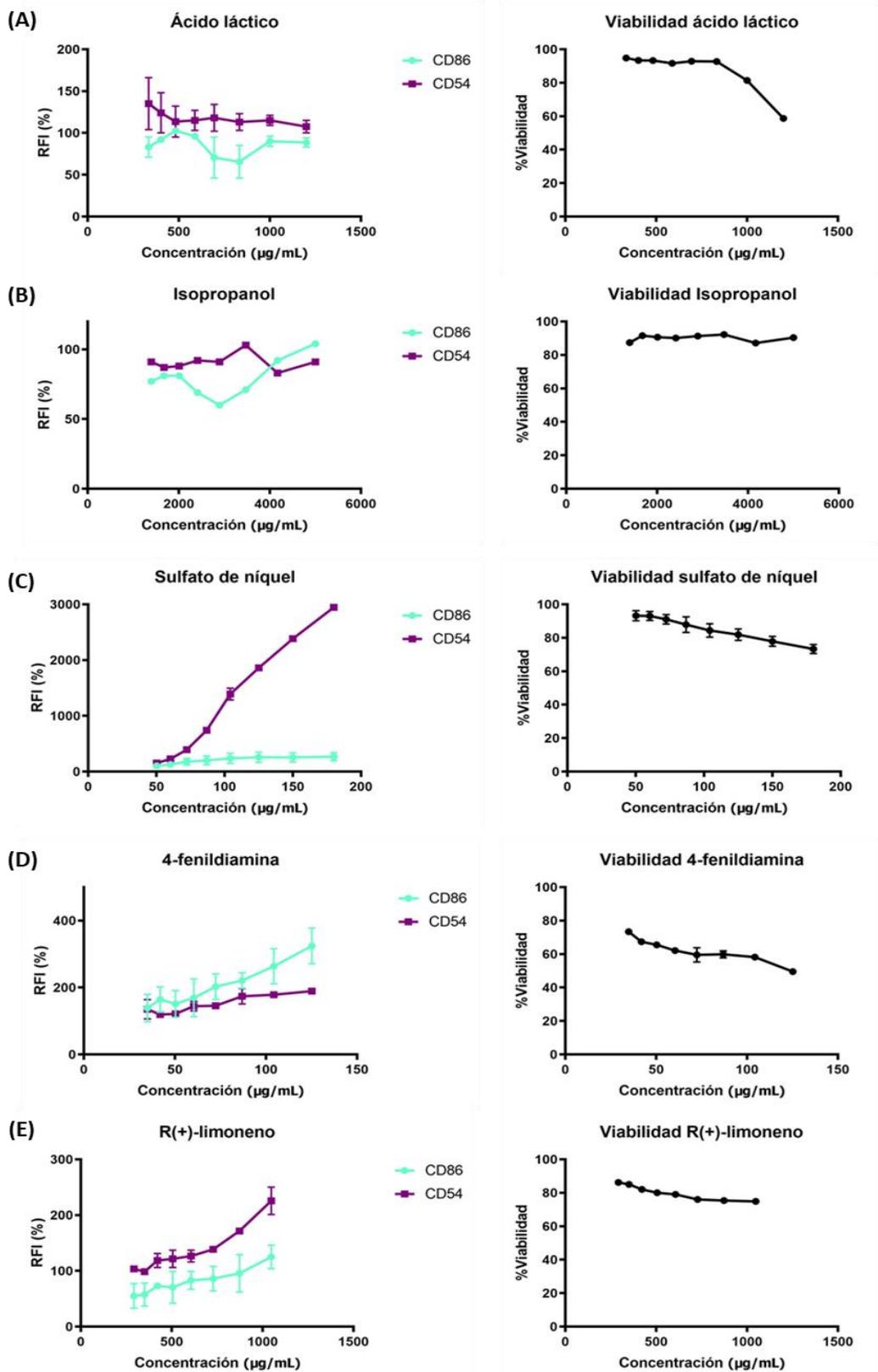


Figura 8. Efecto de los compuestos de ensayo sobre la línea celular THP-1. Análisis de la expresión de CD86, CD54 y viabilidad celular tras una incubación de 24 horas con: (A) ácido láctico; (B) isopropanol; (C) sulfato de níquel; (D) 4-fenildiamina y (E) R(+)-limoneno. Los resultados se expresaron como la media de dos experimentos independientes  $\pm$  SD.

Tabla 5. Resultados del potencial sensibilizante para los compuestos testados por h-CLAT.

