



Sensibilización dérmica: implementación del ensayo *in vitro* de activación de línea celular humana (hCLAT) para su evaluación

Constanza Silvera

Orientadora: Dra. Cecilia Abreu

Tesina de finalización de carrera - Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización en Biología Celular

Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR)

Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal

Institut Pasteur de Montevideo

Montevideo, Uruguay

Diciembre 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Cecilia Abreu, por el tiempo dedicado y la paciencia. Por haberme incentivado a crecer en el ámbito científico. Gracias por todo lo que me enseñaste durante este tiempo.

A Mariela Bolatti y Martina Crispo, por recibirme y darme la oportunidad de realizar este trabajo de finalización de carrera en el Institut Pasteur de Montevideo.

A todos los integrantes del Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal. Y, en especial, a las integrantes de la Unidad de Biología Celular, por el apoyo, la ayuda brindada y los buenos momentos.

A los integrantes del tribunal de corrección, por haber aceptado evaluar este trabajo.

A mi familia, por haberme apoyado en la decisión de seguir una carrera en ciencias y hacer siempre lo que me gusta.

A mi hermano, por hacerme reír y ser mi cable a tierra, en todos los momentos de mi vida.

A mi abuela, por inspirarme en el ámbito intelectual y como mujer.

A mis amigos, por estar siempre a mi lado y darme la confianza en mí misma que necesito.

LISTA DE ABREVIATURAS

AOP: Vía de Respuesta Adversa (*Adverse Outcome Pathway*).

ARE: Elemento de Respuesta Antioxidante.

CDs: Células Dendríticas.

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño (*Damage Associated Molecular Patterns*).

DCA: Dermatitis de Contacto Alérgica.

DCI: Dermatitis de Contacto Irritante.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNCB: 2,4-Dinitroclorobenceno.

DPRA: *Direct Reactivity Peptide Assay*.

FSC: *Forward Scatter*.

GUR: Tasa de Incorporación de Glucosa (*Glucose Uptake Rate*).

hCLAT: Ensayo de Activación de Línea Celular humana (*human Cell Line Activation Test*).

HSC: Hipersensibilidad de Contacto.

IL: Interleuquina.

IP: Ioduro de Propidio.

LPS: Lipopolisacárido.

MEC: Matriz Extracelular.

MFI: Intensidad de Fluorescencia Media geométrica.

MHC (I y II): Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clases I y II.

NLRs: *Nod-Like Receptors.*

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (*Organisation for Economic Co-operation and Development*).

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*).

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrón (*Pattern Recognition Receptors*).

RCF: Fuerza Centrífuga Relativa (*Relative Centrifugal Force*).

RFI: Intensidad de Fluorescencia Relativa.

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).

SSC: *Side Scatter.*

SI: *Stain Index.*

TCRs: Receptores de Células T (*T Cell Receptors*).

TLRs: *Toll-Like Receptors.*

TNCB: 2,4,6-Trinitroclorobenceno.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. <i>Generalidades de la dermatitis de contacto</i>	3
2.2. <i>Eventos clave del proceso de sensibilización dérmica</i>	4
2.2.1. Unión de haptenos a proteínas endógenas de la piel	5
2.2.2. Inducción de la expresión de genes asociados a diferentes vías de señalización intracelular en queratinocitos	5
2.2.3. Activación de células dendríticas.....	6
2.2.4. Proliferación de células T antígeno-específicas.....	10
2.3. <i>Métodos para la evaluación de la Sensibilización Dérmica</i>	11
2.3.1. Métodos <i>in vivo</i>	12
2.3.2. Métodos <i>in chemico e in vitro</i>	12
2.3.3. ¿Por qué surgen los enfoques alternativos al uso de animales de experimentación en el campo de la toxicología?: el principio de Reemplazo	16
2.4. Monitoreo del crecimiento celular y actividad metabólica de líneas celulares..	19
2.5. Análisis de contaminaciones para la validación de los resultados	20
3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	22
3.1. Objetivo General	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23

4.1. Mantenimiento y cultivo de células THP-1	23
4.1.1. Medio y condiciones de cultivo	23
4.1.2. Mantenimiento y propagación	23
4.1.3. Criopreservación de células THP-1	23
4.1.4. Procedimiento de descongelado de células THP-1	24
4.2. Generación de bancos celulares maestro y de trabajo	24
4.3. Caracterización de la línea celular THP-1 a través de una curva de crecimiento.....	25
4.3.1. Construcción de la curva de crecimiento, determinación del tiempo de generación y cálculo de la tasa de incorporación de glucosa	25
4.4. Ensayo de verificación de especie de líneas celulares basado en PCR	27
4.4.1. Condiciones de cultivo de líneas celulares de diferentes especies	28
4.4.1.1. Línea celular THP-1	28
4.4.1.2. Líneas celulares NIH/3T3, H9C2, CHOK1 y BHK	28
4.5. Ensayo de activación de línea celular humana (hCLAT).....	31
4.5.1. Medición de citotoxicidad: búsqueda de la concentración CV75	31
La concentración CV75 hace referencia a la concentración de reactivo que genera un 75% de viabilidad celular en el cultivo.....	31
4.5.1.1. Preparación del cultivo de células THP-1	31
4.5.1.2. Preparación de los compuestos a ensayar y de las sustancias control	31
4.5.1.3. Exposición de las células THP-1 a los reactivos a analizar y a las sustancias control	33

4.5.1.4.	Procesamiento de las células y medición de la citotoxicidad por citometría de flujo	34
4.5.1.5.	Estimación de la concentración CV75	35
4.5.2.	Medición de los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86	36
4.5.2.1.	Preparación del cultivo de células THP-1	36
4.5.2.2.	Preparación de los compuestos a ensayar y de las sustancias control	37
4.5.2.3.	Exposición de las células THP-1 a los reactivos a ensayar y a las sustancias control	39
4.5.2.4.	Marcación de las células THP-1 para el análisis por citometría de flujo....	40
	Marcación de las células THP-1	40
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1.	<i>Caracterización del crecimiento de la línea celular THP-1</i>	45
5.2.	<i>Ensayo de verificación de especie de líneas celulares basado en PCR</i>	49
5.2.1.	Extracciones de ADN genómico de líneas celulares.....	49
5.2.2.	Análisis de los productos de amplificación.....	50
5.2.3.	Validación del ensayo de verificación de especie de líneas celulares basado en PCR y análisis de la sensibilidad de los pares de cebadores utilizados	52
5.3.	<i>Ensayo de activación de línea celular humana (hCLAT).....</i>	57
5.3.1.	Medición de la citotoxicidad: búsqueda de la concentración CV75 para el Ácido Láctico y el DNCB	57

5.3.1.1.	Búsqueda de la concentración CV75 para el Ácido Láctico.....	59
5.3.1.2.	Búsqueda de la concentración CV75 para el DNCB.....	61
5.3.3.	Medición de la citotoxicidad: búsqueda de la concentración para otras sustancias analizadas	84
5.3.3.1	Búsqueda de la concentración CV75 para el Sulfato de Níquel (NiSO ₄) ..	84
5.3.3.2.	Búsqueda de la concentración CV75 para el Glicerol.....	85
5.3.3.3.	Búsqueda de la concentración CV75 para el Isopropanol	86
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	91
	ANEXO	102
	<i>A0: Composición de medios de cultivo, buffers y soluciones</i>	<i>102</i>
	A0.1. Medio de cultivo RPMI-1640 completo (THP-1).	102
	A0.2. Medio de cultivo DMEM completo.....	102
	A0.3. Solución de Congelado.....	102
	A0.4. Buffer TAE (0,5 X).....	102
	A0.5. Buffer de tinción.....	103
	A0.6. Solución de bloqueo	103
	<i>A1: Marcador de peso molecular</i>	<i>104</i>
	<i>A2: Tablas.....</i>	<i>105</i>

1. RESUMEN

La dermatitis de contacto alérgica es una reacción de hipersensibilidad, modulada por el sistema inmune, que ocurre en individuos susceptibles luego de que una sustancia alergénica xenobiótica entra en contacto con la piel, donde ocurre una primera fase de sensibilización cutánea. Estas sustancias xenobióticas generalmente son químicos orgánicos de bajo peso molecular (haptenos) o iones metálicos que penetran en la piel. El proceso de inducción de sensibilización dérmica incluye cuatro eventos clave: la unión de haptenos a proteínas endógenas de la piel; la inducción de la expresión de genes asociados a diferentes vías de señalización intracelular en queratinocitos; la activación de células dendríticas (CDs) y finalmente, la proliferación de células T antígeno-específicas.

Contar con la información sobre el potencial de sensibilización de nuevas sustancias o formulaciones es esencial para la protección de la salud y el medioambiente y un requisito imprescindible para su comercialización.

Tradicionalmente, la evaluación de la sensibilización dérmica involucró el uso de animales de experimentación. En respuesta a la tendencia mundial existente hacia el reemplazo de ensayos realizados en animales de experimentación por metodologías alternativas y a medida que se genera conocimiento sobre los procesos celulares y moleculares que conducen a una determinada respuesta celular por exposición a compuestos químicos, surge el desarrollo de metodologías *in vitro* e *in chemico* para poner a prueba diferentes etapas de la respuesta biológica en cuestión.

En particular, en este trabajo se buscó comenzar con la implementación de un ensayo *in vitro* que evalúa el tercer evento clave de la sensibilización dérmica y que se denomina ensayo de Activación de Línea Celular humana (hCLAT). Este ensayo emplea la línea celular THP-1 para estudiar el efecto de concentraciones subtóxicas de una sustancia en la

expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD54. En esta tesis se evaluó la citotoxicidad sobre la línea celular THP-1 de cinco de las diez sustancias de competencia que una guía validada internacionalmente recomienda para la implementación de este ensayo y se analizaron los cambios en los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD54 y CD86 tras la exposición de estas células a dos de estas sustancias, el 2,4-dinitroclorobenceno y el ácido láctico, recomendados como control positivo y negativo de sensibilización dérmica por la guía.

Para asegurar la calidad de la línea celular empleada, previo a la puesta a punto del ensayo *in vitro*, se realizó una curva de crecimiento, se estimó el tiempo de generación de la línea celular THP-1, se registraron los cambios en las concentraciones de glucosa y lactato a medida que transcurrió el tiempo en un cultivo discontinuo y se estimó la tasa de incorporación de glucosa por parte de estas células.

Adicionalmente, se buscó implementar un ensayo basado en PCR para la verificación de la especie de origen de líneas celulares, el cual puede ser utilizado para la detección de contaminación cruzada con líneas celulares de diferentes especies. Se logró poner a punto las condiciones óptimas de las distintas PCRs y se comenzó a trabajar en el análisis de la especificidad de especie y sensibilidad de detección de las mismas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades de la dermatitis de contacto

La dermatitis de contacto es una afección cutánea de carácter inflamatorio y mediada por células T que se caracteriza por la presencia de lesiones eritematosas y pruriginosas producidas después del contacto con un alérgeno (Peiser et al., 2012). Esta condición puede ser categorizada como irritante o alérgica. La dermatitis de contacto irritante (DCI) hace referencia a la irritación de la piel después del contacto con una sustancia, generalmente de manera inmediata. La dermatitis de contacto alérgica (DCA), sin embargo, es una reacción de hipersensibilidad, modulada por el sistema inmune, que ocurre luego de que una sustancia alergénica xenobiótica entra en contacto con la piel, donde ocurre una primera fase de sensibilización cutánea y los cambios en este órgano son visualizados tras una reexposición a la misma sustancia, durante la fase de la DCA conocida como establecimiento de la reacción inmunológica. La DCA suele ocurrir en individuos genéticamente susceptibles que previamente hayan sido sensibilizados con determinado alérgeno, en contraposición a la DCI, que puede ocurrir en cualquier persona si la concentración del químico irritante y la duración de la exposición son suficientes para causar daño directo en queratinocitos (Mark y Slavin, 2006).

En cuanto a las sustancias sensibilizadoras cutáneas, que se definen como tal si generan una respuesta alérgica tras su contacto con la piel (United Nations, 2015), generalmente son químicos orgánicos de bajo peso molecular (haptenos) o iones metálicos que penetran en la piel. La penetración de estos químicos alergénicos a través de la barrera cutánea se ve facilitada por defectos genéticos como mutaciones en la proteína filagrina (FLG), que agrega filamentos de queratina y es importante en la formación del estrato córneo de la epidermis.

Estas mutaciones incrementan de manera sustancial la susceptibilidad de los individuos a la DCA, como ha sido demostrado para el caso del níquel (Ni^{2+}) (Novak et al., 2008).

2.2. Eventos clave del proceso de sensibilización dérmica

El proceso de inducción de sensibilización de la piel con el consecuente desarrollo de la dermatitis de contacto alérgica incluye cuatro eventos clave: la unión de haptenos a proteínas endógenas de la piel (Figura 1.1); la inducción de la expresión de genes asociados a diferentes vías de señalización intracelular en queratinocitos (Figura 1.2); la activación de células dendríticas (CDs) (Figura 1.3) y finalmente, la proliferación de células T antígeno-específicas (Figura 1.4).

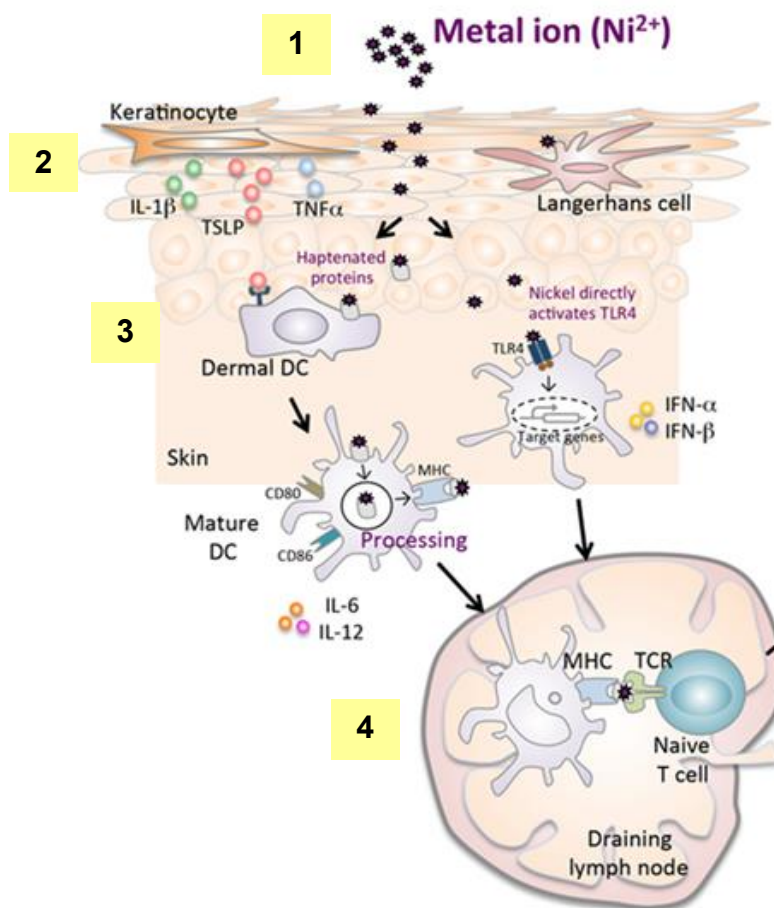


Figura 1. Fases del proceso de inducción de sensibilización dérmica. Imagen modificada de Saito et al., 2016.

2.2.1. Unión de haptenos a proteínas endógenas de la piel

Una vez en la epidermis viable o en la dermis, los compuestos alergénicos orgánicos electrofílicos reaccionan con centros nucleofílicos en las proteínas extracelulares y celulares de la piel, uniéndose de manera covalente a las mismas. Para el caso de iones metálicos, la unión a proteínas de la piel ocurre a través de la formación de complejos que involucran enlaces de coordinación. Sin embargo, no todos los haptenos alergénicos que logran penetrar en la piel tienen estas características reactivas, algunos deben ser activados metabólicamente (pro-haptenos). Se ha descrito que son usados sistemas de transporte de las células de la piel, como los queratinocitos, para la captación de estos haptenos y para la liberación de los mismos luego de su activación, la cual es estimulada por el propio alérgeno (Heise et al., 2010; Skazik et al., 2011).

Esta unión covalente de los alérgenos de contacto a las proteínas de la piel imita modificaciones postraduccionales convencionales o las previene, alterando la función y/o localización de estas proteínas. Además, esta unión genera la exposición de epítopes crípticos en las proteínas de la piel. Esto último ha sido discutido como un mecanismo para la generación de autoantígenos contra los cuales no se ha generado tolerancia (Peiser et al., 2012; Doyle y Mamula, 2012).

2.2.2. Inducción de la expresión de genes asociados a diferentes vías de señalización intracelular en queratinocitos

Existen mecanismos que permiten neutralizar el estrés celular provocado por compuestos oxidantes y electrofílicos (Kensler et al., 2007). Uno de estos mecanismos es la inducción de genes regulados mediante el elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Nguyen et al., 2003). Se ha reportado que la gran mayoría de los sensibilizadores de contacto inducen la

expresión de genes regulados vía ARE (Natsch y Emter, 2008). Esta respuesta consta de tres componentes esenciales: a) el elemento ARE, una secuencia regulatoria presente en una única o en múltiples copias corriente arriba de los genes que regula; b) el Factor Nuclear Eritroide-2/Relacionado-2 (Nrf2), principal factor de transcripción que heterodimeriza con miembros de la familia de factores de transcripción Maf. Este complejo Nrf2/Maf se une al elemento ARE y recluta la maquinaria de transcripción necesaria para la expresión de los genes regulados por ARE, y c) la proteína 1 de asociación a Kelch (Keap1), un represor proteico citosólico que se une a Nrf2, reteniéndolo en el citoplasma y promoviendo su ubiquitinación y degradación vía proteosoma. La proteína Keap1 posee varios residuos de cisteína con los cuales los sensibilizadores de contacto electrofílicos pueden reaccionar, resultando en la modificación covalente de Keap 1. Esto desencadena la disociación de Nrf2 de Keap1 y, por lo tanto, la expresión de los genes regulados por ARE (Nguyen et al., 2003; Motohashi, et al., 2002; Itoh et al., 1999). Algunos de los genes regulados por ARE en queratinocitos son: el gen de la interleuquina 8 (IL-8), el gen de la NADPH deshidrogenasa, entre otros. La inducción de la vía Nrf2 por sensibilizadores de contacto no ocurre solamente en queratinocitos, sino que se reproduce en diferentes tipos celulares, incluyendo CDs (Gęgotek y Skrzydlewski, 2015; Nastch, 2009).

2.2.3. Activación de células dendríticas

Luego de la penetración de estas moléculas xenobióticas en la piel, ocurre la activación del sistema inmune innato, lo que conlleva a la inflamación de la piel (denominada xenoinflamación cuando es desencadenada por este tipo de moléculas). Estudios en el modelo de hipersensibilidad de contacto (HSC) (modelo murino de DCA), han demostrado la capacidad de estos compuestos xenobióticos de causar inflamación debido a su actividad auto-adyuvante en ausencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)

(inflamación estéril) (Martin et al., 2008). Descubrimientos recientes mostraron la capacidad de algunos de estos químicos alergénicos de activar receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), imitando los mecanismos de activación del sistema inmune innato que son desencadenados por la entrada de microorganismos patógenos a través de rupturas en las barreras físicas del organismo.

La señalización a través de PRRs (tanto a través de TLRs como de NLRs) en células de Langerhans (CDs de la piel) genera un incremento en la expresión de moléculas de superficie co-estimuladoras como CD80, CD86, CD54 y un aumento transitorio en la actividad fagocítica de estas células. Además, como resultado de esta señalización por PRRs en células CDs, se da la expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias que son necesarias para que ocurra el fenómeno de xenoinflamación. Sumado a esto, la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 es positivamente regulada en respuesta a esta señalización, lo que contribuye a la migración por quimiotaxis de las CDs activadas al ganglio drenante. (Murphy, 2014).

Uno de los descubrimientos recientes más importantes ha sido la identificación del níquel (Ni^{2+}), el alérgeno de contacto de mayor relevancia en humanos, como un activador directo del receptor *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) humano (Schmidt et al., 2010). En el caso del Ni^{2+} , tres residuos de histidina del TLR4 humano median la respuesta al mismo. El TLR4 forma un homodímero en presencia de lipopolisacárido (LPS) (ligando del TLR4), en el cual se forma un clúster de seis residuos de histidinas, correspondientes a los mencionados anteriormente. El cross-linking mediado por níquel de los monómeros del receptor a través de las cadenas laterales de estos residuos de histidina genera la formación de un homodímero de TLR4 humano estructuralmente similar al dímero inducido por LPS. La dimerización del TLR4 desencadena cascadas de señalización intracelular que conllevan a la activación del factor de transcripción NF- κ B, induciendo la expresión de proteínas pro-

inflamatorias, como la pro-interleuquina 18 (IL-18) y la pro-interleuquina 1 beta (pro IL-1 β) (Schmidt et al., 2010). En ratones, sin embargo, estos tres residuos de histidina no están presentes en el TLR4. Esto explicaría por qué el Ni²⁺ no conlleva al desarrollo de HSC en ratones (Martin et al., 2011; Schmidt et al., 2010).

Para el caso de los alérgenos orgánicos, se ha descrito que no activan completamente CDs humanas o murinas *in vitro*. La exposición *in vitro* de CDs a sensibilizadores de contacto como el 2,4,6-trinitroclorobenceno (TNCB) no provoca la producción de citoquinas pro-inflamatorias dependientes de la activación de NF- κ B pero sí lleva a la regulación positiva de la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86, CD80 y CD54, entre otras (Martin et al., 2008). Esto podría estar poniendo en evidencia la relevancia de las señales de peligro que sólo son provistas en el microambiente tisular para la inducción de la respuesta alérgica (Powell y Horton, 2005; Scheibner et al., 2006; Lutz y Schuler, 2002). Lo que muestra que, en la evaluación de una sustancia, la utilización de más de un método *in vitro* que sean complementarios permite obtener mayor asertividad en la determinación de una sustancia como sensibilizadora o no sensibilizadora dérmica.

Los alérgenos de contacto orgánicos disparan mecanismos de estrés oxidativo y mecanismos de respuesta antioxidante (Matsue et al., 2003; Kim et al., 2008; Natsch y Emter, 2008). Un estudio reveló que el alérgeno orgánico 2,4,6-trinitroclorobenceno (TNCB) provoca la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ROS), la despolimerización oxidativa del ácido hialurónico de la matriz extracelular (MEC) inducida por ROS y la degradación de esta macromolécula de alto peso molecular en fragmentos pequeños a través de la acción de la enzima hialuronidasa en piel humana y murina. Adicionalmente, se detectó una regulación positiva en la actividad de la hialuronidasa por parte de sensibilizadores de contacto orgánicos (Esser et al., 2012). De esta forma, aparecen

en el microambiente del tejido cutáneo patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), los cuales constituyen activadores endógenos de los receptores TLR4 y TLR2 en la piel y son fundamentales en el proceso de xenoinflamación que es requerido para la fase de sensibilización de la DAC (Esser et al., 2012; Ågren et al., 1997). Además, los alérgenos de contacto pueden provocar la liberación de ATP mediante procesos activos o fugas pasivas desde queratinocitos y células dendríticas. El incremento de la concentración extracelular de nucleótidos como el ATP liberados por células dañadas bajo condiciones de estrés también constituye una señal de peligro endógena (DAMP). Esta liberación de ATP en la piel provocada por los alérgenos de contacto, permite la activación del NLRP3 inflamasoma. La activación del mismo es dependiente de la señalización por NLRs (*Nod-Like Receptors*) y de la apertura del receptor purinérgico P2X7R, el cual es un canal iónico modulado por ligando (ATP) (Watanabe et al., 2007; Sutterwala et al., 2006). El flujo de salida de K⁺ de las células mediado por ATP, que se desencadena por la apertura de este canal, es crítico para la activación del NLRP3 inflamasoma (Ferrari et al., 1997). El NLRP3 inflamasoma es un complejo macromolecular citosólico que activa la enzima caspasa-1, responsable del procesamiento postraducciona l de la pro-IL-1 β y pro-IL-18, producidas por queratinocitos y CDs en respuesta a estímulos derivados de la señalización por TLRs. (Ferrari et al., 2006; Di Virgilio, 2007; Martinon et al., 2009; Surprenant y North, 2009). El procesamiento postraducciona l de estas moléculas proinflamatorias mediado por la enzima caspasa-1 permite la secreción de IL-1 β e IL-18, las cuales juegan un rol crucial en la xenoinflamación, y, por lo tanto, en la fase de sensibilización de la HSC y DAC en humanos (Shornick, 1996; Antonopoulos et al., 2001).

2.2.4. Proliferación de células T antígeno-específicas

En la zona T del ganglio drenante y en el endotelio del vaso linfático aferente se expresan, de manera constitutiva, las moléculas quimioatrayentes (quimioquinas) CCL19 y CCL21. Las células de Langerhans que han fagocitado y procesado el complejo alérgeno-proteína, exponen el antígeno T resultante del procesamiento en los complejos de histocompatibilidad de clase I y II (MHC I y MHC II). Sumado a esto, estas células migran al ganglio por quimiotaxis, mediante la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, y como resultado de la presión local debida a la xenoinflamación que impulsa la migración de células innatas y moléculas al ganglio (Murphy, 2014).

Una vez en la zona T del ganglio, ocurre la presentación de antígeno a las células T vírgenes mediada por las CDs activadas. La primera señal para la activación de las células T es la interacción específica de receptores de linfocitos T (*T cell receptor* - TCRs) y el complejo MHC-péptido expuesto sobre la superficie de la CD, en un contexto co-estimulador. En particular, la interacción de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 sobre la superficie de la CD activada con el ligando CD28 en la superficie del linfocito T constituye la segunda señal de activación. La interacción de CD54 (molécula de adhesión sobre la superficie de las CDs) con su ligando Antígeno Asociado a la Función Leucocitaria-1 (LFA - *Leukocyte Functional Antigen-1*) es vital para la correcta formación de la sinapsis inmunológica y LFA-1 cumple un rol mecanosensor tras la unión de CD54 al mismo, cambiando su conformación y desencadenando cascadas de señalización intracelular que también están relacionadas a la activación del linfocito T (Comrie et al., 2015). Consecuentemente, los linfocitos T que forman parte de la presentación, secretan interleuquina 2 (IL-2) y regulan positivamente la expresión de la cadena beta del receptor de IL-2, volviéndolo funcional. Esta señal estimula la proliferación clonal de células T con TCRs específicos para el antígeno T presentado por

las CDs. La reexposición al alérgeno genera la activación y el reclutamiento de nuevas células T vírgenes, así como también la activación y el reclutamiento de células T de memoria hacia el sitio de exposición, mediante la expresión de receptores específicos de tejido (*homing*), desencadenando las reacciones típicas visualizadas en la respuesta de HSC en ratón y DCA en humano, como lo es la apoptosis de queratinocitos (Mark y Slavin, 2006).

2.3. Métodos para la evaluación de la Sensibilización Dérmica

Las enfermedades que afectan a la piel, aunque estadísticamente no representan una de las primeras causas de mortalidad en el mundo, ocupan un lugar importante en cuanto al número de personas que se ven afectadas y la alteración en la calidad de vida que suponen. En España representan aproximadamente el 6% de las enfermedades profesionales declaradas (Alejandro et al., 2014) que conllevan una menor calidad de vida a los que las padecen, y necesitan del tratamiento médico adecuado.

El descubrimiento de nuevos materiales y su posterior utilización, han provocado una alteración en la salud de la piel de las personas. En la actualidad, se han identificado más de 4000 productos como sensibilizantes dérmicos y se ha calculado que en Europa la tasa de prevalencia de la enfermedad está comprendida entre 7,2 y 18,6% con una incidencia cada vez más en aumento debido a las repetidas exposiciones a sensibilizantes (Mortz et al., 2001). Por lo tanto, contar con la información sobre el potencial de sensibilización de las sustancias representa un requisito esencial en la protección de la salud y el medioambiente y un requisito imprescindible para su comercialización.

En este sentido, las guías de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) para ensayos con productos químicos, por ejemplo, son una herramienta para

la evaluación de los efectos potenciales de los productos químicos en la salud humana, animal y el medio ambiente (OECD, 2018b).

2.3.1. Métodos *in vivo*

Tradicionalmente, la evaluación de la sensibilización dérmica a través de guías OECD involucró el uso de animales de experimentación. En particular, ha sido evaluada a través de dos ensayos clásicos *in vivo*: el ensayo de ganglio linfático local (*Local Lymph Node Assay* - LLNA) (TG 429) y sus dos modificaciones no radiactivas, LLNA:DA (TG 442A) y LLNA BrdR-ELISA (TG 442B) que involucran el uso de ratones y cuantifican la proliferación de células T en nódulos linfáticos auriculares tras la exposición a un compuesto (OECD, 2010) y la prueba de maximización en cobayos (*Guinea Pig Maximisation Test* - GPMT), la cual evalúa cualitativamente la reacción dérmica tras analizar la aparición de un aro rojo en la piel luego del contacto con una sustancia (TG 406) (OECD, 1992).

2.3.2. Métodos *in chemico* e *in vitro*

Uno de estos métodos para la evaluación de la sensibilización dérmica a través de guías OECD, pone en evidencia el primer paso de este proceso, es decir, la formación de complejos hapteno-proteína *in chemico* evaluada mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Este método se denomina “*Direct Peptide Reactivity Assay*” (DPRA) (OECD, 2015a).

Otro de estos ensayos constituye un método *in vitro* que se focaliza en el segundo evento clave en el proceso de sensibilización dérmica, el cual tiene lugar en los queratinocitos e incluye tanto respuestas inflamatorias como cambios en la expresión génica asociados a

vías de señalización celular específicas como las vías dependientes del elemento de respuesta antioxidante/electrofílica (ARE) (OECD, 2015b). En este ensayo, denominado Ensayo de Sensibilización Dérmica - KeratinoSens, es empleada la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT (Boukamp et al., 1988) conteniendo una construcción reportera con una única copia del elemento ARE del gen AKR1C2 (Aldo/Ceto Reductasa, Familia 1, Miembro C2) humano corriente arriba del gen de la luciferasa (Emter et al., 2010).

Por último, una tercera aproximación *in vitro* denominada “Ensayo de activación de línea celular humana” (*Human Cell Line Activation Test* - hCLAT) pone en evidencia la activación de células inmunes innatas tras la exposición a sustancias sensibilizadoras, a través de la evaluación de los cambios en los niveles de expresión de marcadores de superficie específicos (OECD, 2018a). Para ello, es utilizada la línea celular monocítica humana THP-1, derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda. Se ha descrito que las células THP-1 poseen el potencial de responder a sensibilizadores aumentando los niveles de expresión de moléculas de superficie como CD86 y CD54 (Ashikaga et al., 2002; Yoshida et al., 2003). A su vez, poseen una ventaja frente al uso de CDs primarias para la evaluación del proceso de sensibilización cutánea por el hecho de ser una línea celular establecida y validada. Existe gran dificultad en el aislamiento de células de Langerhans debido a la carencia de piel humana disponible para este procedimiento. Sumado a esto, la gran variabilidad genética entre donantes, el bajo número de células viables obtenidas y el alto costo involucrado en la obtención de las CDs han limitado el uso de éstas en comparación con líneas celulares establecidas en aproximaciones experimentales alternativas al uso de animales de laboratorio (Moulon et al., 1993; Krasteva et al., 1996).

Sin embargo, dado que la activación de células de Langerhans representa sólo un evento clave de la respuesta adversa de sensibilización cutánea, la información generada con el método h-CLAT no es suficiente por sí sola para realizar conclusiones acerca del potencial

de un compuesto evaluado de ser o no sensibilizador cutáneo. Tampoco lo es la información otorgada de manera individual por cualquiera de los otros dos ensayos. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta un enfoque integrativo que involucre resultados obtenidos a partir de estas tres aproximaciones experimentales alternativas al uso de animales de experimentación en conjunto, así como también debe considerarse el uso de la información preexistente sobre análogos químicos al compuesto a analizar para la designación de un compuesto como sensibilizador o no sensibilizador cutáneo (Lilienblum et al., 2008).

Los tres ensayos mencionados anteriormente, han sido evaluados en un Laboratorio de Referencia para Alternativas a la Experimentación Animal de la Unión Europea (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM) mediante un estudio de validación y subsecuentes revisiones independientes por pares del Comité Asesor Científico (Scientific Advisory Committee - ESAC) de la EURL ECVAM, siendo considerados válidos a nivel internacional para su uso como parte del enfoque integrativo para la discriminación entre sensibilizadores y no sensibilizadores dérmicos. (EC EURL-ECVAM, 2013 A; EC EURL ECVAM, 2012 A; OECD, 2005; EC EURL-ECVAM, 2014; EC EURL-ECVAM, 2013 B; EC EURL-ECVAM, 2015; EC EURL ECVAM, 2012 B). La Tabla 1 muestra que, la precisión y el valor predictivo de los resultados obtenidos al emplear estos tres ensayos *in chemico* e *in vitro* en conjunto es mayor que la precisión y el valor predictivo de los resultados obtenidos mediante la utilización del LLNA (Clouet et al., 2017).

Tabla 1. Resultados de las estadísticas de Cooper para los ensayos *in chemico* e *in vitro* individuales y para combinaciones de ellos en comparación con datos humanos. Datos extraídos de Clouet y colaboradores, 2017.

		Valor predictivo	Valor predictivo	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Ensayos individuales	DPRA	86	100	100	79	91
	h-CLAT	77	82	89	64	79
	KeratinoSens	86	100	100	79	91
Combinaciones	DPRA y h-CLAT	73	100	100	50	79
	DPRA y KeratinoSens	79	100	100	64	85
	h-CLAT y KeratinoSens	70	100	100	43	76
Modelo predictivo	DRPA, KeratinoSens, h-CLAT	90	100	100	86	94
Estándar <i>in vivo</i>	LLNA	83	100	100	71	88

En cuanto a las limitaciones del Ensayo de Activación de Línea Celular humana, debido a la capacidad metabólica limitada de la línea celular THP-1 (Fabian et al., 2013), pro-haptenos (sustancias que requieren de activación enzimática, mediante el complejo P450, por ejemplo) y pre-haptenos (sustancias que son activadas por oxidación) con una lenta tasa de oxidación pueden generar falsos resultados negativos para sensibilización dérmica mediante esta aproximación, al igual que reactivos que se han descrito como sensibilizadores dérmicos mediante métodos *in vivo* luego de sufrir procesos de fotoconversión (Ashikaga, 2010).

Recientemente, se han reportado otros dos nuevos ensayos que ponen en evidencia la activación de las CDs para la evaluación de la sensibilización cutánea. Uno de estos ensayos, denominado “Ensayo de activación de línea celular U937” (U-SENS) (TG 442E) es una aproximación *in vitro* muy similar a la descrita para el método hCLAT, donde es utilizada

la línea celular monocítica humana U937 para la evaluación de los cambios en los niveles de expresión de la molécula coestimuladora de superficie CD86 tras la exposición de las mismas a un compuesto. El otro, denominado “Ensayo de gen reportero para la interleuquina 8” (IL-8 Luc assay) (TG 442E), no evalúa la expresión de marcadores de superficie, sino que cuantifica cambios en la expresión de IL-8, una citoquina asociada con el proceso de activación de CDs. En este ensayo se utiliza una línea celular reportera derivada de la línea celular THP-1 que presenta el gen de la luciferasa bajo el promotor de la IL-8 (THP-G8) (Takahashi et al., 2011). La expresión de IL-8 es medida luego de la exposición de esta línea celular reportera a sustancias mediante la cuantificación de la expresión de luciferasa para discriminar entre compuestos potencialmente sensibilizadores y no sensibilizadores.

2.3.3. ¿Por qué surgen los enfoques alternativos al uso de animales de experimentación en el campo de la toxicología?: el principio de Reemplazo

En su libro “Principios de las Técnicas Experimentales Humanitarias”, Russell y Burch (1959) proponen que la adopción de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) debería ser un componente integral de la planificación científica y ejecución de investigaciones.

Específicamente, el principio de reemplazo de Russell y Burch, promueve el desarrollo y la implementación de métodos que eviten el uso de animales de experimentación. La importancia de este principio para el presente trabajo es fundamental. Actualmente, existe una tendencia mundial hacia el reemplazo de animales de experimentación para la realización de pruebas de toxicidad y bioseguridad con productos químicos potencialmente peligrosos para la salud humana y/o animal por ensayos *in chemico*, *in vitro* o *in silico* (Balls, 2007). En particular, en Uruguay todavía no existe experiencia en el establecimiento y utilización de este tipo de ensayos.

Por un lado, las metodologías *in silico* han mostrado cierta promesa como herramientas potenciales para la búsqueda de compuestos con características similares a otros con función conocida, pudiendo predecir de esta forma, posibles respuestas y escenarios obtenidos al realizar ensayos de bioseguridad con dichos compuestos.

Por otra parte, a medida que se genera conocimiento sobre los procesos celulares y moleculares que conducen a una determinada respuesta, patología o afección desencadenada por exposición a compuestos químicos, surge el desarrollo de metodologías *in vitro* e *in chemico* para poner a prueba diferentes etapas de la respuesta biológica en cuestión. Por ejemplo, el conocimiento actual de los mecanismos bioquímicos y celulares detrás del proceso de sensibilización dérmica ha sido compilado en la forma de una vía de respuesta adversa (Adverse Outcome Pathway – AOP). Este conocimiento permitió el desarrollo de los ensayos *in vitro*, *in silico* e *in chemico* anteriormente mencionados para la evaluación de la sensibilización cutánea (OECD, 2018a), los cuales evalúan la potencialidad de un compuesto de inducir una respuesta de hipersensibilidad dérmica a diferentes niveles en la AOP.

Sin embargo, más allá del desarrollo de metodologías aisladas, la atención está dirigida hacia la combinación de estas nuevas metodologías experimentales para generar estrategias de evaluación de toxicidad de carácter integrativo que pongan en evidencia los efectos de un compuesto en diferentes etapas o fases de una respuesta (Tice et al., 2013). De esta forma, se genera información más adecuada sobre las propiedades potencialmente dañinas de las sustancias sobre la salud humana y animal (Worth y Patlewicz, 2016).

Como resultado de la prohibición de la experimentación en animales para la evaluación de la toxicidad, seguridad y calidad de los productos cosméticos en el año 2004, y de ingredientes de cosméticos en el año 2009 en la Unión Europea, el desarrollo de métodos

alternativos que pudieran sustituir los ensayos en animales aumentó considerablemente. En 2009 se prohibió la comercialización de productos cosméticos compuestos de ingredientes evaluados en animales en los países de la Unión Europea, exceptuando aquellos evaluados para toxicidad crónica, toxicidad reproductiva y toxicocinética, cuya comercialización se prohibió en la Unión Europea en marzo de 2013. Además, en 2013, la Comisión Europea emitió un comunicado donde exponía su intención de promover el bienestar animal a nivel mundial (Comisión Europea, 2013).

Regionalmente, el surgimiento y establecimiento de una legislación en algunos estados de Brasil que imitaría la europea para el año 2019, prohibiendo la realización y comercialización de productos probados en animales, podría afectar negativamente las relaciones comerciales de productos cosméticos con los países que conforman el MERCOSUR. En respuesta a esta preocupación, en 2015 se creó la Plataforma Regional de Métodos Alternativos do MERCOSUL (PReMASul). Esta red busca promover la generación de una infraestructura de laboratorios y de recursos humanos especializados capaces de implementar métodos alternativos al uso de animales en sus respectivos países, así como estimular la validación de nuevos métodos alternativos. Alineados con esta iniciativa, en 2017, el Institut Pasteur de Montevideo comenzó con la implementación de algunos de estos métodos. Actualmente, se está buscando establecer una plataforma de métodos alternativos a la experimentación animal, específicamente dentro de un programa de investigación denominado Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal, donde se ha comenzado a poner a punto una batería de ensayos alternativos, los cuales se encuentran validados a nivel mundial y se realizan siguiendo las guías internacionales de la OECD. Entre ellos, se encuentra el “Ensayo de activación de línea celular humana” para la evaluación de la sensibilización dérmica sobre cual trata este trabajo.

Cabe destacar que las guías OECD no sólo constituyen lineamientos y protocolos para el reemplazo de animales de experimentación en diferentes tipos de investigaciones, sino que también existen guías validadas que apuntan a uso de metodologías nuevas que reducen el número de animales de experimentación necesarios para la evaluación de problemas conocidos, cumpliendo con otro de los principios de Russell y Burch (1959): el de reducción.

2.4. Monitoreo del crecimiento celular y actividad metabólica de líneas celulares

Los ensayos *in vitro* mencionados para la evaluación de la sensibilización dérmica involucran el cultivo de diferentes líneas celulares. Conocer las características de las líneas celulares como la velocidad de crecimiento celular y su actividad metabólica son esenciales para asegurar la calidad de los cultivos de células y el éxito de los ensayos que se realizan.

La masa celular puede ser determinada por métodos directos o indirectos (Butler, 1999; Steward et al., 2000). Las técnicas directas como el conteo de células ofrecen limitada información de las actividades metabólicas del cultivo, mientras que, los métodos indirectos, como los basados en la medición del consumo de un nutriente o en la acumulación de un metabolito aportan esta información. Generalmente, la información obtenida a partir de ambos métodos es usada en conjunto, con el fin de proporcionar información complementaria sobre el estado de un cultivo celular (Tsao et al., 2005).

Dos de los compuestos monitoreados comúnmente son la glucosa y el lactato. La glucosa sirve tanto como fuente de carbono y de energía en la mayoría de las formulaciones de medios de cultivo. La entrada de glucosa en la vía glucolítica lleva a la formación de piruvato como producto final. En células animales, el piruvato puede ser dirigido al ciclo de Krebs o puede ser convertido a lactato (Hu et al., 1987; Wagner, 1997). La acumulación de lactato

conlleva a la acidificación del medio de cultivo celular y es, generalmente, un factor limitante para el crecimiento de los cultivos celulares, especialmente cuando la densidad celular es alta (Hassel et al., 1991; Lao y Toth, 1997).

Por lo tanto, la concentración de glucosa es un indicador de la carga energética de un cultivo, mientras la acumulación de lactato es considerada un indicador importante de la acumulación de otros subproductos metabólicos y un indicador de deterioro del cultivo celular (Ozturk et al., 1997).

2.5. Análisis de contaminaciones para la validación de los resultados

Un requerimiento fundamental para la validación de los resultados obtenidos a través de aproximaciones experimentales que involucran el cultivo de células es el descarte de la existencia de contaminación, tanto por microorganismos, como de contaminación cruzada con otras líneas celulares (Stacey, 2000).

Los ensayos de detección de *Mycoplasma*, la búsqueda de contaminación por otras bacterias y por hongos, así como los ensayos de verificación de líneas celulares son indispensables antes del uso de cultivos celulares y constituyen controles de calidad esenciales para asegurar que los resultados sean obtenidos bajo la aplicación de buenas prácticas de laboratorio. Se han diseñado ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales son robustos y eficientes para la detección de especies comúnmente utilizadas en cultivos celulares: rata, ratón, hámster chino, hámster sirio y humano (Nelson-Rees et al., 1981; Steube et al., 2008). Uno de estos ensayos muestra que, pares de cebadores especie-específicos diseñados a partir de diferentes regiones de los genes de la beta-globina o de la beta-actina de las especies mencionadas anteriormente son

efectivos para la confirmación de la identidad de especie de un cultivo celular y la detección de contaminación cruzada con líneas celulares de otros orígenes (Steube et al., 2008).

3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

3.1. Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo es la puesta a punto del ensayo *in vitro* de Activación de Línea Celular Humana (*Human Cell Line Activation Test* - hCLAT) correspondiente a la guía OECD 442E, para la evaluación de la potencialidad de compuestos químicos de inducir una respuesta de hipersensibilidad tras el contacto de los mismos con la piel.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterización de la línea celular monocítica humana THP-1 a través de la generación de curvas de crecimiento, medición del consumo de glucosa y producción de lactato.
- Implementación de un ensayo basado en PCR para la verificación de especie de líneas celulares y detección de contaminación cruzada con líneas celulares de diferente especie.
- Comenzar con la implementación del ensayo Activación de Línea Celular Humana (hCLAT).

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

4.1. Mantenimiento y cultivo de células THP-1

4.1.1. Medio y condiciones de cultivo

Las células en suspensión THP-1 (ATCC TIB-202) obtenidas directamente del repositorio celular ATCC (American Type Culture Collection), fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI-1640 completo (Anexo A0.1), a 37°C y 5% CO₂, según recomendación de ATCC.

4.1.2. Mantenimiento y propagación

Estas células fueron mantenidas, según recomendación de la guía OECD 442E (TG 442E), a densidades celulares entre 0,1 - 1 x 10⁶ células viables/mL.

Los pasajes fueron realizados cada dos o tres días por reemplazo de medio, resuspendiendo las células en medio RPMI-1640 completo a 37°C, estableciendo una densidad celular de 0,1 – 0,2 x 10⁶ células viables/mL.