Compuesto	Potencial sensibilizante	Resultados para CD86 (EC150)	Resultados para CD54 (EC200)
Ácido Láctico	No sensibilizante	Negativo	Negativo
Isopropanol	No sensibilizante	Negativo	Negativo
Sulfato de níquel	Sensibilizante moderado	<b>Positivo</b> (EC150=70±18,34µg/mL)	<b>Positivo</b> (EC200=57,91±3,27µg/mL)
4-fenildiamina	Sensibilizante fuerte	<b>Positivo</b> (EC150=47,23±30,81µg/mL)	Negativo
R(+)-limoneno	Sensibilizante débil	Negativo	<b>Positivo</b> (EC200=986,04±78,92µg/mL)

Aunque podría esperarse que tanto CD86 como CD54 se sobreexpresasen en presencia de cualquier compuesto sensibilizante, no todos son positivos para ambos marcadores. Esta diferencia de expresión tras la exposición de las células THP-1 a los distintos compuestos no está relacionada con su potencial sensibilizante (Sakaguchi et al., 2009), como demuestra la 4-fenildiamina que, pese a ser un sensibilizante fuerte, solo induce la sobreexpresión de CD86, mientras que el sulfato de níquel provoca un aumento de ambos marcadores teniendo un potencial moderado. Además, se ha observado en estudios *in vitro* que la clave reside en las diferentes rutas de señalización que activa cada uno de los compuestos testados. Miyazawa (2008) llevó a cabo un estudio *in vitro* de las cascadas de señalización que intervienen en la activación de la línea THP-1 tras la exposición a DNCB y a sulfato de níquel. La sobreexpresión de CD86 y CD54, así como la liberación del TNF $\alpha$  por parte de los monocitos activados dependen de cascadas de fosforilación en las que intervienen kinasas como ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) y p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*). El mecanismo de señalización utilizado por cada compuesto es diferente, ya que a pesar de inducir la fosforilación de ambas kinasas, se ha visto que en el caso del sulfato de níquel, la p38 MAPK tiene un papel importante en la expresión de CD86, pero no en la de CD54 ni del TNF $\alpha$ . En cambio, para el DNCB la p38 MAPK interviene en los tres procesos, mientras que la ERK solo participa en la expresión de CD86 y CD54 (Miyazawa et al., 2008).

Por todo ello, la utilización de dos marcadores de sensibilización diferentes da lugar a un método que aporta una mejor capacidad de predicción del potencial sensibilizante de los alérgenos que pueden causar DCA.

## **5. CONCLUSIÓN**

Las técnicas DPRA, Keratinosens y h-CLAT representan una nueva forma de determinar el potencial sensibilizante de los compuestos químicos en los que se basan muchos cosméticos hoy en día, todo ello sin necesidad de utilizar modelos *in vivo*. En este trabajo se ha evidenciado la capacidad predictiva de estos nuevos métodos alternativos y se han puesto a punto para su utilización en el laboratorio. Los resultados obtenidos servirán como base de una futura validación siguiendo los criterios de la OECD con el fin de poder dar un servicio a todas aquellas empresas que precisen testar nuevos ingredientes para sus cosméticos.

Cabe destacar que estas tres técnicas parecen ser solo el principio de un largo camino en la investigación de la sensibilización cutánea, ya que se están desarrollando distintas aproximaciones que integran todo el conocimiento recabado hasta ahora para desarrollar un único ensayo que contemple los 4 eventos clave de este proceso inflamatorio. Es el caso del LCSA y el LCSA-ly, que utilizan cocultivos de los distintos tipos celulares que participan en la aparición de la DCA para determinar el efecto de un compuesto en todas las fases de la sensibilización. Así pues, la puesta a punto de estas nuevas técnicas está dentro de los objetivos futuros del laboratorio.

Todas estas técnicas *in vitro* e *in chemico* brindan nuevas oportunidades en el ámbito de la investigación cosmética, permitiendo la disminución de los tiempos de experimentación en comparación con los estudios *in vivo*, una mayor aceptación social por parte de los colectivos que se posicionan en contra de la experimentación animal y la aparición de nuevas líneas de investigación dirigidas a desarrollar aproximaciones cada vez más exactas en la determinación del potencial sensibilizante de los compuestos cosméticos.

## 6. REFERENCIAS

Aiba, S., Terunuma, A., Manime, H. y Tagami, H. (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-estimulatory molecules. *European Journal of Immunology*, 27(11), 3031-3038.

Aptula, A.O. y Roberts, D.W. (2006). Mechanistic Applicability Domains for Nonanimal-Based Prediction of Toxicological End Points: General Principles and Application to Reactivity Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1097-1105. doi:10.1021/tx0601004.

Cassimos, C, Kanakoudi-Tsakalidis, F., Spyroglou, K., Ladianos, M. y Tzaphi, R. (1980). Skin sensitization to 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in the first months of life. *Journal of clinical & laboratory immunology*, 3(2), 111-3.

El Ali, Z., Gerbeix, C., Hemon, P., Esser, P.R., Martin, S.F., Pallardy, M. y Kerdine-Römer, S. (2013) Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicological sciences*, 131(1), 39-48. doi: 10.1093/toxsci/kft084.

Esser, P. R., Wölfle, U., Dürr, C., von Loewenich, F. D., Schempp, C. M., Freudenberg, ... , y Martin, S. F. (2012). Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One*, 7, e41340. doi: 10.1371/journal.pone.0041340.