Todas las centrifugaciones del cultivo fueron realizadas a 200 RCF (Relative Centrifugal Force), durante 5 minutos y a temperatura ambiente.

4.1.3. Criopreservación de células THP-1

Las células THP-1 fueron congeladas en una densidad celular de 4 x 10⁶ células viables/mL en 1 mL de solución de congelado (Anexo A0.3). Los crioviales generados fueron transferidos a un contenedor para congelación conteniendo isopropanol (Mr. Frosty, Thermo

Scientific), el cual asegura una velocidad de congelamiento de $-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Luego de 24 horas a -80°C , los crioviales fueron transferidos a nitrógeno líquido.

4.1.4. Procedimiento de descongelado de células THP-1

El contenido de los crioviales fue rápidamente descongelado y luego transferido a un tubo cónico de 15 mL, el cual contenía 6 mL de medio RPMI-1640 completo a 37°C . Para remover el DMSO, las células fueron centrifugadas a 200 RCF por 5 minutos. Posteriormente, las células se resuspendieron en 4 mL de medio RPMI-1640 completo a 37°C y transferidas a un frasco de cultivo T25, resultando en una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células viables/mL, ya que se observó que la recuperación de las mismas es más rápida si son mantenidas a esta densidad celular tras el descongelado. La viabilidad inicial del vial descongelado fue registrada y al día siguiente, se agregaron 4 mL adicionales de medio RPMI-1640 completo a 37°C , registrando nuevamente la densidad celular y la viabilidad del cultivo para monitorear la recuperación del cultivo.

El primer pasaje por reemplazo de medio de cultivo fue llevado a cabo durante el tercer día post descongelado, donde las células fueron resuspendidas a $0,1 - 0,2 \times 10^6$ células viables/mL en un mayor volumen de medio, escalando a un frasco de cultivo T75.

4.2. Generación de bancos celulares maestro y de trabajo

A partir de células THP-1 (pasaje 14) libre de *Mycoplasma*, se generó un banco celular maestro (pasaje 17) y un banco celular de trabajo (pasaje 21), tras la propagación y la criopreservación de estas células. Los procedimientos de propagación y criopreservación fueron llevados a cabo como se describió en las secciones 4.1.2. y 4.1.3., del presente

trabajo. Se verificó que ambos bancos se encontraban libres de contaminaciones mediante la búsqueda de contaminación con bacterias y hongos en medios líquidos apropiados y a través de la detección de *Mycoplasma* mediante un ensayo basado en PCR. Ambos servicios fueron brindados por la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo.

4.3. Caracterización de la línea celular THP-1 a través de una curva de crecimiento

4.3.1. Construcción de la curva de crecimiento, determinación del tiempo de generación y cálculo de la tasa de incorporación de glucosa

Las células THP-1 (pasaje número 22) fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI-1640 completo a 37°C y 5% CO₂, sin renovación de medio. Se sembraron tres placas de 24 pocillos de fondo plano con 0,5 mL de cultivo de células THP-1 por pocillo a una densidad celular de $0,3 \times 10^6$ células/mL. Cada 24 horas y durante siete días consecutivos, se registraron los valores de densidad celular y viabilidad de tres pocillos (uno de cada placa) a través de la tinción de las células con Azul de Tripán 0,4 % en PBS y conteo en cámara de Neubauer. Se recuperó el sobrenadante de cada uno de los tres pocillos y los mismos fueron almacenados a -20°C, junto con una alícuota del medio de cultivo preparado el día de inicio del cultivo, hasta finalizar la toma de muestras.

Las concentraciones de glucosa y lactato de los sobrenadantes de cultivo y del medio de cultivo fueron determinadas mediante el uso de un analizador automático de estos compuestos (*Bioprofile Basic 2 Analyzer - Nova Biomedical*).

Los gráficos fueron generados mediante el uso del software GraphPad Prism 7 y el cálculo del tiempo de generación en fase de crecimiento exponencial de estas células fue realizado

tras la aplicación de un ajuste lineal a los datos obtenidos en fase exponencial utilizando el programa Excel.

Finalmente, se estimó la tasa de incorporación de glucosa de las células THP-1 (*Glucose Uptake Rate* – GUR) (g/hora) mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$GUR = (CGlu, t2 - CGlu, t1) \times V / (t2 - t1)$$

Donde,

- CGlu es la concentración de glucosa (g/mL).
- t1 y t2 son las horas de muestreo.
- V es el volumen de medio en el que se encuentran las células (mL)

4.4. Ensayo de verificación de especie de líneas celulares basado en PCR

Líneas celulares de diferentes especies fueron mantenidas en cultivo y el ADN genómico de las mismas fue extraído. Utilizando estos ADN genómicos como moldes, se probaron distintas condiciones de PCR para los diferentes juegos de cebadores. La Tabla 2 muestra las características de los cebadores utilizados en las amplificaciones. Estos cebadores fueron diseñados por Steube y colaboradores, 2008 y 2003.

Tabla 2. Cebadores empleados en los ensayos de PCR de verificación de especie de líneas celulares. M: ratón; R: rata; HS: hámster sirio; HC: hámster chino; H: humano.

Nombre	Gen blanco	Secuencia 5' - 3'	Especies	Posición	Localización	EMBL - Gene Bank Número de acceso	Tm (°C)
c-globin-F	Beta globina	cct gtg ggg aaa ggt gaa c	R, Ra	2759–2777	Exon 1	J00413 and X06701	55,9
glo-mus-R	Beta globina	ata cca gat acc tgc agg ctt at	R, Ra	3735–3757	Intron 2	J00413	55,4
glo-rat-F	Beta globina	gat gat gtg tgg ata tgc cct g	Ra	841–861	Intron 2	X06701	55,6
glo-rat-R2	Beta globina	aat tcc ttg ccc agg tgg	Ra	1412–1430	Exon 3	X06701	55,4
act-rat-F	Beta actina	agg tga tcc act cct tcg ct	HS	251–270	ADNc	X57030	58,2
act-rat-R	Beta actina	tgt tct cta ggg aac aag tga ctt c	HS	529–552	ADNc	X57030	56,2
act-bHam-1F	Beta actina	ggc ttt agg agc ttg aca ata ctg	Ra	2118–2140	Intron 3	J0091	55,7
act-bHam-1R	Beta actina	gca ttg gtc acc ttt aga tgg a	Ra	2620–2641	Intron 4	J0091	55
act-bHam-2F	Beta actina	ata ttg aga aca tcg ttc ccc	HC, HS	1417–1427	Intron 1	U20114	52,2
act-bHam-2R	Beta actina	cca caa gta gtc aag gca ggt	HC, HS	2082–2102	Intron 2	U20114	57
act-cHam-F	Beta actina	acc tgc ctt gac tac ttg tgg	HC, HS	2082–2102	Intron 2	U20114	57
act-cHam-R	Beta actina	agg cta agg atg ctt agc tca	HC, HS	2860–2880	Intron 4	U20114	55,7
glo-sHam-F	Beta globina	acc tgc ctt gac tac ttg tgg	HC	2082–2103	Intron 2	U20114	57
glo-sHam-R	Beta globina	ttg gtc acc att aga tga ag	HC	2601–2620	Intron 3	U20114	49,6
HamRepS-F	RepetidosS	gtg tat tcc agg agc agc agc c	HS	250–272	Repetidos S	AB185084	60,3
HamRepS-R	RepetidosS	act ggt cct ctg cag gtg ca	HS	671–690	Repetidos S	AB185084	61,3
Act-hum-F	Beta actina	cta caa tga gct gcg tgt gg	H	1494–1514	Exon 2	M10277	56,2
Act-hum-R	Beta actina	taa ccc tca tgt cag gca ga	H	2491–2510	Intron 4	M10277	55,5
Human-F	Beta globina	caa gac agg ttt aag gag acc a	H	1720-1741	Intron 1	AH001475.2	54,3
Human-R	Beta globina	gca gaa tcc aga tgc tca agg	H	3110 - 3130	Intron 3	AH001475.2	55,9

4.4.1. Condiciones de cultivo de líneas celulares de diferentes especies

4.4.1.1. Línea celular THP-1

La línea celular humana THP-1 fue mantenida en cultivo como se describió en la sección 4.1. del presente trabajo.

4.4.1.2. Líneas celulares NIH/3T3, H9C2, CHOK1 y BHK

Las líneas celulares adherentes NIH/3T3 (ATCC CRL1658) de fibroblastos embrionarios de ratón (*Mus musculus*), H9C2 (ATCC CRL-1446) de mioblastos de rata (*Rattus norvegicus*), CHOK1 (ATCC CCL-61) de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) y BHK (ATCC CCL-10) de fibroblastos de riñón de hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM completo (Anexo A0.2), a 37°C y 5% CO₂. Una vez alcanzado el 80% de confluencia se cosecharon las células. Para ello, el medio fue removido del cultivo en adherencia y se realizó un lavado con 5 mL de PBS 1X. Posteriormente, se llevó a cabo una incubación a 37°C con 5 mL de tripsina-EDTA 0,25% durante 5 minutos y luego se adicionaron 5 mL de medio de cultivo fresco completo para inactivar la tripsina. Las células fueron transferidas a un tubo cónico y se realizó una centrifugación durante 5 minutos a 200 RCF, a temperatura ambiente y las células recuperadas fueron utilizadas para la extracción de ADN.

4.4.2. Extracción de ADN genómico de líneas celulares

Todas las extracciones de ADN genómico de las líneas celulares provenientes de las distintas especies mencionadas en la sección 4.4.1. fueron realizadas por el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Ausubel et al., 2003).

Posteriormente, se estimó la concentración de ADN genómico a través de la medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop (Thermo Scientific). Se analizaron, además, los cocientes de las absorbancias a 260 nm/280 nm y 230 nm/260 nm, con el fin de valorar la pureza de las soluciones de ADN genómico obtenidas.

4.4.3. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 μ L, con 1,5 mM de cloruro de magnesio (Thermo Scientific), 1mM dNTP mix (Thermo Scientific), 1U Taq DNA Polymerase Recombinant (#10342020, Invitrogen), en 1X PCR Buffer sin Cloruro de Magnesio (Thermo Scientific).

Luego de una desnaturalización inicial a 94°C durante tres minutos, se realizaron 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo estuvo constituido por una fase de desnaturalización a 94°C con una duración de 30 segundos, una fase de unión de cebadores (*annealing*) (a diferente temperatura, dependiendo del par de cebadores) con una duración de 30 segundos y una fase de extensión a 72°C. Se probaron diferentes temperaturas de annealing para cada par de cebadores, cercanas a su temperatura de melting. La Tabla 3 resume las condiciones óptimas determinadas para las reacciones en cadena de la polimerasa, incluyendo las temperaturas de *annealing* y los tiempos de extensión para cada juego de cebadores. Estos últimos fueron definidos en función del tamaño del producto de amplificación esperado y de la tasa de polimerización de la enzima utilizada (90 segundos por kilobase).

Tabla 3. Condiciones óptimas ensayadas para las reacciones en cadena de la polimerasa para cada par de cebadores.

Cebadores	Gen blanco	Molde de DNA genómico	Cantidad de molde (ng)	Temperatura de <i>Annealing</i> (°C)	Tiempo de extensión (Minutos)	Producto de amplificación
c-globin-F / glo-mus-R	Beta globina	Ratón: Línea NIH 3T3	25	56	1	998 pb
glo-rat-F / glo-rat-R2		Rata: Línea H9C2	25	56	1	589 pb
act-rat-F / act-rat-R	Beta actina	Rata: Línea H9C2	25	56	1	523 pb
act-bHam-1F / act-bHam-1R	Beta actina	Hámster Chino: Línea CHOK1	25	57	1	685 pb
		Hámster Sirio: BHK	25	57	1	685 pb
act-bHam-2F / act-bHam-2R	Beta actina	Hámster Chino: Línea CHOK1	25	57	1	798 pb
		Hámster Sirio: BHK	25	57	1	798 pb
act-cHam-F / act-cHam-R	Beta actina	Hámster Chino: Línea CHOK1	25	57	1	538 pb
glo-sHam-F / glo-sHam-R	Beta globina	Hámster Sirio: BHK	25	57	1:30	1243 pb
HamRepS-F / HamRepS-R	RepetidosS	Roedor: BHK	10	60	1	440 pb
Human-F / Human-R	Beta globina	Humano: THP-1	25	56	2	1410 pb

4.4.4. Electroforesis en gel de agarosa (1,2%)

Los productos de PCR resultantes fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1,2% en buffer TAE 0,5 X (Anexo A0.4) y tinción con bromuro de etidio (#E1510, Sigma Aldrich) a una concentración final de 0,2 mg/mL en el gel.

Luego de la siembra del marcador de peso molecular (Anexo A1) y de las muestras preparadas con buffer de carga (Blue Juice Gel Loading Buffer 10X # 10816015, Invitrogen), la migración electroforética fue llevada a cabo a 10V/cm, durante 30 minutos.

4.5. Ensayo de activación de línea celular humana (hCLAT)

4.5.1. Medición de citotoxicidad: búsqueda de la concentración CV75

La concentración CV75 hace referencia a la concentración de reactivo que genera un 75% de viabilidad celular en el cultivo.

4.5.1.1. Preparación del cultivo de células THP-1

Las células THP-1 fueron sembradas a densidades celulares de $0,2 \times 10^6$ células viables/mL o $0,1 \times 10^6$ células viables/mL y precultivadas por 48 y 72 horas respectivamente antes de ser expuestas a los reactivos a ensayar.

La densidad del pre-cultivo de células THP-1 nunca excedió 1×10^6 células viables/mL ya que densidades superiores pueden afectar la expresión de CD54 y CD86 inducida por alérgenos (Mizuno et al., 2008).

El día del ensayo, las células THP-1 del pre-cultivo fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 completo fresco a una densidad celular de 2×10^6 células/mL. Luego, estas células fueron transferidas a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Por pocillo se sembraron 80 μ L de células a 2×10^6 células/mL ($1,6 \times 10^5$ células por pocillo).

4.5.1.2. Preparación de los compuestos a ensayar y de las sustancias control

Los reactivos a ensayar y las sustancias control fueron preparados el mismo día en el que fue realizado el ensayo bajo condiciones de esterilidad. En primer lugar, los reactivos fueron disueltos en medio de cultivo RPMI-1640 completo o en dimetilsulfóxido (DMSO, pureza 99,9%; Sigma Aldrich, #D5879) dependiendo de la solubilidad del compuesto (Ver Tabla

A2.1), para generar una Solución Madre con una concentración final de 100 mg/mL medio de cultivo o de 500 mg/mL DMSO.

Partiendo de la Solución Madre de 100 mg/mL (para reactivos disueltos en medio de cultivo) o 500 mg/mL (para reactivos disueltos en DMSO), se generaron ocho soluciones stock en el solvente/vehículo apropiado con un formato de diluciones seriadas en base 2. A partir de estas soluciones stock, fueron generadas soluciones de trabajo a través de una dilución 1/50 (para reactivos disueltos en medio de cultivo) o 1/250 (para reactivos disueltos en DMSO) de cada solución stock en medio de cultivo RPMI-1640 completo. En la Figura 2 se muestra el procedimiento que fue establecido y mantenido para la generación de estas soluciones stock y de trabajo.

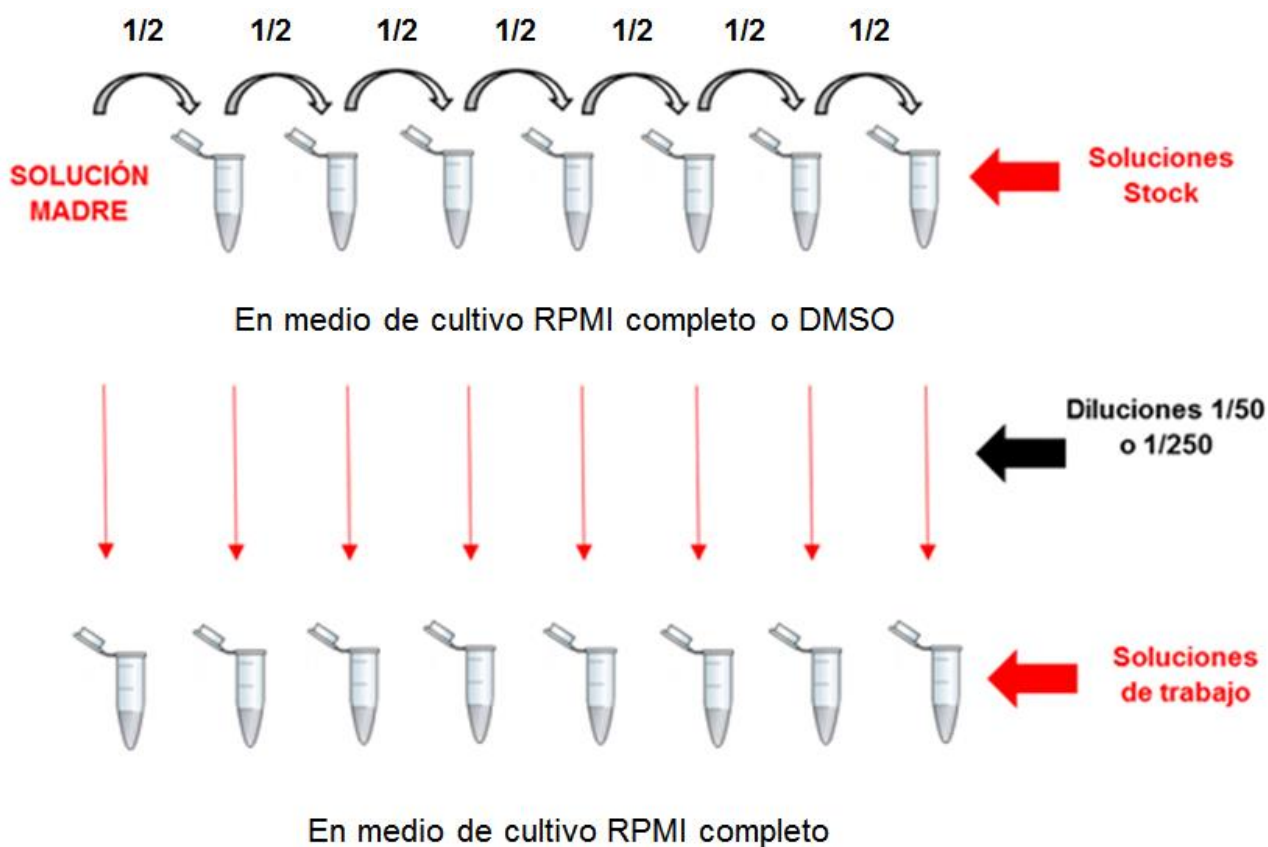


Figura 2. Esquema de la preparación de los reactivos a ensayar. Este procedimiento de preparación de reactivos y fue llevado a cabo bajo condiciones de esterilidad para la generación de la curva dosis/respuesta que permite encontrar la concentración CV75 de cada compuesto probado.

Si el reactivo analizado fue disuelto en DMSO, se estableció un control de disolvente a partir de una solución de trabajo de DMSO. Esta solución de trabajo de DMSO fue generada adicionando de 2 μL de DMSO a 498 μL de medio de cultivo RPMI-1640 completo.

Para todos los reactivos ensayados fue empleado un control de medio (RPMI-1640 completo).

4.5.1.3. Exposición de las células THP-1 a los reactivos a analizar y a las sustancias control

Las soluciones de trabajo generadas fueron utilizadas para llevar a cabo la exposición de las células THP-1 al compuesto.

Tras una previa homogeneización por vórtex de las soluciones de trabajo de la sustancia a ensayar, del control de disolvente y del control de medio, se adicionaron 80 μL de cada solución a los 80 μL de las células presentes en la placa de 96 pocillos, logrando así una dilución $\frac{1}{2}$ de las soluciones de trabajo y una concentración de 0,20% del disolvente en placa.

Las diferentes concentraciones del reactivo a ensayar y las sustancias control se analizaron por triplicado en cada ensayo realizado.

Posteriormente, las placas fueron incubadas por $24 \pm 0,5$ horas a 37°C y bajo 5% CO_2 .

4.5.1.4. Procesamiento de las células y medición de la citotoxicidad por citometría de flujo

La guía OECD 442E (TG 442E) propone un procedimiento en el cual, luego de transcurrido el tiempo de incubación, las células son transferidas, en primer lugar, a tubos eppendorf y recolectadas por centrifugación. Los sobrenadantes son descartados y se realiza un primer lavado con 600 μL buffer de tinción (Anexo A0.5). Luego las células son resuspendidas en 200 μL del mismo buffer y transferidas a una placa de 96 pocillos de fondo en U, donde se efectúan los dos lavados con 200 μL de buffer de tinción.

En este trabajo, se buscó adaptar este procedimiento en su totalidad a placa de 96 pocillos de fondo en V, por lo que las células fueron directamente transferidas desde la placa de 96 pocillos de fondo plano a una placa de 96 pocillos de fondo en V luego de transcurrido el tiempo de exposición. Posteriormente, se realizaron cinco lavados con 200 μL de buffer de tinción.

Las células fueron mantenidas siempre en hielo durante este procedimiento y todas las centrifugaciones fueron llevadas a cabo a 4°C, durante 7 minutos y 250 RCF.

Finalmente, las células fueron resuspendidas en 180 μL de buffer de tinción y justo antes de realizar la adquisición en el citómetro, 20 μL de yoduro de propidio (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron adicionados para evaluar la viabilidad celular, llegando a una concentración final de yoduro de propidio de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La captación de yoduro de propidio fue analizada por citometría de flujo mediante el uso del citómetro analítico BD Accuri™ C6 (BD Biosciences), equipado con los láseres 488 nm y 633 nm. Se adquirió un total de 10000 células THP-1, estableciendo un umbral de detección de 80000 para el parámetro Forward Scatter (FSC) y se seleccionó el canal de detección FL2 (Láser 488, Filtro 585/40) para el análisis de la fluorescencia del yoduro de propidio.

Para el análisis de los datos, se utilizó el software FlowJo X.

4.5.1.5. Estimación de la concentración CV75

Luego del análisis por citometría de flujo, la viabilidad celular resultante para cada concentración de reactivo ensayado fue estimada mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular = \frac{Número\ de\ células\ viables}{Número\ total\ de\ células\ adquiridas} \times 100$$

Posteriormente, los porcentajes de viabilidad celular fueron graficados en función del logaritmo en base 10 de la concentración del reactivo ensayado, obteniéndose un gráfico como el que se muestra en la Figura 3.

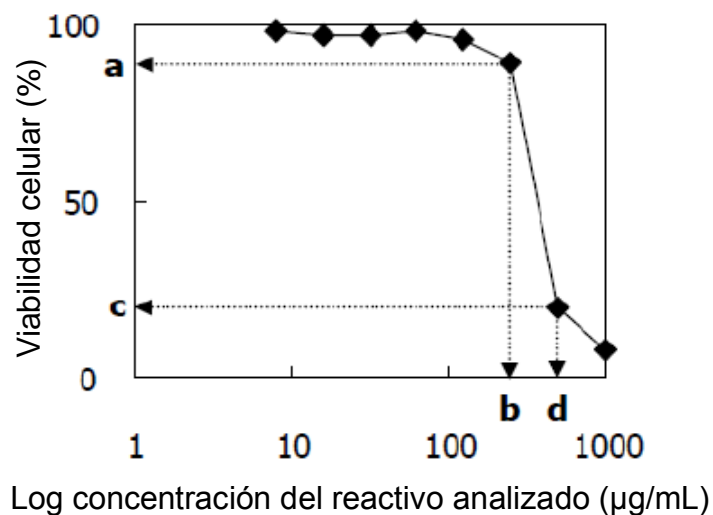


Figura 3. Representación gráfica de la curva dosis/respuesta generada a partir del ensayo de medición de citotoxicidad y búsqueda del CV75. Los valores definidos como a, b, c y d son posteriormente utilizados para el cálculo de la concentración CV75, donde, a corresponde al mínimo valor de viabilidad celular por encima del 75%, c es el máximo valor de viabilidad celular por debajo del 75%, b y d corresponden a las concentraciones de reactivo que generaron los valores de viabilidad celular a y c, respectivamente.

El valor de la concentración de reactivo que generaría un 75% de viabilidad celular para las células THP-1 fue calculado mediante una interpolación log-lineal (semilogarítmica) mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

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

Los parámetros *a*, *b*, *c* y *d* están definidos en la figura 3.

4.5.2. Medición de los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86

La concentración CV75 hallada para cada reactivo ensayado debe ser utilizada para determinar el rango de concentraciones del compuesto a ser utilizadas para evaluar el cambio en los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86.

Para este ensayo, se establecieron ocho nuevas concentraciones del reactivo ensayado, a partir de las cuales se evaluó el cambio en los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86 entre células THP-1 tratadas con las diferentes concentraciones del reactivo analizado y controles sin tratamiento.

Posteriormente, los resultados obtenidos fueron evaluados según un modelo predictivo establecido por la guía OECD 442E (TG 442E) para la determinación de los posibles positivos y negativos para sensibilizadores cutáneos.

4.5.2.1. Preparación del cultivo de células THP-1

Las células THP-1 para este ensayo fueron pre-cultivadas como se indica en la sección 4.1.2.

El día del ensayo, las células THP-1 del pre-cultivo fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 completo fresco a una densidad celular de 2×10^6 células/mL. Luego, estas células fueron transferidas a una placa de 24 pocillos de fondo plano. Por pocillo se sembraron 500 μL de células a 2×10^6 células/mL (1×10^6 células por pocillo).

4.5.2.2. Preparación de los compuestos a ensayar y de las sustancias control

Los reactivos a ensayar y las sustancias control fueron preparados el mismo día en el que fue realizado el ensayo, bajo condiciones de esterilidad.

Compuestos a ensayar

En primer lugar, los reactivos para los cuales fue posible hallar la concentración CV75 fueron disueltos en el solvente/vehículo apropiado (medio de cultivo RPMI-1640 completo o DMSO) para generar una Solución Madre con una concentración final $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ (mg/mL) (en medio de cultivo RPMI-1640 completo) o de $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ (mg/mL) (en DMSO).

En el caso de no haber determinado el CV75, por no haberse observado suficiente citotoxicidad en el ensayo de búsqueda de la concentración CV75, la guía OECD 442E (TG 442E) establece que se deberá partir de la mayor concentración del reactivo testada. La mayor concentración de reactivo en placa, de igual forma que para el ensayo de medición de la citotoxicidad, no puede exceder los 5000 $\mu\text{g/mL}$ (para el caso de reactivos disueltos en medio de cultivo RPMI-1640 completo) o los 1000 $\mu\text{g/mL}$ (para el caso de los reactivos disueltos en DMSO).

Se generaron ocho diluciones seriadas en base 1,2 utilizando el vehículo/solvente correspondiente. El rango de concentraciones del reactivo en las soluciones stock fue $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ (Solución Madre) – $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (para reactivos disueltos en medio de cultivo RPMI-1640 completo) o $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ – $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (para reactivos disueltos en DMSO).

A partir de estas soluciones stock, se generaron ocho soluciones de trabajo a través de una dilución 1/50 (para reactivos disueltos en medio de cultivo) o 1/250 (para reactivos disueltos

en DMSO) en medio de cultivo RPMI-1640 completo. En la Figura 4 se muestra el procedimiento que fue establecido y mantenido para la generación de estas soluciones stock y de trabajo.

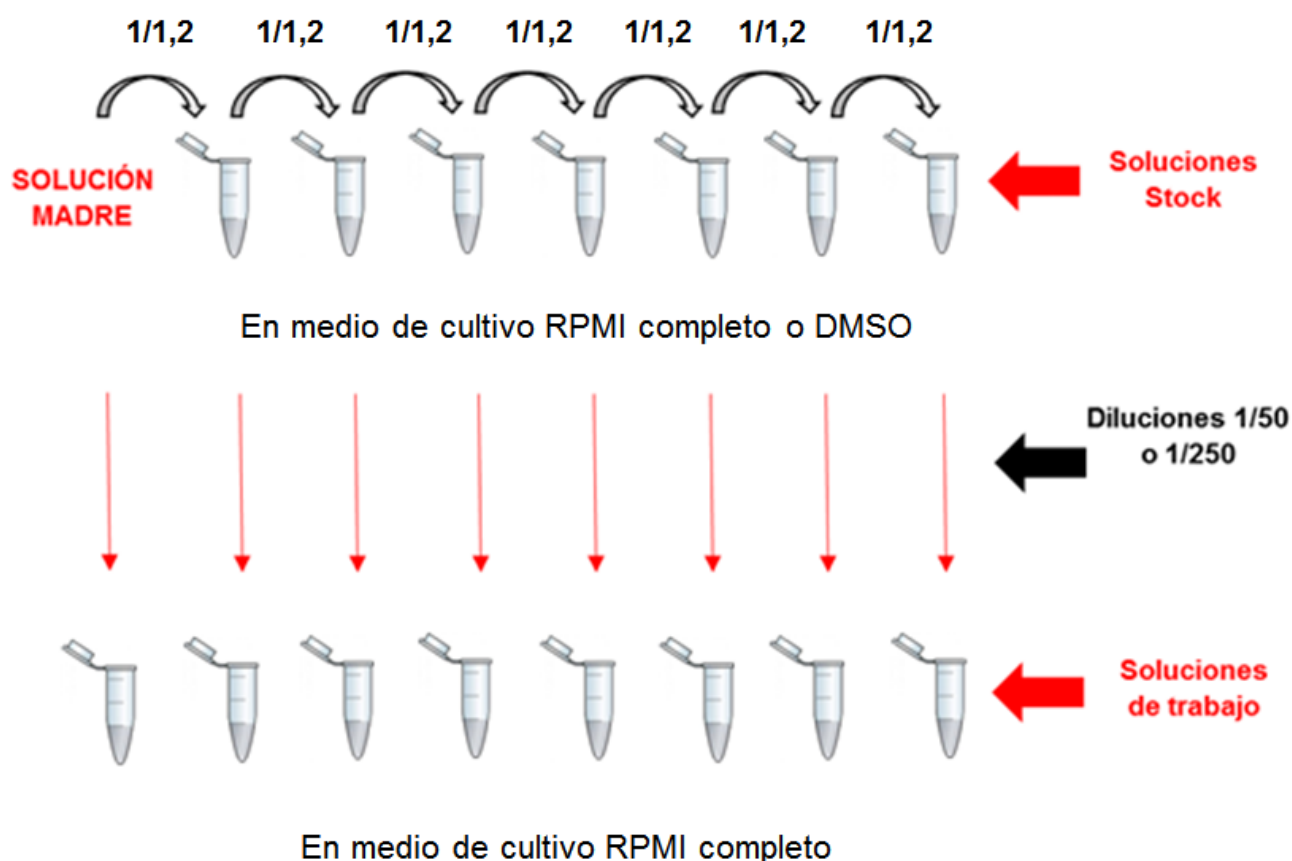


Figura 4. Esquema de la preparación de los reactivos a ensayar. Este procedimiento fue llevado a cabo bajo condiciones de esterilidad para la preparación de los reactivos a utilizar en cada ensayo de medición de los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86.

Controles

El compuesto 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) es requerido como control positivo del experimento, según lo establece la guía OECD 442E (TG 442E). Según esta guía, el mismo puede ser utilizado a una concentración final en placa igual a la concentración CV75 determinada en cada laboratorio, o a una concentración de 4 µg/mL en placa. Esta última concentración fue la utilizada en este trabajo como control positivo de sensibilización. Para

obtener esta concentración de DNCB en placa, se parte de una solución stock 2 mg/mL en DMSO, la cual es diluida 250 veces en medio de cultivo RPMI-1640 completo para obtener la solución de trabajo.

Como control negativo de sensibilización, la guía OECD 442E (TG 442E) recomienda el uso del ácido láctico.

Si el reactivo ensayado fue disuelto en DMSO, se estableció un control de disolvente a partir de una solución de trabajo de DMSO. La concentración final de la solución de trabajo de DMSO generada fue 0,4% en medio de cultivo RPMI-1640 completo.

Para todos los reactivos ensayados fue empleado un control de medio (RPMI-1640 completo).

4.5.2.3. Exposición de las células THP-1 a los reactivos a ensayar y a las sustancias control

Las soluciones de trabajo generadas fueron posteriormente utilizadas para llevar a cabo la exposición de las células THP-1 al compuesto.

Tras una previa homogeneización por vórtex de las soluciones de trabajo de la sustancia a ensayar, del control positivo (DNCB), del control de disolvente (DMSO) y del control de medio, se adicionó un volumen de las mismas igual al volumen de células en el pocillo de la placa de 24 pocillos correspondiente (500 µL), logrando una dilución ½ de las soluciones de trabajo.

En cada ensayo se incubaron las células THP-1 con las diferentes concentraciones del reactivo a ensayar y con las sustancias control por duplicado. Según la guía OECD 442E (TG 442E), es suficiente con realizar un duplicado, ya que la predicción se obtiene a partir de por lo menos dos ensayos independientes con el mismo compuesto.

Posteriormente, las placas fueron incubadas por $24 \pm 0,5$ horas a 37°C y bajo 5% CO_2 .

4.5.2.4. Marcación de las células THP-1 para el análisis por citometría de flujo

Marcación de las células THP-1

En este trabajo, se realizaron modificaciones del protocolo original buscando adaptar el procedimiento establecido por la guía a placa de 96 pocillos de fondo en V, por lo que las células fueron directamente transferidas desde la placa de 24 pocillos de fondo plano a una placa de 96 pocillos de fondo en V luego de transcurrido el tiempo de exposición.

Los sobrenadantes fueron descartados y posteriormente, se realizaron dos lavados con 200 μL de buffer de tinción y un bloqueo con 150 μL por pocillo de solución de bloqueo (Anexo A0.6), durante 15 minutos y a 4°C .

Luego, las células fueron marcadas con 20 μL de diluciones de anticuerpos en buffer de tinción, durante 20 minutos y a 4°C .

Luego de transcurrido el tiempo de marcación, se realizaron tres lavados con 200 μL de buffer de tinción y las células fueron finalmente resuspendidas en 180 μL de PBS.

Todas las centrifugaciones de este procedimiento fueron llevadas a cabo a 4°C , durante 7 minutos y 250 RCF y las células THP-1 fueron mantenidas siempre en hielo.

Titulación de anticuerpos

En este trabajo, los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD54-FITC (#ab210193, Abcam), Mouse IgG1-FITC (#ab18435, Abcam), anti-CD86-PE (#555658, BD Pharmingen) o Mouse

IgG1 sin conjugar (#54155, Cell Signaling) en conjunto con un anticuerpo secundario anti-Mouse IgG1-PE (#P8547, Sigma Aldrich).

Para definir la concentración a utilizar de los anticuerpos, se realizó una titulación en la cual se buscó la mejor relación señal-ruido anti-CD54-FITC y anti-CD86-PE. Para llevar a cabo esta titulación, se ensayaron diferentes diluciones del anticuerpo anti-CD54-FITC (1/50, 1/100 y 1/200) y del anticuerpo anti-CD86-PE (1/20, 1/50 y 1/100) sobre células THP-1 tratadas con una concentración final en placa de 4 µg/mL de DNCB y con el control de disolvente DMSO a una concentración final de 0,20%.

La relación señal-ruido para cada anticuerpo fue analizada mediante el cálculo del *Stain Index* (SI), como especifica la siguiente ecuación, además de la observación de los *dot plots* resultantes del análisis por citometría de flujo.

$$SI = \frac{MFI\ DNCB - MFI\ DMSO}{2sd\ DMSO}$$

Donde,

- MFI DNCB, corresponde a la Intensidad de Fluorescencia Media geométrica de las células tratadas con DNCB.
- MFI DMSO, corresponde a la Intensidad de Fluorescencia Media geométrica de las células tratadas con DMSO.
- sd DMSO, corresponde al desvío estándar de los valores de MFI DMSO obtenidos para las réplicas analizadas.

Análisis por citometría de flujo

De cada muestra tratada y de los controles positivo, negativo, de vehículo y de medio, se reservaron células en la placa de 96 pocillos de fondo en V sobre las cuales no fue realizada ninguna marcación, con el fin de estimar la viabilidad de las mismas por medio del análisis por citometría de flujo de la captación de yoduro de propidio. A estas células se les adicionaron, justo antes de realizar la adquisición en el citómetro, 20 μL de yoduro de propidio (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para llegar a una concentración final de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La captación de yoduro de propidio y los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86 fueron analizados por citometría de flujo mediante el uso del citómetro analítico BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). El análisis de viabilidad fue realizado como se describió en la sección 4.5.1.5. Para el análisis de la expresión de CD54 y CD86, se adquirió un total de 10000 células THP-1 viables, seleccionadas según su posición en un *dot plot* Side Scatter (SSC) y FSC, estableciendo el mismo umbral de detección de 80000 para el parámetro FSC. Luego, se eliminaron los dobletes y multipletes, seleccionando singuletes según su posición en un *dot plot* FSC-Área y FSC-Altura. Finalmente, se seleccionaron los canales de detección FL1 (Láser 488, Filtro 530/30) y FL2 (Láser 488, Filtro 585/40), para el análisis de la fluorescencia de FITC y PE, respectivamente.

Para el análisis de los datos, se utilizó el software FlowJo X.

4.5.2.5. Evaluación de los datos y modelo de predicción

En base a la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI) obtenida con las distintas marcaciones fueron calculadas la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) de CD54 y CD86 para las células THP-1 del control positivo, del control negativo, y de las muestras tratadas

con las diferentes concentraciones de reactivo a ensayar. El cálculo de RFI se realizó de acuerdo la siguiente ecuación:

$$RFI = \frac{MFI \text{ células tratadas} - MFI \text{ control de isotipo tratadas}}{MFI \text{ control} - MFI \text{ control de isotipo control}} \times 100$$

Donde:

- *MFI células tratadas* corresponde a la MFI de las células tratadas con el compuesto.
- *MFI control de isotipo tratadas* corresponde a la MFI del control de isotipo de las células tratadas con el compuesto.
- *MFI control* corresponde a la MFI de las células incubadas con el control de medio o disolvente.
- *MFI control de isotipo control* corresponde a la MFI de las células del control de isotipo incubadas con el control de medio o disolvente.

La viabilidad celular de los controles y de las muestras tratadas con las diferentes concentraciones del compuesto a ensayar fue calculada según la ecuación descrita en la sección 4.5.1.5.

Para la medición de los niveles de expresión de CD86 y CD54, cada compuesto a ensayar fue probado en por lo menos dos ensayos independientes para derivar en una predicción (positivo o negativo para sensibilizador cutáneo), según lo requerido por la guía OECD 442E (TG 442E). Una predicción hCLAT fue considerada positiva si por lo menos una de las dos condiciones siguientes fue observada en 2 de 2, o en 2 de 3 ensayos independientes. De lo contrario, la predicción hCLAT fue considerada negativa.

- La RFI de CD86 es igual o mayor a 150% para cualquiera de las concentraciones ensayadas.

- La RFI de CD54 es igual o mayor a 200% para cualquiera de las concentraciones ensayadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización del crecimiento de la línea celular THP-1

Con el fin de analizar las características metabólicas y de crecimiento de la línea celular THP-1, se realizó una curva de crecimiento. Se graficaron los valores del número de células viables, el consumo de glucosa y la producción del metabolito lactato en función del tiempo de cultivo transcurrido (Figura 6). Como era esperado, con el transcurso del tiempo, a medida que la glucosa del medio de cultivo fue utilizada como fuente de carbono y energía por las células, se observó un descenso en su concentración en el medio. A su vez, se observó un aumento en la concentración de lactato en el medio con el transcurso de los días de cultivo. Esto se explica por la ineficiencia del acoplamiento entre la glucólisis y el ciclo de Krebs, lo que resulta en la acumulación de lactato como metabolito secundario en cultivos discontinuos (Hu et al., 1987; Wagner, 1997).

Durante los días 5, 6 y 7, la concentración de glucosa en el medio de cultivo disminuyó, pero esta disminución no se vio acompañada de un aumento en la concentración de lactato. Por lo tanto, luego de día 5 de cultivo, el lactato podría estar comenzando a ser utilizado como nueva fuente de carbono y energía por las células THP-1. Se ha descrito, para esta línea celular, que los niveles de lactato acumulado en el medio de cultivo decrecen cuando la concentración de glucosa es menor a 1 mg/mL. El lactato producido por el consumo de glucosa es incorporado mediante un transportador denominado Transportador de Monocarboxilato por las células THP-1 y convertido de nuevo a piruvato, para luego formar parte del ciclo de Krebs (Wei et al., 2015). Por lo tanto, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en la literatura.

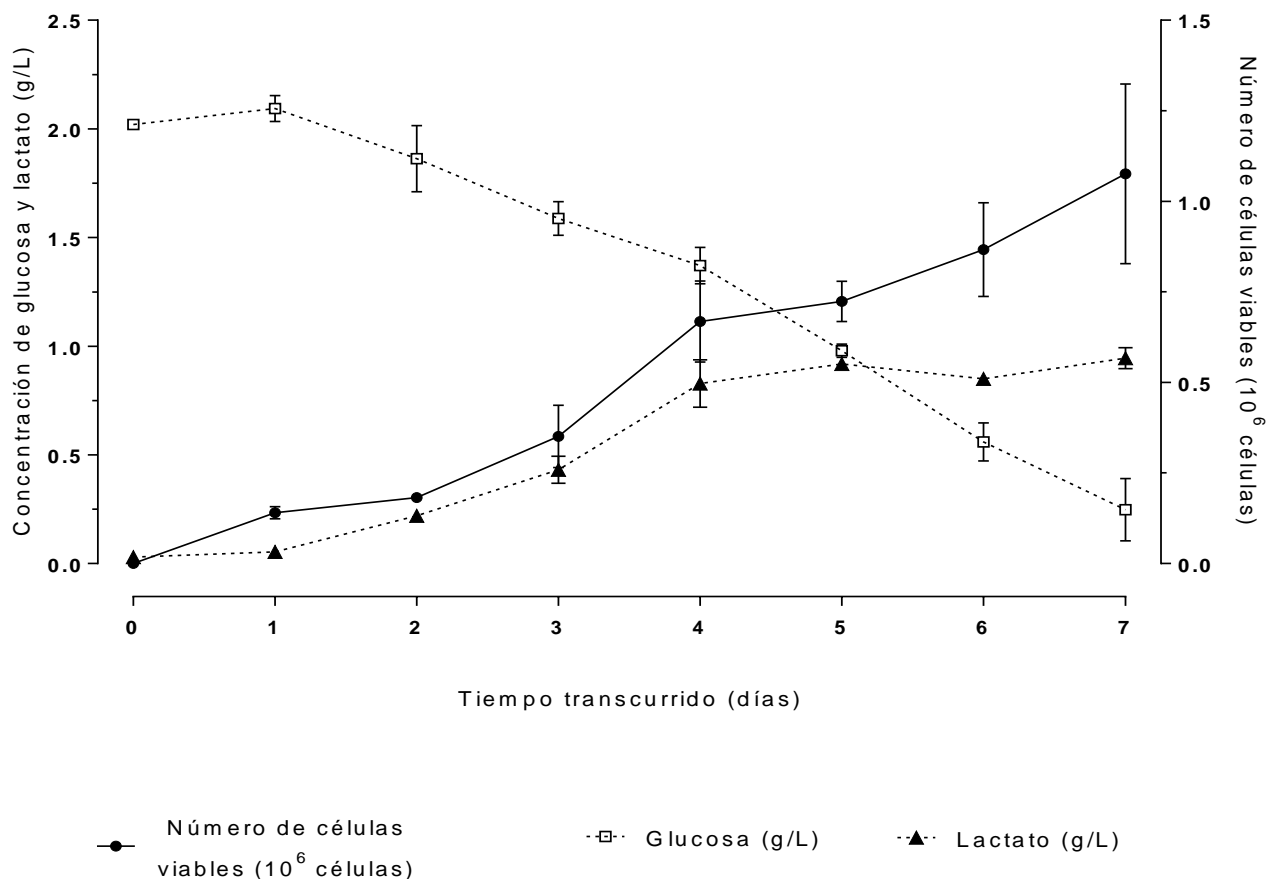


Figura 6. Curva de crecimiento de la línea celular THP-1. Determinación del número de células viables, concentración de glucosa y concentración de lactato en el medio de cultivo en función del tiempo de cultivo.

Posteriormente, se generó una representación gráfica en escala log-lineal (semilogarítmica) del número de células viables en función del tiempo transcurrido en cultivo para visualizar las fases de crecimiento del cultivo de células THP-1 (Figura 7). En el gráfico se observa que la fase de adaptación de las células, partiendo de una densidad celular de $0,3 \times 10^6$ células/mL, abarca los primeros dos días de cultivo. A partir del día 2 al día 4 ocurre un crecimiento exponencial para luego pasar a una fase de crecimiento estacionaria. Se estimó el tiempo de generación de las células THP-1 en fase de crecimiento exponencial realizando un ajuste lineal sobre los puntos definidos como fase de crecimiento exponencial donde la ecuación de la recta resultante es $y=0,2433x - 0,3293$, con un $R^2= 0,9698$. El tiempo de

generación fue hallado mediante el cálculo del tiempo requerido para duplicar el número de células viables (Mather y Roberts, 1998) y resultó ser de 20,39 horas.