Frombach, J., Sonnenburg, A., Krapohl, B., Zuberbier, T., Peiser, M., Stahlmann, R. y Schreiner, M. (2018). Lymphocyte surface markers and cytokines are suitable for detection and potency assessment of skin-sensitizing chemicals in an *in vitro* model of allergic contact dermatitis: the LCSA-ly. *Archives of toxicology*, 92, 1495-1505. doi: 10.1007/s00204-018-2164-5.

Henkel AG & Co. KGaA (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding Their Skin Sensitization Potential. *Cosmetics* 2016, 3(2), 14.

Hoffmann, S., Kleinstreuer, N., Alépée, N., Allen, D., Api, A. M., Ashikaga, T., ... Petersohn, D. (2018). Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetic Europe database. *Critical Reviews in toxicology*, 45(5), 344-358. doi: 10.1080/10408444.2018.1429385.

Kim, H. J., Barajas, B., Wang, M., y Nel, A. E. (2008). Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of TH1 immunity: role of dendritic cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 1255– 1261. doi: 10.1016/j.jaci.2008.01.016.

Miyazawa, M., Ito, Y., Kosaka, N., Nukada, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H. y Nishiyama, N. (2008). Role of MAPK signalling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO<sub>4</sub>. *The Journal of oxicological sciences*, 33(1), 51-9.

Natsch, A. (2010) The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences*, 113(2), 284-292. doi: 10.1093/toxsci/kfp228.

Natsch, A., Bauch, C., Foertsch, L., Gerberick, F., Norman, K., Hilberer, A., ..., Emter, R. (2011) The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the Keratinosens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: Results of a ring-study in five laboratories. *Toxicology in vitro*, 25(3), 733-44. doi: 10.1016/j.tiv.2010.12.014.

Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T. y Ellis, G. (2014). Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from Keratinosens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicological Sciences*, 143(2), 319-32. doi: 10.1093/toxsci/kfu229.

OECD, 1992. Test No. 406: Skin Sensitisation, Guideline for Testing of Chemicals. OECD Publishing

OECD, 2010. Test No. 429: Skin sensitization: local lymph node assay. OECD Publishing

OECD, 2012. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding for proteins. Part 1: scientific evidence. OECD Publishing

OECD, 2015a. Test No. 442C: *In chemico* skin sensitization: direct peptide reactivity assay (DPRA). OECD Publishing.

OECD, 2015b. Test No. 442D: *In vitro* skin sensitization: ARE-Nrf2 luciferase test method. OECD Publishing.

OECD, 2017. Test No. 442E: *In vitro* Skin Sensitization assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome pathway for Skin Sensitization. OECD Publishing.

Pichler, W.J. (2019). Immune pathomechanism and classification of drug hypersensitivity. *Allergy* 2019, 1-15. doi: 10.1111/all.137565.

Popov, A., Mirkov, I., Milikovic, D., Beli, S., Zolotarevski, L., Kataranovski, D. y Kataranovski, M. (2011). Contact allergic response to dinitrochlorobenzene (DNCB) in rats: insight from sensitization phase. *Immunobiology*, 216(7), 763-70. doi: 10.1016/j.imbio.2010.12.007.

UE. (2003). Directiva 2003/15/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 febrero de 2003, por la que se modifica la Directiva 76/768/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en materia de productos cosméticos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L66/26.

UE. (2009). Reglamento (CE) Nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L342/59.

REGLAMENTO (CE) No 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos.

Roberts, D.W. y Patlewicz, G. (2017). Non-animal assessment of skin sensitization hazard: Is an integrated testing strategy needed, and if so what should be integrated?. *Journal of Applied Toxicology*, 38(1), 41-50. doi: 10.1002/jat.3479.

Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Yoneyama, K., ... Suzuki, H. (2009). The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test – human cell line activation test (h-CLAT). *Cell Biology and Toxicology*, 25, 109-126. doi: 10.1007/s10565-008-9059-9.

Schreiner, M., Peiser, M., Briechle, D., Stahlmann, R., Zuberbier, T. y Wanner, R. (2007). A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy*, 62 (12), 1419-28. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01511.x

Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D.M., Choksi, N., ... Casey, W. (2015). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *Journal of Applied Toxicology*, 36(9), 1150-1162. doi: 10.1002/jat.3281.

Troutman, J.A., Foertsch, L.M., Kern, P.S., Dai, H.J., Quijano, M., Dobson, ... Gerberick, G.F. (2011). The incorporation of Lysine into the Peroxidase Peptide Reactivity Assay for Skin Sensitization Assessments. *Toxicological Sciences*, 122(2), 422-436. doi: 10.1093/toxsci/kfr101.

Weltzien, H. U., Moulon, C., Martin, S., Padovan, E., Hartmann, U. y Kohler, J. (1996). T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology*, 107(2), 141-151.