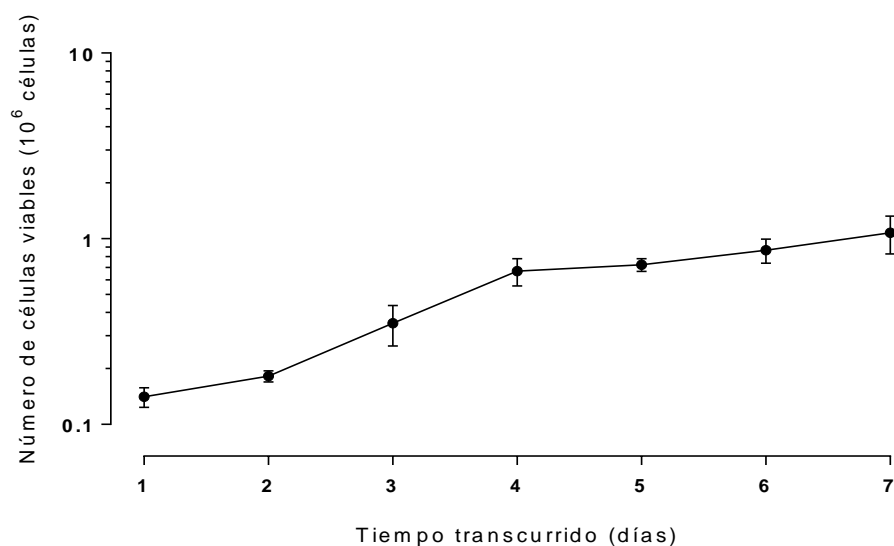


Figura 7. Representación gráfica del logaritmo en base 10 del número de células viables en función del tiempo de cultivo.

Se ha descrito que el tiempo de generación para esta línea es aproximadamente de 26 horas cuando la densidad inicial del cultivo se encuentra en el orden de 10^5 células/mL (Bowdish, 2011).

Finalmente, se calculó la tasa de incorporación de glucosa (GUR) (g/hora). El GUR, al ser proporcional al número total de células, permite estimar el crecimiento celular. Por lo tanto, se espera un aumento del GUR relacionado al incremento del número de células THP-1 con el transcurso del tiempo. Como se aprecia en la Figura 8, si bien los desvíos para algunos de los puntos son importantes, la tasa de incorporación de glucosa se incrementa a medida

que el cultivo celular crece, llegando a una meseta a partir del día 5 de cultivo, lo que coincide con el inicio de la fase estacionaria del cultivo.

Podría ser conveniente repetir el ensayo bajo las mismas condiciones realizadas, buscando minimizar los desvíos obtenidos.

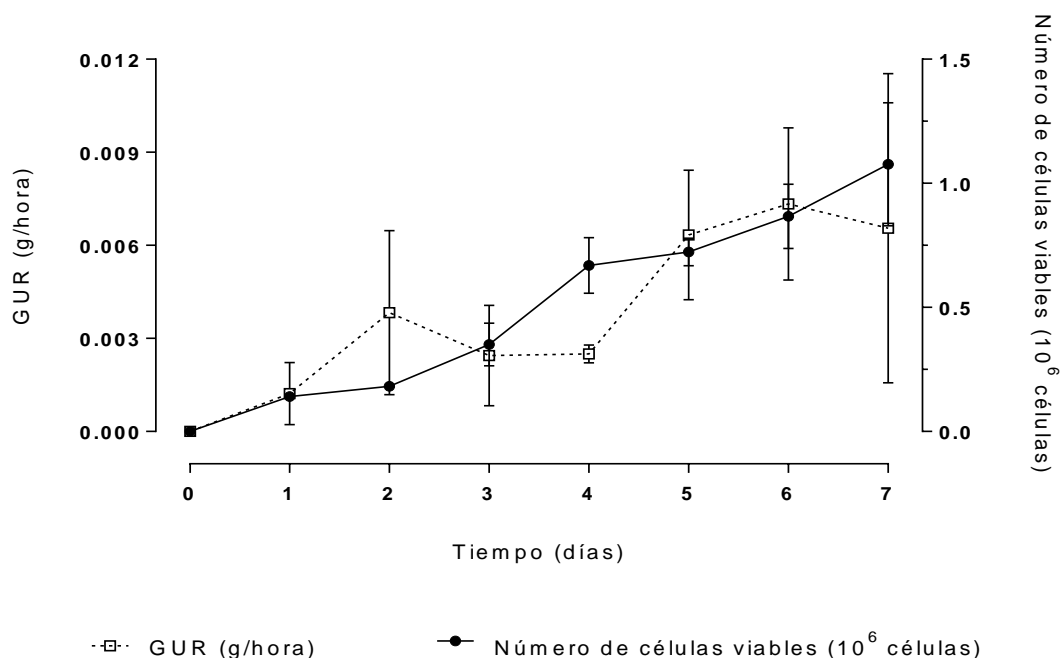


Figura 8. Representación gráfica de la tasa de incorporación de glucosa (GUR) y del número de células viables en función del tiempo de cultivo.

Es importante destacar que, hallar el tiempo de generación de las células THP-1 fue vital para el correcto monitoreo y mantenimiento de la línea celular en cultivo para los posteriores ensayos del método hCLAT.

5.2. Ensayo de verificación de especie de líneas celulares basado en PCR

Se ha reportado que la contaminación cruzada entre distintas líneas celulares en los laboratorios ocurre de forma frecuente (Markovic y Markovic, 1998). Si bien la línea THP-1 con la que se trabajó fue adquirida directamente de un repositorio celular y fue cultivada en todo momento siguiendo normas de buenas prácticas de laboratorio, consideramos importante contar en el laboratorio con un ensayo capaz de detectar este tipo de contaminación.

En este trabajo se buscó implementar un ensayo basado en PCR, el cual fue diseñado por Steube y colaboradores (2008), que permita detectar contaminaciones entre líneas celulares de diferentes especies. Este ensayo se basa en la amplificación de ciertas regiones de los genes de la beta actina y la beta globina de ratón, rata, hámster chino, hámster sirio y humano. Los cebadores fueron diseñados mayoritariamente a partir de regiones intrónicas, donde existen diferencias en las secuencias entre las diferentes especies.

5.2.1. Extracciones de ADN genómico de líneas celulares

La Tabla 4 resume los resultados de concentración de ADN genómico, coeficientes 260 nm/280 nm y coeficientes 260 nm/230 nm resultantes de la extracción de ADN genómico a partir de las líneas celulares utilizadas para implementar ensayo de verificación de especie basado en PCR.

Los cocientes 260 nm/280 nm obtenidos para las muestras de ADN genómico de hámster chino y de hámster sirio se encuentran dentro del rango 1,8 - 2,0. Esto demuestra una pureza óptima de ADN con respecto a la contaminación de las muestras con proteínas. Sin embargo,

aquellas relaciones 260 nm/280 nm obtenidas que no superaron el rango mencionado siempre fueron superiores a 1,6, lo que demuestra una pureza aceptable de las demás soluciones de ADN genómico.

Con respecto a la relación 260 nm/230 nm, para todas las soluciones de ADN genómico analizadas la misma siempre superó el valor 1,5. Esto indica la ausencia de contaminación con sales, carbohidratos y fenoles, los cuales pueden interferir con la PCR.

Por lo tanto, los resultados obtenidos para el análisis de calidad de las extracciones de ADN genómico realizadas muestran que estas soluciones de ADN se encuentran en condiciones de ser utilizadas para ensayos basados en PCR.

Tabla 4. Resultados de las extracciones de ADN genómico de líneas celulares de diferentes especies.

Línea celular	Origen	Concentración de ADN (ng/μL)	Coficiente 260/280	Coficiente 260/230
NIH3T3	Ratón	186,79	1,77	2,43
H9C2	Rata	147,82	1,71	2,5
CHOK1	Hámster Chino	419,51	1,85	2,22
BHK	Hámster Sirio	2640,56	2,06	2,28
THP-1	Humano	127,8	1,68	2,38

5.2.2. Análisis de los productos de amplificación

Luego de llevadas a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa bajo las condiciones óptimas encontradas para cada juego de cebadores que se especifican en la Tabla 3, los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2%.

Como se observa en la Figura 9, se obtuvieron los productos de amplificación de tamaño esperado para cada par de cebadores.

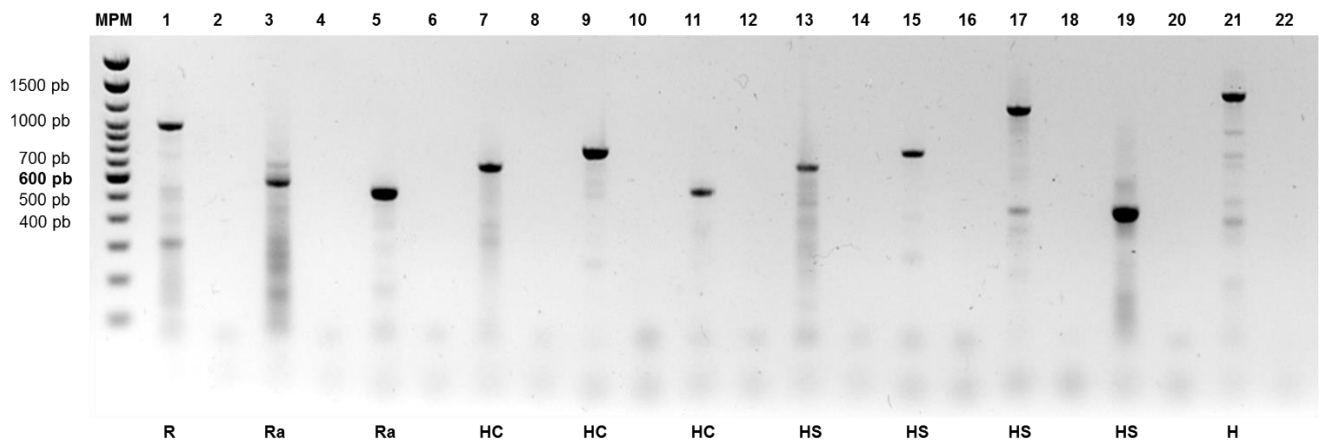


Figura 9. Análisis de productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de ADN genómico de líneas celulares de ratón (*Mus musculus*, NIH3T3), rata (*Rattus norvegicus*, H9C2), hámster chino (*Cricetulus griseus*, CHOK1), hámster sirio (*Mesocricetus auratus*, BHK) y humano (*Homo sapiens*, THP-1). Moldes. R: Ratón; Ra: Rata; HC: Hámster Chino; HS: Hámster Sirio; H: Humano. MPM: Marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder #15628-019, Invitrogen). Pares de cebadores. Carriles 1 y 2: c-globin-F / glo-mus-R; Carriles 3 y 4: glo-rat-F / glo-rat-R2; Carriles 5 y 6: act-rat-F / act-rat-R; Carriles 7 y 8: act-bHam-1F / act-bHam-1R; Carriles 9 y 10: act-bHam-2F / act-bHam-2R; Carriles 11 y 12: act-cHam-F / act-cHam-R; Carriles 13 y 14: act-bHam-1F / act-bHam-1R; Carriles 15 y 16: act-bHam-2F / act-bHam-2R; Carriles 17 y 18: glo-sHam-F / glo-sHam-R; Carriles 19 y 20: HamRepS-F / HamRepS-R; Carriles 21 y 22: Human-F / Human-R. Controles negativos. Los carriles pares corresponden a los controles negativos sin molde de DNA genómico de cada una de las amplificaciones.

Para el par de cebadores act-Hum-F/act-Hum-R dirigido hacia el gen de la beta actina de humano descrito en por Steube y colaboradores (2008), no fue posible obtener el producto de amplificación esperado. Por ello, fue utilizado un par de cebadores dirigido hacia el gen de la beta globina de humano Human-F/Human-R, diseñado por Steube y colaboradores en un trabajo previo al citado (2003).

5.2.3. Validación del ensayo de verificación de especie de líneas celulares basado en PCR y análisis de la sensibilidad de los pares de cebadores utilizados

Una vez establecidas las condiciones óptimas de amplificación de los cebadores utilizando como molde ADN genómico de la especie en base al cual fueron diseñados los cebadores, se procedió a evaluar su especificidad. Para ello, se llevarán a cabo PCRs utilizando como molde ADN genómico de las distintas especies que se pretenden distinguir con el ensayo. Hasta el momento fue evaluada la especificidad para tres pares de cebadores, dos específicos para el gen de la globina y actina de rata (glo-rat-F / glo-rat-R2 y act-rat-F / act-rat-R) y uno capaz de amplificar una región del gen de la actina tanto de hámster chino como de hámster sirio (act-bHam-1F / act-bHam-1R).

Simultáneamente, con el objetivo de evaluar cuál es el mínimo nivel de contaminación que el ensayo es capaz de detectar, se comenzó con el análisis de la sensibilidad de los pares de cebadores utilizados. Esto fue llevado a cabo mediante el diseño de un ensayo basado en PCR donde se simuló contaminación de la línea celular NIH 3T3 de ratón con las líneas celulares H9C2 de rata y CHOK1 de hámster chino, estableciendo porcentajes de 10, 20, 30, 40 y 50% de contaminación. Estas contaminaciones fueron generadas a través de la mezcla de ADN genómico del contaminante (rata o hámster chino) con cierta cantidad de ADN genómico de la línea contaminada (de ratón), para llegar a una cantidad total de 25 ng de ADN genómico molde en el tubo de reacción.

Las condiciones de PCR para cada par de cebadores fueron las mismas que las mencionadas en la Tabla 2 de este trabajo.

Por lo tanto, este experimento fue diseñado de forma tal que simultáneamente se comprobó la especificidad de especie de cada par de cebadores analizado y su sensibilidad para la detección de diferentes niveles de contaminación.

En primer lugar, la Figura 10 A muestra que el par de cebadores glo-rat-F / glo-rat-R2 diseñados para la beta globina de rata no son capaces de generar un producto de amplificación cuando el único molde de ADN genómico en el tubo de reacción corresponde a ADN genómico de ratón (Carril 7). A su vez, en la simulación de contaminaciones de ADN genómico de ratón derivado de la línea celular NIH 3T3 con ADN genómico de rata derivado de la línea celular H9C2, este par de cebadores fue capaz de detectar levemente niveles del 20% y del 30% de contaminación (Carriles 2 y 3). Niveles de contaminación del 40% y del 50%, sin embargo, fueron detectados de forma evidente (Carriles 4 y 5).

En segundo lugar, la Figura 10 B muestra que el par de cebadores act-rat-F / act-rat-R diseñados para la beta actina de rata no es capaz de generar un producto de amplificación cuando el único ADN genómico molde presente en el tubo de reacción corresponde a ADN genómico de ratón (Carril 7). Además, con este juego de cebadores se logró detectar de forma evidente un nivel mínimo de contaminación con ADN genómico de rata del 20% en la simulación de contaminación (Carril 2).

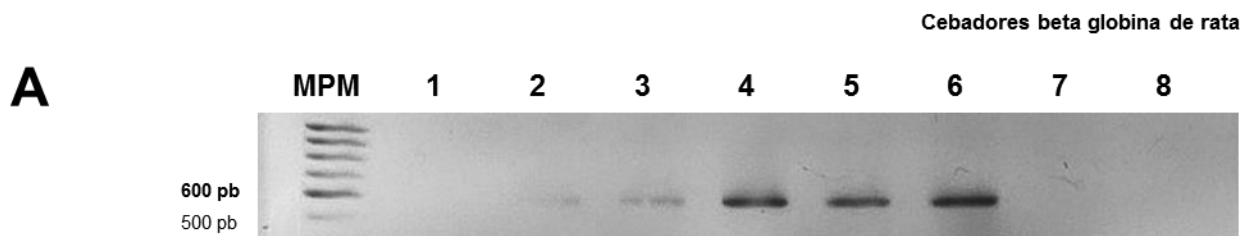
A partir de los resultados obtenidos para ambos pares de cebadores diseñados para la detección de genes blanco de rata, se puede concluir que no detectan inespecíficamente ADN genómico de ratón. En cuanto a la sensibilidad de estos cebadores se observó que, los diseñados para amplificar una región del gen de la beta actina de rata poseen una mayor sensibilidad que el par de cebadores destinados a la detección de una región del gen de la beta globina de rata.

Por último, en la Figura 10 C se puede observar que el par de cebadores act-bHam-1F / act-bHam-1R diseñados para la detección de la beta actina de hámster, los mismos no son capaces de generar un producto de amplificación cuando la reacción de PCR ocurre sólo en presencia de ADN genómico molde de ratón (Carril 7). Este juego de cebadores fue capaz

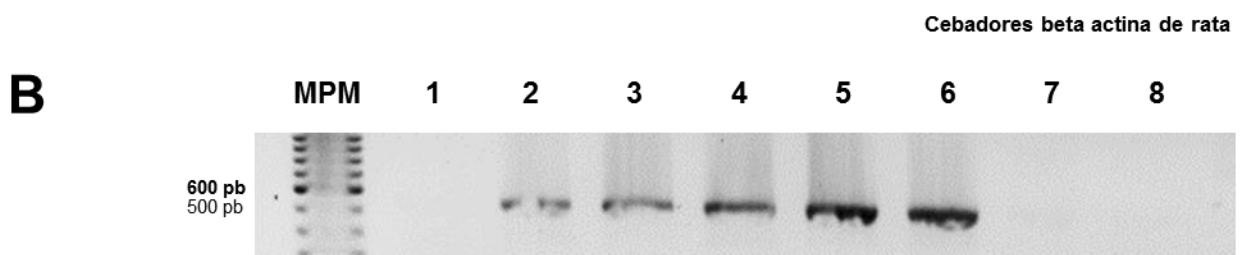
de detectar un nivel mínimo de contaminación de ADN genómico de ratón con ADN genómico de hámster chino derivado de la línea celular CHOK1 del 10% (Carril 1) en la simulación de contaminación, siendo la detección de un nivel de contaminación del 40% o 50% más evidente (Carril 4).

Utilizando la estrategia antes mencionada se continuará con el análisis del resto de los juegos de cebadores descritos en el ensayo de verificación especie de líneas celulares, tanto para la evaluación de su especificidad de especie como para el análisis de la sensibilidad de cada par en la detección de mínimos niveles de contaminación. Una vez realizados todos los controles se contará con un método robusto y eficiente basado en PCR que permitirá la detección de contaminaciones cruzadas con líneas celulares de diferentes especies y la verificación de la especie de la línea celular con la que se esté trabajando, lo cual es de vital importancia para la validación de ensayos *in vitro* que involucran el uso de líneas celulares.

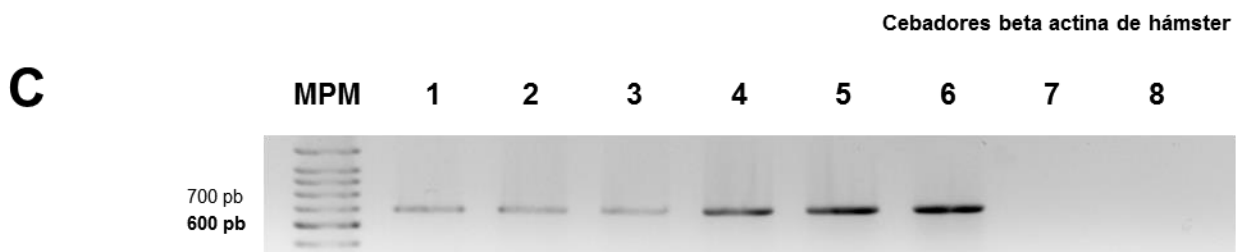
En el caso del ensayo *in vitro* basado en el método hCLAT, donde se trabajó con la línea celular THP-1 que fue adquirida directamente de un repositorio celular, que posee un número de pasajes bajo y que fue manipulada siguiendo normas de buenas prácticas de laboratorio, no consideramos que la verificación de especie y la búsqueda de contaminaciones cruzadas fuera necesario en esta etapa para su utilización. Sin embargo, este ensayo basado en PCR para la verificación de especie de líneas celulares es una herramienta útil con la que contar en el laboratorio, la cual se aplicará a las células THP-1 y al resto de líneas celulares que constituyen el banco celular de la Unidad de Biología Celular.



	1	2	3	4	5	6	7	8
ADN genómico de línea celular H9C2 (Rata)	10%	20%	30%	40%	50%	+	-	-
ADN genómico de línea celular NIH 3T3 (Ratón)	90%	80%	70%	60%	50%	-	+	-



	1	2	3	4	5	6	7	8
ADN genómico de línea celular H9C2 (Rata)	10%	20%	30%	40%	50%	+	-	-
ADN genómico de línea celular NIH 3T3 (Ratón)	90%	80%	70%	60%	50%	-	+	-



	1	2	3	4	5	6	7	8
ADN genómico de línea celular CHOK1 (Hámster chino)	10%	20%	30%	40%	50%	+	-	-
ADN genómico de línea celular NIH 3T3 (ratón)	90%	80%	70%	60%	50%	-	+	-

Figura 10. Análisis de productos de amplificación obtenidos en ensayos de simulación de contaminaciones. **A.** Simulación de contaminación la línea celular de ratón NIH 3T3 con la línea celular de rata H9C2. El par de cebadores utilizado en este ensayo fue glo-rat-F / glo-rat-R2. **B.** Simulación de contaminación la línea celular de ratón NIH 3T3 con la línea celular de rata H9C2. El par de cebadores utilizado en este ensayo fue act-rat-F / act-rat-R. **C.** Simulación de contaminación la línea celular de ratón NIH 3T3 con la línea celular de hámster chino CHOK1. El par de cebadores utilizado en este ensayo fue act-bHam-1F / act-bHam-1R. **MPM:** marcador de peso molecular.

5.3. Ensayo de activación de línea celular humana (hCLAT)

Previo a la utilización de este ensayo en la evaluación de la sensibilización dérmica de sustancias, los laboratorios deben demostrar su competencia en el desarrollo del método. Para ello, se debe llevar a cabo el ensayo utilizando las diez sustancias de acción conocida recomendadas en la guía OECD 442E (TG 442E) (Sustancias de competencia).

En este trabajo, en una primera instancia, fueron evaluadas dos de las sustancias recomendadas, 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) y ácido láctico. El DNCB es definido por la guía como control positivo del ensayo y el ácido láctico como control negativo. Posteriormente, se trabajó con otras de las sustancias de competencia, el sulfato de níquel, el isopropanol y el glicerol. Además, se ensayó un herbicida de uso agrícola denominado PARAQUAT (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) (proporcionado por la empresa CALISTER). Las características de las sustancias de competencia empleadas en este trabajo se resumen en la Tabla A2.1.

Las células THP-1 empleadas en este trabajo fueron descongeladas a partir de crioviales del banco celular de trabajo generado como se indicó en la sección 4.1.4. y las mismas fueron mantenidas en cultivo durante dos semanas antes de ser utilizadas.

5.3.1. Medición de la citotoxicidad: búsqueda de la concentración CV75 para el Ácido Láctico y el DNCB

En primer lugar, es necesario establecer para cada sustancia a evaluar la máxima concentración subtóxica, que no provoque más de un 25% de muerte celular, con las cuales analizar el efecto sobre los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86. Se determinó entonces la concentración de la sustancia con la cual se obtiene un 75% de

viabilidad celular (CV75) en el cultivo de células THP-1, mediante la realización de una curva de dosis-respuesta. En el caso de no haber determinado el CV75, por no haberse observado suficiente citotoxicidad en el ensayo de búsqueda de la concentración CV75, la guía OECD 442E (TG 442E) establece que se deberá partir de la mayor concentración del reactivo analizada para evaluar la expresión de las moléculas CD54 y CD86.

Luego de la incubación de las células THP-1 con 8 diluciones seriadas en base dos de la sustancia a ensayar (preparación descrita en sección 4.5.1.2.), la viabilidad celular fue determinada mediante tinción con Ioduro de Propidio (IP) y análisis por citometría de flujo como fue descrito en la sección 4.5.1.4. La estrategia de *gating* incluyó, en primer lugar, la selección de las células THP-1 Totales (viables y no viables) en un *dot plot* Side Scatter (SSC) en función de Forward Scatter (FSC). Luego, dicha región fue aplicada sobre un *dot plot* FSC-Área (FSC-A) en función de FSC-Altura (FSC-H), donde fue establecida una segunda región: Singuletes. Finalmente, esta región Singuletes fue aplicada sobre un *dot plot* SSC en función del canal de detección de fluorescencia FL2 (laser 488, Filtro 585/40) para determinar una tercera población, denominada Ioduro de Propidio Positivas (IP+) (Figura 11). Esta última región se definió en función de la fluorescencia de células sin marcar con IP.

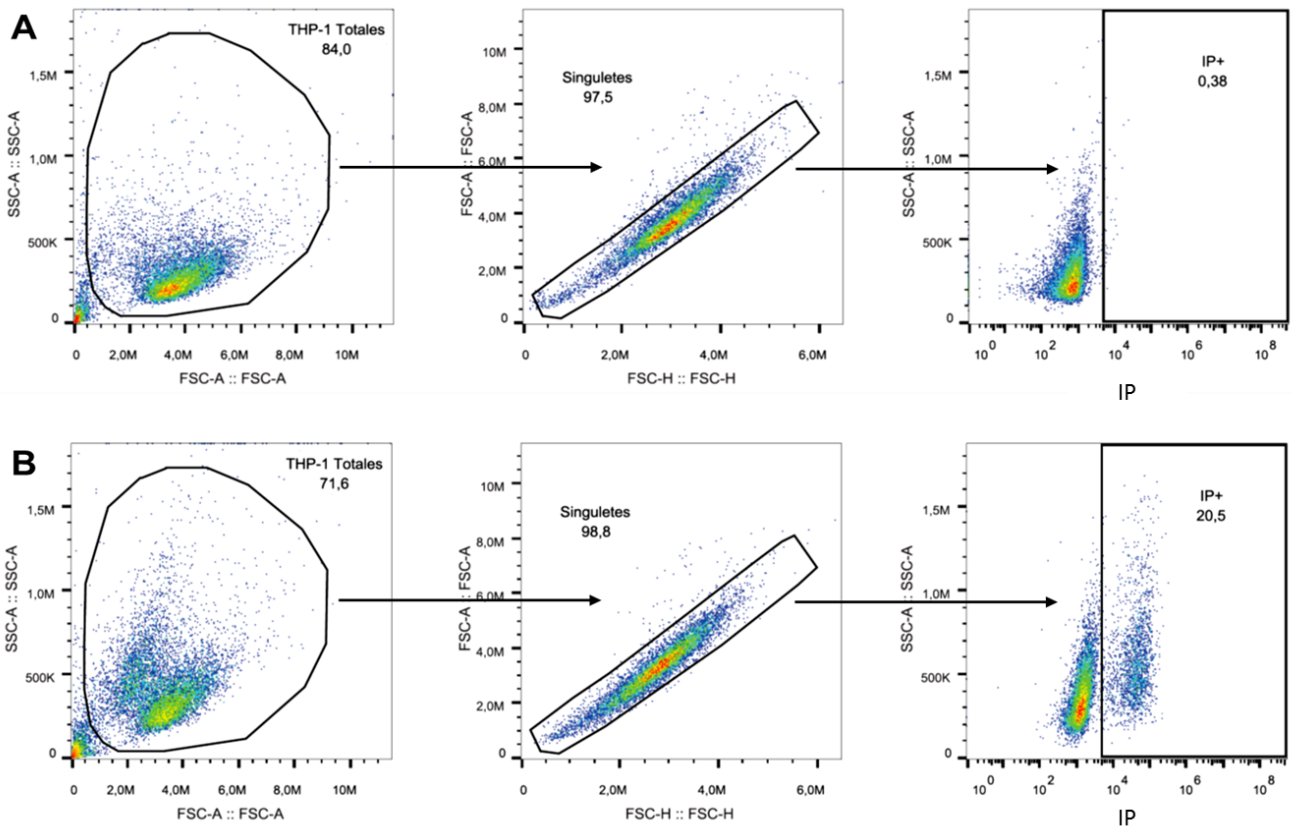


Figura 11. Estrategia de *gating* para el análisis del ensayo de medición de la citotoxicidad y búsqueda de la concentración CV75 de los compuestos a ensayar. A. Estrategia de *gating* aplicada sobre una muestra control de medio RPMI-1640 completo sin tinción con yoduro de propidio. Los gates THP-1 Totales, Singuletes y yoduro de propidio positivas (IP+) fueron establecidos para esta muestra y posteriormente extrapolados a todas las muestras con tinción con yoduro de propidio (control de medio RPMI-1640 completo, control de vehículo DMSO y tratadas con las diferentes concentraciones del reactivo a ensayar). B. Extrapolación de la estrategia de *gating* aplicada sobre A a una muestra tratada con una concentración de reactivo que exhibió un 20,5% de THP-1 positivas para yoduro de propidio (79,5% de viabilidad celular).

5.3.1.1. Búsqueda de la concentración CV75 para el Ácido Láctico

Para la medición de la citotoxicidad y búsqueda de la concentración CV75 del ácido láctico, en una primera aproximación, se generó un ensayo donde la máxima concentración en la placa fue 1000 µg/mL. La curva dosis/respuesta resultante de este ensayo muestra que la viabilidad celular fue mayor al 75% para todas las concentraciones analizadas (Figura 12).

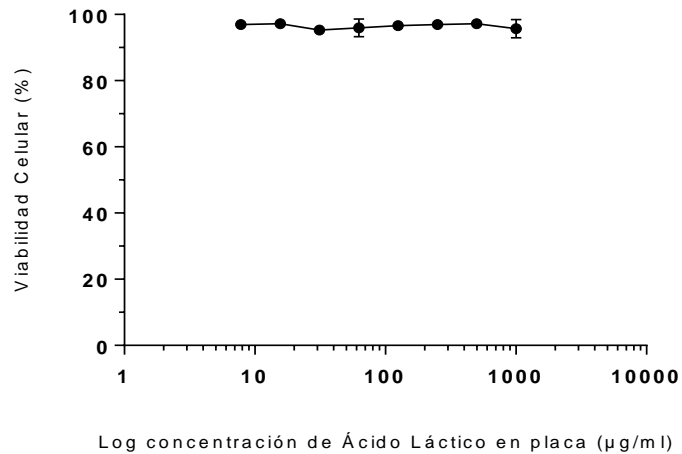


Figura 12. Curvas dosis/respuesta obtenidas a partir de los ensayos de citotoxicidad realizados con el reactivo ácido láctico. A. Curva dosis/respuesta obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad realizado con el reactivo ácido láctico en un rango de concentraciones de 7,81 - 1000 µg/mL.

Dado que, bajo este rango de concentraciones de ácido láctico no se observó citotoxicidad, se realizaron otros ensayos de medición de la toxicidad con una concentración máxima en placa del ácido láctico de 2000 µg/mL (Figura 13 A) y 2500 µg/mL (Figura 13 B). Las curvas dosis/respuesta obtenidas, sin embargo, no muestran viabilidades celulares menores al 75% para ninguna de las concentraciones analizadas.

A partir de estos resultados, se decidió llevar a cabo el ensayo de medición de los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD54 y CD86 a partir de las concentraciones 3000 µg/mL y 3600 µg/mL de ácido láctico.

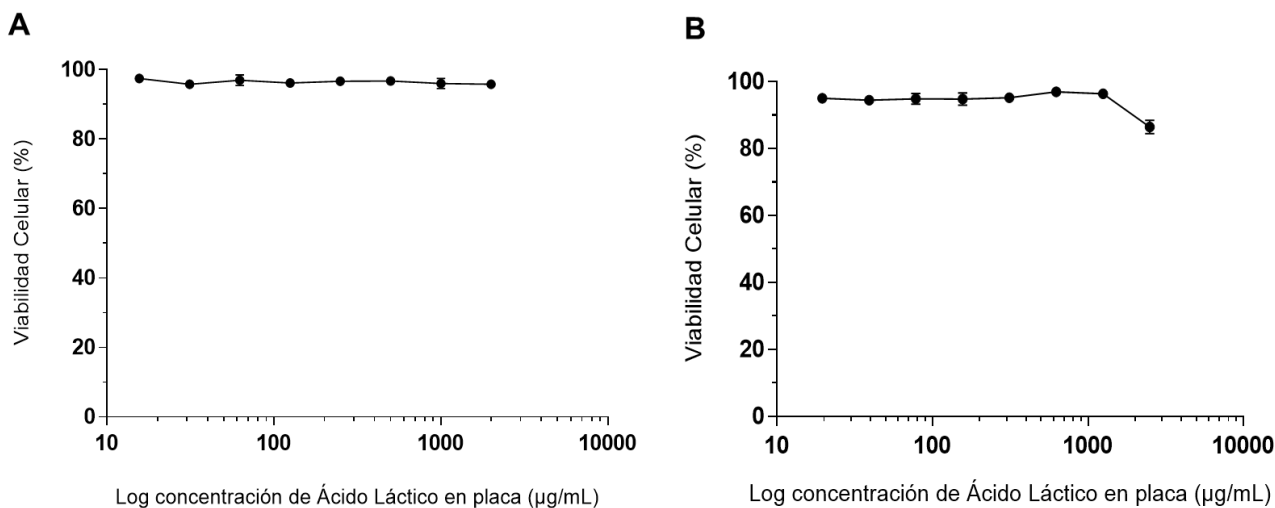


Figura 13. Curvas dosis/respuesta obtenidas a partir de los ensayos de citotoxicidad realizados con el reactivo ácido láctico. A Curva dosis/respuesta obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad realizado con el reactivo ácido láctico en un rango de concentraciones de 15,625 - 2000 µg/mL. **B.** Curva dosis/respuesta obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad realizado con el reactivo ácido láctico en un rango de concentraciones de 19,55 - 2500 µg/mL.

5.3.1.2. Búsqueda de la concentración CV75 para el DNCB

El ensayo para la medición de la citotoxicidad y búsqueda de la concentración CV75 del DNCB fue llevado a cabo partiendo de una concentración máxima en placa de 1000 µg/mL (Figura 14). En la curva dosis/respuesta obtenida para este reactivo, la menor concentración evaluada, la cual corresponde a 3,9 µg/mL, generó un valor de viabilidad del 73.1% (Tabla A2.2). Con este resultado, no fue posible calcular la concentración CV75 para el DNCB aplicando la ecuación que fue indicada en la sección 4.5.1.5., en la cual debe ser incluido el primer valor de viabilidad celular por encima de 75% y el primer valor de viabilidad celular por debajo de 75%, junto con las respectivas concentraciones de ácido láctico que generaron dichos valores de viabilidad celular.

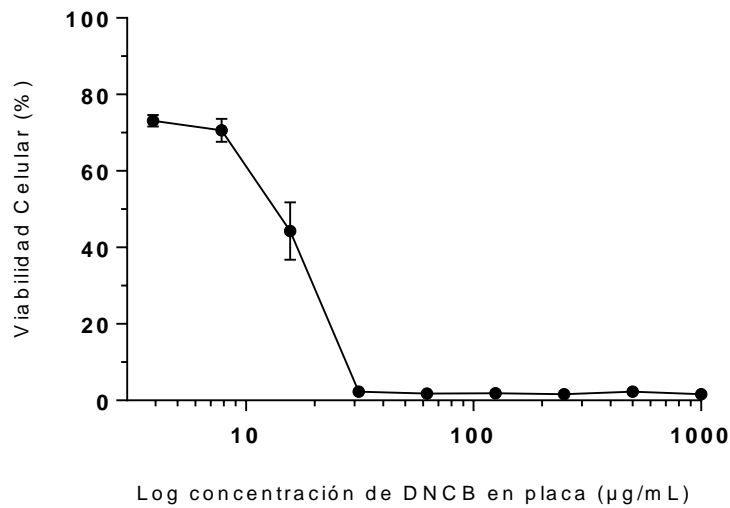


Figura 14. Curva dosis/respuesta obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad realizado con el reactivo DNCB. El rango de concentración del reactivo en placa fue 3,9 - 1000 µg/mL

Con la concentración del 3,9 µg/mL de DNCB se obtuvo una viabilidad del 73,1%, muy cercana al 75% buscado. Por otra parte, la guía OECD recomienda el uso de una concentración de 4 µg/mL de DNCB como control positivo del ensayo (Tabla A2.1), por lo que se seleccionó esta concentración para realizar el ensayo de activación.

5.3.2. Medición de los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86

El cambio en los niveles de expresión de las moléculas de superficie celular CD54 y CD86 tras la exposición de las células THP-1 a un compuesto fue evaluado en ocho diluciones seriadas en base 1,2 de la forma en la que se describe en la sección 4.5.2.2.

La viabilidad celular fue analizada luego de la incubación de las células THP-1 con las diferentes concentraciones del reactivo a ensayar mediante la tinción con IP y análisis por citometría de flujo como fue descrito en la 4.5.1.4. y mediante la aplicación de la estrategia de *gating* descrita en la sección 5.3.1.

Luego, los niveles de expresión de las moléculas mencionadas fueron evaluados mediante marcación de las células THP-1 con anticuerpos específicos para dichas moléculas y análisis por citometría de flujo donde la estrategia de *gating* incluyó, en primer lugar, la selección de las células THP-1 Viables en un *dot plot* SSC en función de FSC. Luego, dicho *gate* fue aplicado sobre un *dot plot* FSC-A en función de FSC-H, donde fue establecido un segundo *gate*: Singuletes. Finalmente, el *gate* Singuletes fue aplicado sobre histogramas para los canales de detección de fluorescencia FL1 (PE) y FL2 (FITC), donde se determinó un tercer *gate*, denominado FITC+ o PE+, dependiendo de la molécula de superficie analizada (Figura 15).

Este tercer *gate* fue generado para monitorear los resultados del ensayo a medida que las adquisiciones eran llevadas a cabo, pero no fue realizado con el fin de seleccionar poblaciones de células THP-1 positivas para las moléculas analizadas (para las cuales existen niveles de expresión basales detectables). El análisis de los cambios en los niveles de expresión de las moléculas CD86 y CD54 tras la incubación de las células THP-1 con un compuesto involucra la evaluación de valores de intensidad de fluorescencia media y el

cálculo de valores de intensidad de fluorescencia relativa como se indica en la sección 4.5.2.5.

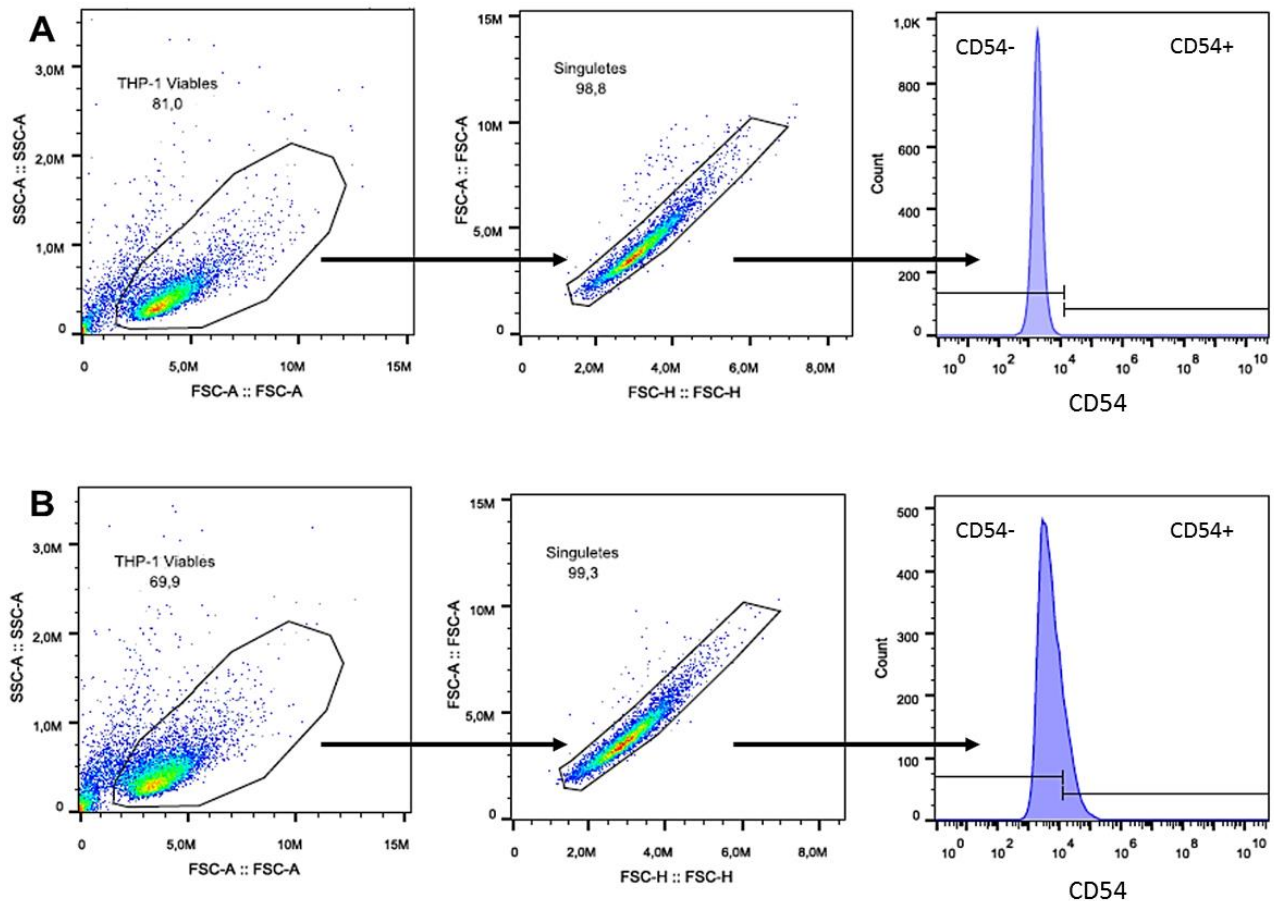


Figura 15. Estrategia de *gating* para el análisis de los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86. A. Estrategia de *gating* aplicada sobre una muestra control de medio RPMI-1640 completo sin marcación con ninguno de los anticuerpos. Los gates THP-1 Totales, Singuletes y FITC+ y FITC- fueron establecidos para esta muestra y posteriormente extrapolados a todas las muestras marcadas con anti-CD54-FITC (control de medio RPMI-1640 completo, control de vehículo DMSO, control positivo (DNCB), control negativo (ácido láctico) y a las muestras tratadas con las diferentes concentraciones del reactivo a ensayar). B. Extrapolación de la estrategia de *gating* aplicada sobre A a una muestra tratada con una concentración de reactivo y marcada con el anticuerpo anti-CD54-FITC.

5.3.2.1 Titulación de anticuerpos

En esta sección se exponen los resultados obtenidos para la titulación de los anticuerpos anti-CD54-FITC y anti-CD86-PE. Esta titulación fue realizada con el fin de determinar las concentraciones de estos anticuerpos a utilizar en el ensayo de medición de la expresión de los marcadores de superficie CD54 y CD86 del método hCLAT. Se buscó determinar la concentración de cada anticuerpo que generara una señal máxima con el menor ruido posible, el cual puede deberse a uniones inespecíficas o de baja afinidad de los anticuerpos cuando los mismos se encuentran presentes en exceso. Por lo tanto, la concentración óptima es la que proporciona una mejor relación señal/ruido con el menor consumo de estos biorreactivos.

Para llevar a cabo esta titulación, se ensayaron por duplicado diferentes diluciones del anticuerpo anti-CD54-FITC (1/50, 1/100 y 1/200) y del anticuerpo anti-CD86-PE (1/20, 1/50 y 1/100) sobre células THP-1 tratadas con DNCB a una concentración final en placa de 4 µg/mL con la cual se logra la activación de estas células y con el control de disolvente DMSO a una concentración final de 0,20%.

Los niveles de Intensidad de Fluorescencia Media geométrica (MFI) tanto para las células tratadas con DNCB como para las células incubadas con el control de disolvente (DMSO) fueron evaluados por citometría de flujo y mediante la aplicación de la estrategia de *gating* indicada en la sección 5.3.2. A partir de estos resultados, se evaluó la dilución óptima de cada anticuerpo para la cual existe una mejor relación señal ruido mediante el cálculo del *Stain Index* (SI) y la observación de los *plots* de citometría obtenidos para las células tratadas y las células control. La Tabla 5 resume los resultados obtenidos para este ensayo en cuanto a valores de MFI.

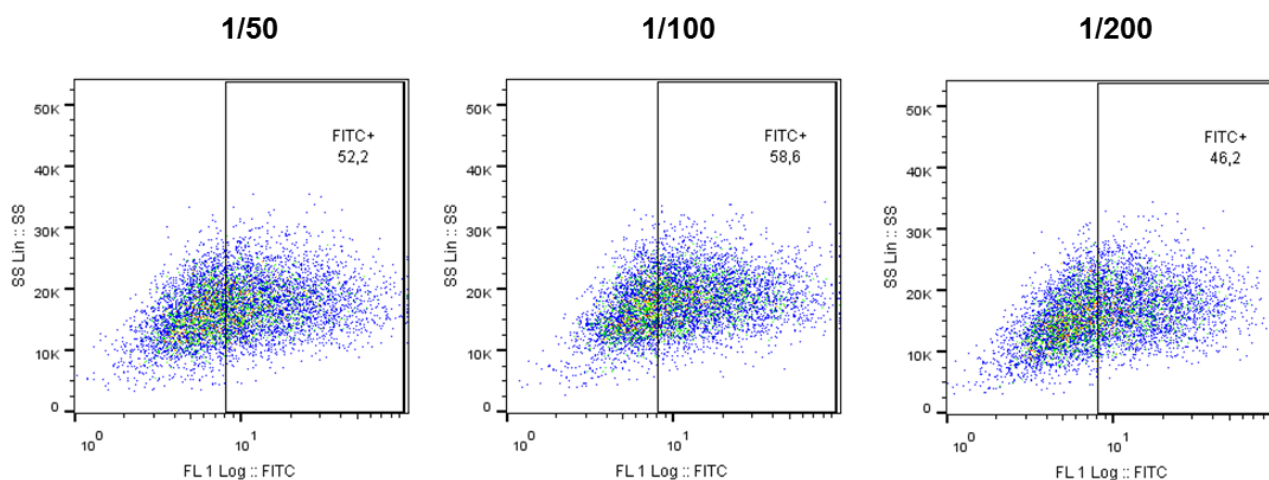
Tabla 5. Resultados promedio de dos réplicas del ensayo de titulación de los anticuerpos anti-CD54-FITC y anti-CD86-PE. MFI: Intensidad de Fluorescencia Media geométrica.

Muestras	Viabilidad Celular Promedio (%)	Valores de MFI promedio para anti-CD54-FITC			Valores de MFI promedio para anti-CD86-PE		
		Dilución 1/50	Dilución 1/100	Dilución 1/200	Dilución 1/20	Dilución 1/50	Dilución 1/100
DNCB (4µg/mL)	70,05	12,10	12,70	8,19	4,87	4,34	3,59
Control de disolvente DMSO (0,20%)	95,82	6,05	3,45	4,06	3,10	2,86	2,66
Desvío estándar (sd) de valores MFI de células control de disolvente (DMSO)							
		0,79	0,85	0,98	0,15	0,11	0,10
Stain Index (MFI DNCB - MFI DMSO)/(2sd DMSO)							
		3,82	5,44	2,11	5,96	6,54	4,65

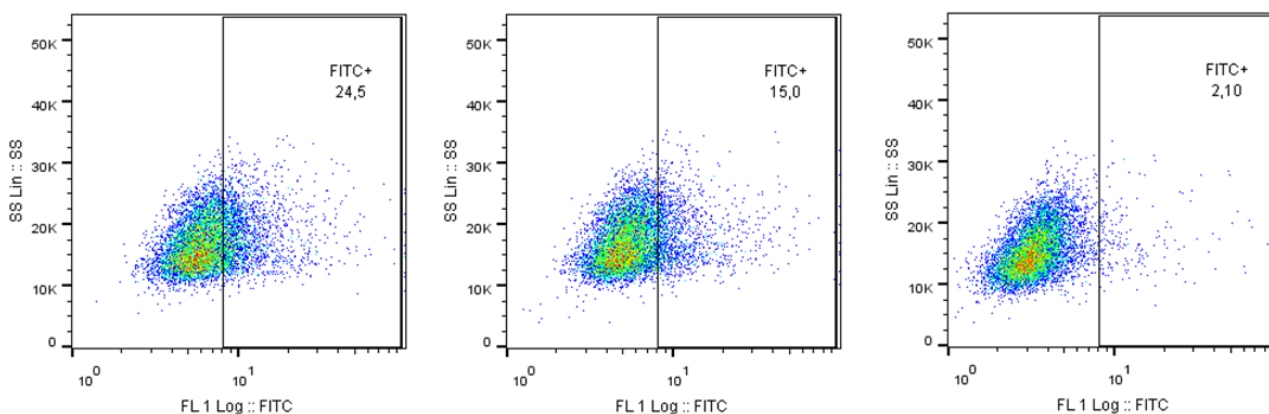
Como puede observarse, para el anticuerpo anti-CD54-FITC, el mejor valor de SI obtenido fue el resultante para una dilución 1/100 del mismo. Las diluciones 1/50 y 1/200 presentaron valores menores al observado para la dilución 1/100. Para el caso del anticuerpo anti-CD86-PE, el SI fue similar para las diluciones 1/20 y 1/50 del mismo y menor para la dilución 1/100. Por otra parte, al comparar los porcentajes de células positivas para la marcación con anti-CD54-FITC en los *dot plots* obtenidos para las células control de disolvente con los de las células tratadas con DNCB (Figura 16), se observa que con la dilución 1/200 del anticuerpo se obtiene una mayor diferencia entre las células tratadas y sin tratar. A partir de estos resultados, la dilución 1/200, que corresponde a una concentración de 0,5 µg/mL del

anticuerpo anti-CD54-FITC, fue elegida para ser utilizada en el ensayo de medición de los niveles de expresión de marcadores de superficie celular en el método hCLAT.

Anti-CD54-FITC



Tratamiento con DNCB (4µg/mL)

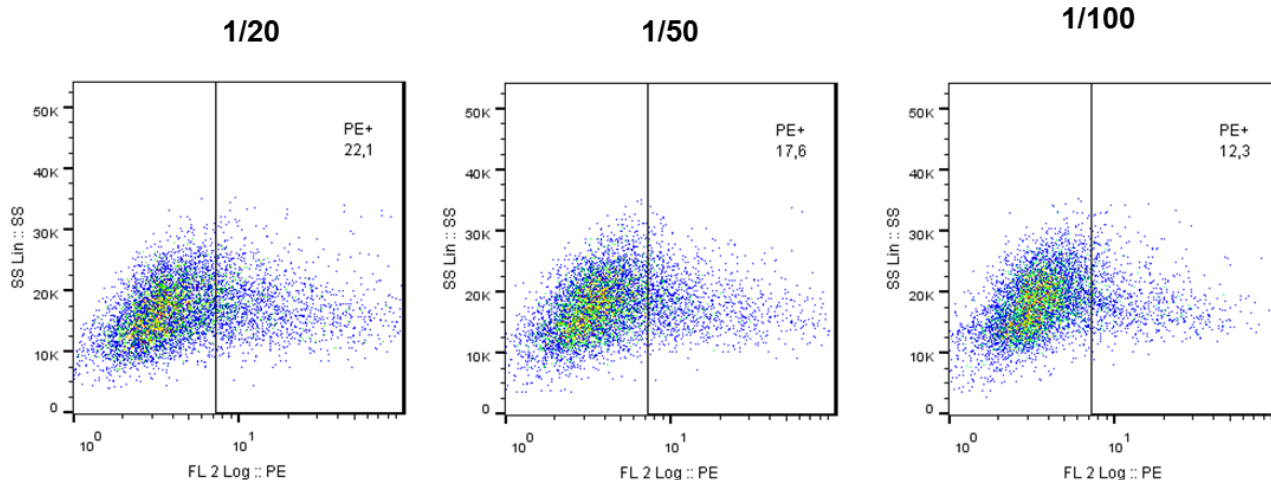


Control de disolvente (DMSO 0,2%)

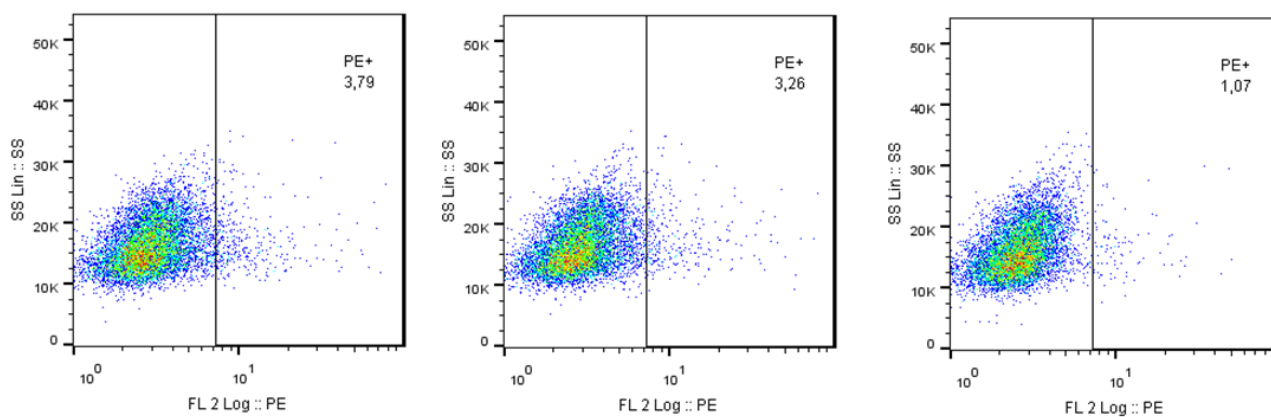
Figura 16. Dot plots obtenidos a partir del análisis por citometría de flujo del ensayo de titulación del anticuerpo anti-CD54-FITC. Se muestran los niveles de fluorescencia detectada mediante el canal de detección FL1 para células THP-1 tratadas con DNCB (4 µg/mL) o con el control de disolvente DMSO (0,20%) y marcadas con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD54-FITC, correspondientes a las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200 del mismo. Los cuadrantes de las células FITC+ se determinaron a partir del análisis de células control de disolvente sin marcar.

En cuanto al anticuerpo anti-CD86-PE, la Figura 17 muestra que, los porcentajes de células positivas obtenidas en los *dot plots* de las células control de disolvente y de las células tratadas con DNCB para las diluciones del anticuerpo 1/20 y 1/50 son muy similares. Estas diluciones de anticuerpo produjeron los mejores valores de SI, por lo que, se seleccionó la dilución 1/50 de este anticuerpo para ser usada en el ensayo de medición de los niveles de expresión de marcadores de superficie mediante el método hCLAT. La dilución 1/50 del anticuerpo anti-CD86-PE corresponde a una concentración de 1 µg/mL del mismo.

Anti-CD86-PE



Tratamiento con DNCB (4µg/mL)



Control de disolvente (DMSO 0,2%)

Figura 17. Dot plots obtenidos a partir del análisis por citometría de flujo del ensayo de titulación del anticuerpo anti-CD86-PE. Se muestran los niveles de fluorescencia detectada mediante el canal de detección FL2 para células THP-1 tratadas con DNCB (4 µg/mL) o con el control de disolvente DMSO (0,20%) y marcadas con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD86-PE, correspondientes a las diluciones 1/20, 1/50 y 1/100 del mismo. Los cuadrantes de las células PE+ se determinaron a partir del análisis de células control de disolvente sin marcar.

La viabilidad de las muestras analizadas siempre fue superior al 50% para las células tratadas con DNCB y mayor a 90% para los controles de disolvente (DMSO).

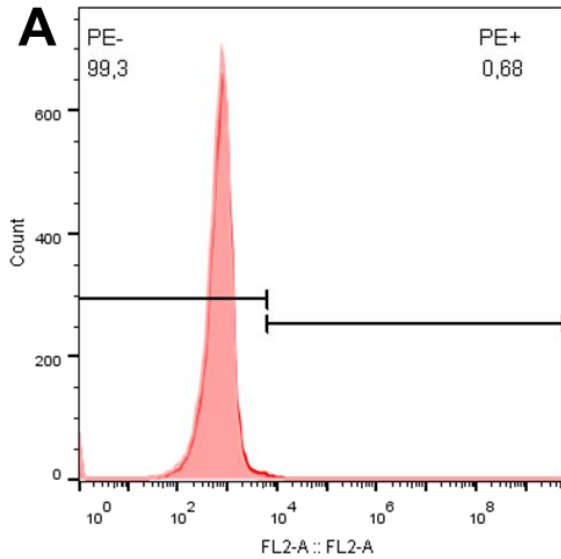
A partir de los resultados de la titulación de los anticuerpos anti-CD54-FITC y anti-CD86-PE, se definieron las concentraciones de anticuerpos a usar con los controles de isotipo en el ensayo de medición de los niveles de expresión de moléculas de superficie en el método hCLAT.

Se utilizó una dilución 1/2500 para el anticuerpo Mouse IgG1 sin conjugar, la cual corresponde a una concentración de 1 µg/mL de este anticuerpo y una dilución de 1/1000 de un anticuerpo secundario anti-Mouse IgG1-PE para revelar el control de isotipo. A su vez, fue utilizada una dilución 1/100 del anticuerpo Mouse IgG1-FITC, la cual corresponde a una concentración de 5 µg/mL.

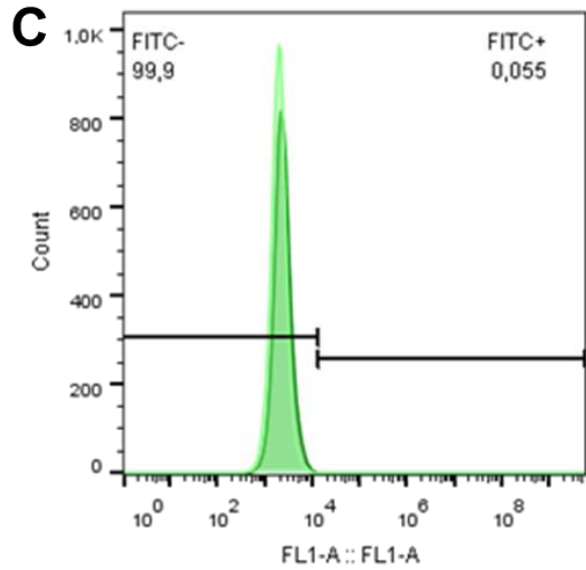
Como se observa en los histogramas donde se superpone la fluorescencia de las células sin marcación y marcadas con los controles de isotipo, no se observa marcación inespecífica de las inmunoglobulinas de ratón, ni en las células tratadas con DNCB (Figura 18 A y C), ni en las células incubadas con el control de disolvente (DMSO) (Figura 18 B y D). Esto indica que las inmunoglobulinas de ratón no interaccionarían con componentes celulares de superficie de la línea THP-1 en las condiciones de marcación y de lavado establecidas.

Finalmente, es pertinente mencionar que se incluyeron los controles de isotipos para cada anticuerpo estudiado debido a que está estipulado en la guía OECD. Sin embargo, desde hace varios años, es un tema de debate dentro de la comunidad científica que utiliza

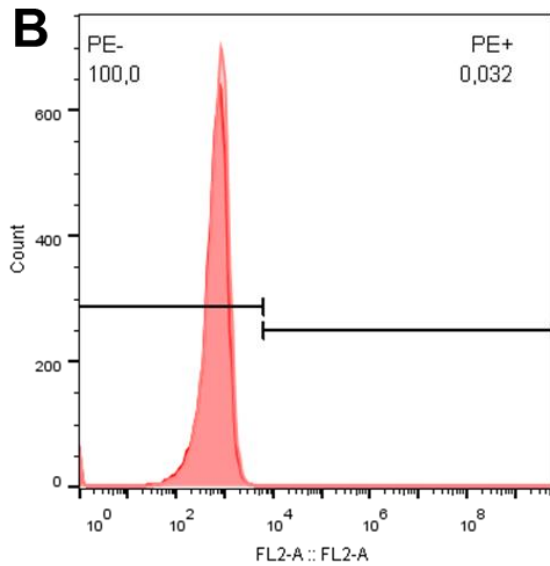
citometría de flujo. La tendencia generalizada en los últimos años es no utilizar controles de isotipo (Maecker et al., 2006; Hulspas et al., 2009), salvo en determinadas circunstancias.



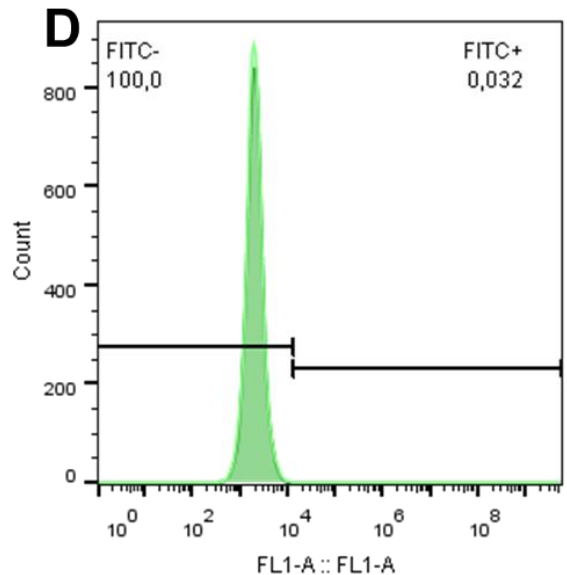
■ Control de disolvente DMSO sin marcar.
 ■ Control de disolvente DMSO. Marcación Control de Isotipo conjugado a PE.



■ Control de disolvente DMSO sin marcar.
 ■ Control de disolvente DMSO. Marcación Control de Isotipo conjugado a FITC.



■ Tratamiento con 4 µg/mL de DNCB sin marcar.
 ■ Tratamiento con 4 µg/mL de DNCB. Marcación Control de Isotipo conjugado a PE.



■ Tratamiento con 4 µg/mL de DNCB sin marcar.
 ■ Tratamiento con 4 µg/mL de DNCB. Marcación Control de Isotipo conjugado a FITC.

Figura 18. Superposición de la fluorescencia de las células tratadas con DNCB o con DMSO (control de disolvente) sin marcación y marcadas con los controles de isotipo.

5.3.2.2. Modelo predictivo y criterios de aceptación del ensayo hCLAT

Una predicción hCLAT es considerada positiva si por lo menos una de las dos condiciones siguientes se observa en 2 de 2, o en 2 de 3 ensayos independientes. De lo contrario, la predicción hCLAT es considerada negativa.

- La RFI de CD86 es igual o mayor a 150% para cualquiera de las concentraciones ensayadas.
- La RFI de CD54 es igual o mayor a 200% para cualquiera de las concentraciones ensayadas.

Los valores de RFI fueron calculados mediante la aplicación de la ecuación indicada a continuación, la cual establece la relación entre la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células tratadas con el reactivo y a las tratadas con el control de disolvente, habiendo restado previamente a estas MFI los valores de MFI del control de isotipo.

$$RFI = \frac{MFI \text{ células tratadas} - MFI \text{ control de isotipo tratadas}}{MFI \text{ control} - MFI \text{ control de isotipo control}} \times 100$$

Donde:

- *MFI células tratadas* corresponde a la MFI de las células tratadas con el compuesto.
- *MFI control de isotipo tratadas* corresponde a la MFI del control de isotipo de las células tratadas con el compuesto.
- *MFI control* corresponde a la MFI de las células incubadas con el control de medio o disolvente.

- *MFI control de isotipo control* corresponde a la MFI de las células del control de isotipo incubadas con el control de medio o disolvente.

Según la guía OECD 442E (TG 442E), si los dos primeros ensayos resultan positivos para CD86 y/o CD54, entonces la predicción hCLAT es considerada positiva y no es necesario realizar un tercer ensayo. De forma similar, si los dos primeros ensayos resultan negativos para CD86 y/o CD54, la predicción hCLAT es considerada negativa, sin la necesidad de realizar un tercer ensayo. Sin embargo, si el primer ensayo resulta positivo para un marcador y el segundo ensayo resulta positivo para el otro, un tercer ensayo es requerido. Si el resultado de este tercer ensayo resulta negativo para ambos marcadores, la predicción hCLAT será considerada como negativa. De otro modo, si el tercer ensayo resulta positivo para cualquiera de los dos marcadores o para ambos, entonces la predicción hCLAT deberá ser tomada como positiva (Figura 19).

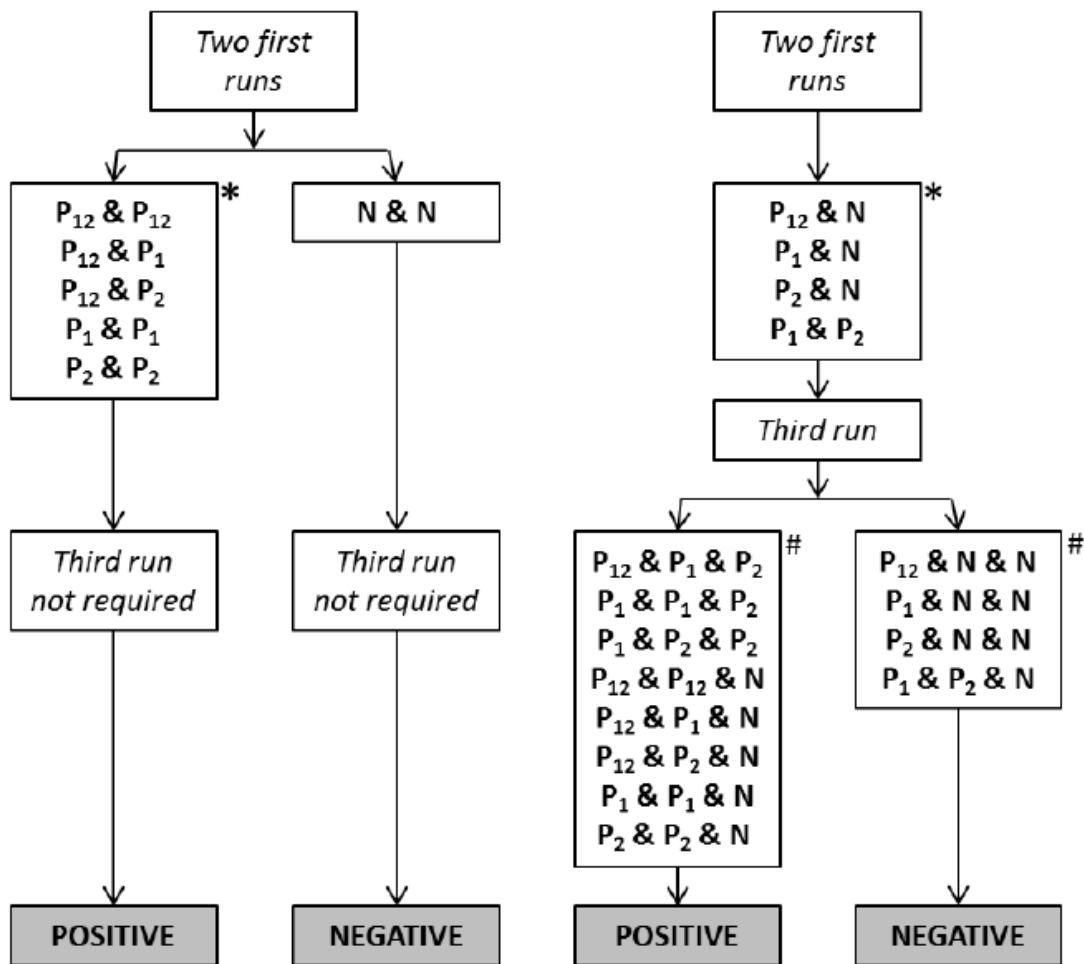


Figura 19. Modelo predictivo utilizado en el método hCLAT. P1: ensayo con un resultado positivo sólo para CD86. P2: ensayo con un resultado positivo sólo para CD54. P12: ensayo con resultados positivos tanto para CD54 como para CD86. N: ensayo sin resultados positivos para ninguno de los marcadores. *Diagramas en donde se muestran las combinaciones posibles de resultados generados a partir de los primeros dos ensayos independientes. #Diagramas donde se muestran las combinaciones posibles de resultados generados a partir de la realización de tres ensayos independientes en base a los resultados obtenidos para los dos primeros ensayos mostrados en los diagramas anteriores.

Según es requerido por la guía, deben cumplirse las siguientes condiciones para que los resultados del método hCLAT sean aceptados:

- La viabilidad de las muestras tratadas con las diferentes concentraciones del compuesto a ensayar, a partir de las cuales se miden los niveles de expresión de

CD54 y CD86, debe ser mayor al 50% en por lo menos cuatro de las concentraciones analizadas en cada ensayo independiente.

- Las viabilidades celulares de los controles de medio y de vehículo deben superar el 90%.
- En los controles de vehículo (DMSO), los valores de RFI para ambos marcadores de superficie celular, CD54 y CD86, no deben exceder el criterio de positividad (deben ser menores a 150% para CD86 y menores a 200% para CD54). Los valores de RFI del control de vehículo fueron calculados utilizando la fórmula descrita en la sección 4.5.2.5., reemplazando “MFI de las células tratadas con el compuesto” por “MFI del control de vehículo/disolvente” y “MFI del control de vehículo/disolvente” por “MFI del control de medio”.
- Para los controles de medio y de vehículo/disolvente, la proporción de MFI CD86 o MFI CD54 con respecto al MFI del isotipo correspondiente debe ser mayor a 105%.
- En el control positivo (DNFB), los valores de RFI para ambos marcadores de superficie celular, CD54 y CD86, deben cumplir con el criterio de positividad y la viabilidad celular de este control debe ser mayor a 50%.
- Los resultados negativos son aceptables sólo para los compuestos que exhiben una viabilidad celular menor al 90% para la mayor concentración analizada, a menos que se esté trabajando con la máxima concentración en placa permitida por la guía OECD 442E (TG 442E), 5000 µg/mL (para reactivos disueltos en medio de cultivo RPMI-1640 completo) o 1000 µg/mL (para reactivos disueltos en DMSO). Entonces, de esta forma un resultado negativo puede ser aceptado, aunque la viabilidad celular se encuentre por encima del 90%.

5.3.2.3. Medición de los niveles de expresión de las moléculas de superficie celular CD54 y CD86 tras incubación de células con DNCB

La guía indica que la concentración CV75 hallada para cada reactivo analizado debe ser utilizada para determinar el rango de concentraciones del compuesto a ser empleado para evaluar el cambio en los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86. Dado que para el caso del DNCB con 4 µg/mL se obtuvo una viabilidad del 73.1 en los ensayos para la medición de los niveles de expresión de CD54 y CD86, se utilizó un rango de concentraciones de 1,67 - 6 µg/mL. Dentro de este rango de concentraciones se encuentra el valor de concentración de DNCB sugerido por la guía para ser utilizado como control positivo de los experimentos (4 µg/mL).

Las Tablas 6 y 7 resumen los resultados encontrados para el DNCB en dos ensayos independientes.

En cuanto a los criterios de aceptación que los ensayos deben cumplir, en los dos ensayos realizados (Tablas 6 y 7), para los controles de medio y de vehículo/disolvente, la proporción de MFI CD86 o MFI CD54 con respecto al MFI del isotipo correspondiente fue mayor a 105%. En los controles de vehículo (DMSO), los valores de RFI para ambos marcadores de superficie celular, CD54 y CD86, no excedieron el criterio de positividad. Para el rango de concentraciones de DNCB ensayadas, las viabilidades celulares siempre mostraron valores superiores al 50% y mayores al 90% para los controles de medio y disolvente (DMSO).

Se esperaba que, para los dos ensayos realizados con este compuesto, el cálculo de la RFI de ambos marcadores de superficie celular superara el criterio de positividad descrito en la sección 5.3.2.2., siendo mayores a 150% para CD86 y mayores a 200% para CD54 Tabla A2.1. Efectivamente, en los dos ensayos se observó que el DNCB resultó positivo tanto para CD54 como para CD86 en alguna de las concentraciones probadas.

Además, se observa en la Tabla 7, que para la concentración de DNCB 4,2 µg/mL, la cual es muy similar a la propuesta por la guía como control positivo de sensibilización (4 µg/mL), el criterio de positividad no es superado al mirar el marcador CD54. Observando que los valores de viabilidad celular generados por esta concentración de DNCB es alta, podría ser conveniente aumentar la concentración de DNCB utilizada en los controles positivos del método hCLAT.

Tabla 6. Resultados del primer ensayo de medición de los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86 para células THP-1 incubadas con diferentes concentraciones del reactivo DNCB. MFI: Intensidad de Fluorescencia Media. **MFI Corregida:** Intensidad de Fluorescencia Media del marcador menos la Intensidad de Fluorescencia media del control de isotipo correspondiente. **RFI:** Intensidad de Fluorescencia Relativa. En rojo se encuentran señalados los valores de RFI que superan el criterio de positividad.

Muestra	Concentración (µg/mL)	MFI (Media geométrica)				MFI corregida				RFI (CD86)		RFI (CD54)		Viabilidad (%)	
		CD86	CD54	Isotipo PE	Isotipo FITC	CD86	CD54	vs control de medio de DMSO	vs control de medio de DMSO	vs control de medio de DMSO	vs control de medio de DMSO	vs control de medio de DMSO	vs control de medio de DMSO		
Control medio RPMI-1640 completo	0,0	561,5	2878,0	523,5	1905,0	38,0	973,0	100,0	100,0	67,9	107,3	100,0	167,8	151,1	97,6
DMSO	0,2 %	557,0	2436,0	501,0	1856,0	56,0	580,0	147,4	100,0	100,0	111,2	59,6	100,0	131,3	97,4
	6,0	779,5	4711,5	562,5	2251,5	217,0	2460,0			387,5			424,14		68,7
	5,0	788,0	7503,0	545,5	2048,0	242,5	5455,0			433,0			940,5		74,2
	4,2	834,0	6316,0	585,0	2129,5	249,0	4186,5			444,6			721,8		75,1
	3,5	706,5	5402,0	569,0	2069,0	137,5	3333,0			245,5			574,7		83,4
DNCB	2,9	670,5	4256,0	556,0	2103,0	114,5	2153,0			204,5			371,2		84,2
	2,4	552,0	2725,0	467,0	1892,0	85,0	833,0			151,8			143,6		95,5
	2,0	579,5	3311,5	479,5	1877,0	100,0	1434,5			178,6			247,3		93,5
	1,7	557,5	2981,5	479,5	1878,0	78,0	1103,5			139,3			190,3		95,1

Tabla 7. Resultados del segundo ensayo de medición de los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86 para células THP-1 incubadas con diferentes concentraciones del reactivo DNCB. MFI: Intensidad de Fluorescencia Media. **MFI Corregida:** Intensidad de Fluorescencia Media del marcador menos la Intensidad de Fluorescencia media del control de isotipo correspondiente. **RFI:** Intensidad de Fluorescencia Relativa. En rojo se encuentran señalados los valores de RFI que superan el criterio de positividad.

Muestra	Concentración (µg/mL)	MFI (Media geométrica)						MFI corregida			RFI (CD86)		RFI (CD54)		Viabilidad (%)
		CD86	CD54	Isotipo PE	Isotipo FITC	CD86	CD54	vs control de medio	vs control de DMSO	MFI CD86/MFI Isotipo PE	vs control de medio	vs control de DMSO	Control	Control	
Control medio RPMI-1640 completo	0,0	728,0	6723,5	548,0	1993,0	180,0	4730,5	100,0	90,0	132,8	100,0	82,0	337,4	96,3	
DMSO	0,2 %	701,0	7622,5	501,0	1853,5	200,0	5769,0	111,1	100,0	139,9	122,0	100,0	411,2	97,0	
DNCB	6,0	805,5	7859,5	572,0	2099,0	233,5	5760,5	116,8	116,8	116,8	99,85	99,85	337,4	77,7	
	5,0	895,0	14809,0	558,0	2257,5	337,0	12551,5	168,5	168,5	168,5	217,6	217,6	337,4	82,8	
	4,2	962,0	12509,5	548,0	2387,0	414,0	10122,5	207,0	207,0	207,0	175,5	175,5	337,4	85,0	
	3,5	912,0	13412,5	544,0	2326,0	368,0	11086,5	184,0	184,0	184,0	192,2	192,2	337,4	88,4	
	2,9	784,5	8642,0	500,5	2025,5	284,0	6616,5	142,0	142,0	142,0	114,7	114,7	337,4	92,7	
	2,4	751,0	7443,0	502,0	1998,0	249,0	5445,0	124,5	124,5	124,5	94,4	94,4	337,4	94,2	
	2,0	719,5	7318,5	500,5	1994,5	219,0	5324,0	109,5	109,5	109,5	92,3	92,3	337,4	94,9	
1,7	717,0	6993,5	474,0	1960,5	243,0	5033,0	121,5	121,5	121,5	87,2	87,2	337,4	96,1		

5.3.2.4. Medición de los niveles de expresión de las moléculas de superficie celular CD54 y CD86 tras incubación de células con Ácido Láctico

Para la medición de los niveles de expresión de los marcadores de superficie celular CD54 y CD86 de las células THP-1 tras la exposición de las mismas al ácido láctico, en primer lugar, se ensayó un rango de concentraciones de 837,2 - 3000 µg/mL. Posteriormente, se realizaron otros dos ensayos donde se aumentó la concentración máxima en placa de ácido láctico analizando 3600 µg/mL, de forma tal de asegurar que se estaban evaluando las máximas concentraciones subtóxicas posibles.

En cuanto a los criterios de aceptación para los ensayos, en los controles de medio y de vehículo/disolvente, la proporción de MFI CD86 o MFI CD54 con respecto al MFI del isotipo correspondiente fue siempre mayor a 105% para los tres ensayos. Sin embargo, en el segundo ensayo (Tabla 9), el control positivo de sensibilización (DNCB) no superó el criterio de positividad para el marcador CD54. Esto indica que este ensayo no puede tomarse como válido. Los valores de viabilidad celular para los controles de medio y disolvente (DMSO) siempre fueron mayores al 90%.

Se esperaba que, para por lo menos dos ensayos realizados con este compuesto, el cálculo de la RFI de ambos marcadores de superficie celular no superara el criterio de positividad descrito en la sección 5.3.2.2., siendo menores a 150% para CD86 y menores a 200% para CD54 (Tabla A2.1). En el primer ensayo realizado (Tabla 8), para la concentración 2500 µg/mL de ácido láctico, el valor de RFI obtenido para el marcador CD54 superó el criterio de positividad (mayor a 200%). Sin embargo, este resultado no se repitió en ninguno de los otros dos ensayos (Tablas 9 y 10). En el último ensayo (Tabla 10), la concentración 2083 µg/mL de ácido láctico generó un valor de viabilidad menor al 90% y resultados negativos

para el RFI de ambos marcadores, por lo que el resultado de este ensayo independiente puede considerarse negativo para la predicción de sensibilización dérmica.

Finalmente, para el rango de concentraciones de ácido láctico ensayadas, la variabilidad en los valores de viabilidad celular observada en los ensayos de medición de citotoxicidad parece continuar.

Con los resultados obtenidos, no pudo determinarse al compuesto ácido láctico como una sustancia potencialmente no sensibilizadora ya que uno de los ensayos independientes resultó positivo para un marcador, en otro, no se obtuvo el resultado esperado para el control positivo y el último resultó negativo para ambos marcadores.

Se deberá repetir este ensayo para poder realizar conclusiones sobre el potencial de sensibilización del ácido láctico. Podrían realizarse ensayos de medición de citotoxicidad a partir de un formato de diluciones con una base menor a dos para hallar un valor de concentración de ácido láctico que genere un valor de viabilidad celular cercano al 75% y, a partir de aquí, continuar con la medición de los niveles de expresión de los marcadores de superficie.

Tabla 8. Resultados del primer ensayo de medición de los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86 para células THP-1 incubadas con diferentes concentraciones del reactivo Ácido Láctico. MFI: Intensidad de Fluorescencia Media. **MFI Corregida:** Intensidad de Fluorescencia Media del marcador menos la Intensidad de Fluorescencia media del control de isotipo correspondiente. **RFI:** Intensidad de Fluorescencia Relativa. En rojo se encuentran señalados los valores de RFI que superan el criterio de positividad. Los valores de viabilidad celular y de relaciones MFI marcador/MFI isotipo para los controles de medio y disolvente que no cumplen con los criterios de aceptación son señalados en azul. **ND:** valores no determinados debido a bajos valores de viabilidad celular.

Muestra	Concentración (µg/mL)	MFI (Media geométrica)				MFI corregida				RFI (CD86)		RFI (CD54)		Viabilidad (%)
		CD86	CD54	Isotipo PE	Isotipo FITC	CD86	CD54	vs control de medio	vs control de DMSO	MFI CD86/MFI Isotipo PE	MFI vs control de medio	vs control de DMSO	MFI CD86/MFI Isotipo PE	
Control medio RPMI-1640 completo	0	858,50	3751,50	733,50	2445,00	125,00	1307	100	108	117	100	59	153	98,1
DMSO	0,20%	796,00	4343,00	680,00	2112,00	116,00	2231	93	100	117	171	100	206	98,3
DNCB	4,0	1303,00	6823,00	720,00	2365,00	583,00	4458		503			200		89,1
	3000,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10,0
	2500,0	958,50	4950,00	898,00	2271,00	60,50	2679	48			205,1			89,3
	2083,3	964,00	4699,50	882,50	2277,50	81,50	2422	65			185,4			97,4
	1736,1	953,00	4565,50	873,50	2257,50	79,50	2308	64			176,7			97,8
	1446,8	831,00	4549,00	721,00	2052,50	110,00	2497	88			191,1			97,4
	1205,6	813,00	4517,00	662,00	2050,50	151,00	2467	121			188,8			98,1
	1004,7	818,50	4488,50	689,00	2104,50	129,50	2384	104			182,5			97,7
	837,2	796,50	4556,50	729,00	2072,00	67,50	2485	54			190,2			97,4

Ácido Láctico

Tabla 9. Resultados del segundo ensayo de medición de los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86 para células THP-1 incubadas con diferentes concentraciones del reactivo Ácido Láctico. MFI: Intensidad de Fluorescencia Media. **MFI Corregida:** Intensidad de Fluorescencia Media del marcador menos la Intensidad de Fluorescencia media del control de isotipo correspondiente. **RFI:** Intensidad de Fluorescencia Relativa. En rojo se encuentran señalados los valores de RFI que superan el criterio de positividad. Los valores de viabilidad celular y de relaciones MFI marcador/MFI isotipo para los controles de medio y disolvente que no cumplen con los criterios de aceptación son señalados en azul. **ND:** valores no determinados debido a bajos valores de viabilidad celular.

Muestra	Concentración (µg/mL)	MFI (Media geométrica)					MFI corregida			RFI (CD86)			RFI (CD54)			Viabilidad (%)
		CD86	CD54	Isotipo PE	Isotipo FITC	CD86	CD54	vs control de medio	vs control de DMSO	MFI CD86/MFI Isotipo PE	vs control de medio	vs control de DMSO	MFI CD86/MFI Isotipo PE	vs control de medio	vs control de DMSO	
Control medio RPMI-1640 completo	0,0	767,0	4213,5	683,0	2387,0	84,0	1826,5	100,0	81,2	112,3	100,0	123,8	176,5	92,9		
DMSO	0,2 %	735,0	3610,5	631,5	2134,5	103,5	1476,0	123,2	100,0	116,4	80,8	100,0	169,1	96,3		
DNCB	4,0	988,0	4713,5	699,0	2329,0	289,0	2384,5	279,2	161,6	92,4						
	3600,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22,0			
	3000,0	743,0	3302,0	685,0	2177,5	58,0	1124,5	69,1	61,6	93,1						
	2500,0	789,0	3278,5	769,5	2458,0	19,5	820,5	23,2	44,9	62,3						
	2083,3	741,5	3258,5	673,5	2230,5	68,0	1028,0	81,0	56,3	92,1						
	1736,1	784,5	3729,0	692,0	2213,0	92,5	1516,0	110,1	83,0	92,7						
	1446,8	734,0	3247,0	674,5	2135,0	59,5	1112,0	70,8	60,9	93,9						
	1205,6	720,0	3382,0	675,5	2069,5	44,5	1312,5	53,0	71,9	94,5						
	1004,7	612,0	3755,5	606,5	1840,0	5,5	1915,5	6,6	104,9	93,5						

Tabla 10. Resultados del tercer ensayo de medición de los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86 para células THP-1 incubadas con diferentes concentraciones del reactivo Ácido Láctico. MFI: Intensidad de Fluorescencia Media. **MFI Corregida:** Intensidad de Fluorescencia Media del marcador menos la Intensidad de Fluorescencia media del control de isotipo correspondiente. **RFI:** Intensidad de Fluorescencia Relativa. En rojo se encuentran señalados los valores de RFI que superan el criterio de positividad. Los valores de viabilidad celular y de relaciones MFI marcador/MFI isotipo para los controles de medio y disolvente que no cumplen con los criterios de aceptación son señalados en azul. **ND:** valores no determinados debido a bajos valores de viabilidad celular.

Muestra	Concentración (µg/mL)	MFI (Media geométrica)						MFI (CD86)			RFI (CD54)			Viabilidad (%)
		CD86	CD54	Isotipo PE	Isotipo FITC	CD86	CD54	MFI corregida	vs control de medio	vs control de DMSO	MFI CD86/MFI Isotipo PE	vs control de medio	vs control de DMSO	
Control medio RPMI-1640 completo	0,0	699,5	6307,5	509,5	1851,5	190,0	4456,0	100,0	108,0	137,3	100,0	61,7	340,7	96,9
DMSO	0,2 %	682,0	9107,0	506,0	1883,0	176,0	7224,0	92,6	100,0	134,8	162,1	100,0	483,6	96,1
DNCB	4,0	1407,0	17297,0	607,0	2039,0	800,0	15258,0	454,6	211,2	211,2	211,2	211,2	211,2	84,4
	3600,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,9
	3000,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	37,4
	2500,0	725,0	5028,5	457,0	2021,0	268,0	3007,5	141,1	100,0	141,1	67,5	340,7	49,5	
	2083,3	703,5	10510,0	541,0	2000,0	162,5	8510,0	85,5	100,0	85,5	191,0	340,7	86,6	
	1736,1	713,0	7470,5	506,0	1910,5	207,0	5560,0	109,0	100,0	109,0	124,8	340,7	93,0	
	1446,8	734,5	6047,0	508,5	1911,0	226,0	4136,0	119,0	100,0	119,0	92,8	340,7	93,7	
	1205,6	604,5	5380,0	521,5	1840,5	83,0	3539,5	43,7	100,0	43,7	79,4	340,7	93,8	
	1004,7	708,5	6490,0	535,5	1962,0	173,0	4528,0	91,1	100,0	91,1	101,6	340,7	94,0	

Ácido Láctico

5.3.3. Medición de la citotoxicidad: búsqueda de la concentración para otras sustancias analizadas

Paralelamente, se continuó avanzando en el análisis de otras sustancias de competencia propuestas por la guía para la implementación del ensayo hCLAT. En particular, se comenzó a realizar ensayos de citotoxicidad para la búsqueda de la concentración CV75 para el Sulfato de Níquel, Glicerol y el Isopropanol. Además, se evaluó la citotoxicidad de un herbicida de uso agrícola denominado PARAQUAT.

5.3.3.1 Búsqueda de la concentración CV75 para el Sulfato de Níquel (NiSO₄)

Se realizó una curva dosis respuesta para la búsqueda de la concentración CV75 del reactivo NiSO₄, donde la máxima concentración en placa fue 1000 µg/mL (Figura 20). El valor de la concentración CV75 para este reactivo fue calculada aplicando la ecuación que fue indicada en la sección 4.5.1.5., la cual incluye al primer valor de viabilidad celular por encima de 75% y el primer valor de viabilidad celular por debajo del 75%, y las respectivas concentraciones de NiSO₄ que los generan. El valor CV75 resultó ser 194,82 µg/mL. La Tabla A2.1 muestra que este valor se encuentra por encima del rango de concentraciones CV75 esperadas para este reactivo según lo indica la guía. Este ensayo podría ser repetido para observar si nuevos valores CV75 obtenidos concuerdan con el rango de concentraciones planteado por la guía. A partir de los resultados que se obtengan de la repetición de este ensayo, se analizarán los cambios en los niveles de expresión de las moléculas CD54 y CD86 de superficie tras incubación de las células THP-1 con concentraciones apropiadas de este reactivo. La guía menciona que este compuesto genera resultados positivos para sensibilización sobre el marcador CD86 y negativos sobre el marcador CD54 (Tabla A2.1).

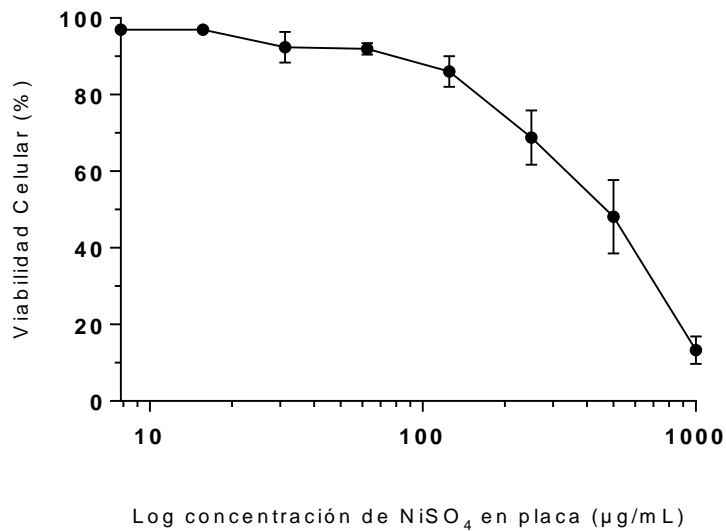


Figura 20. Curva dosis/respuesta obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad realizado con el reactivo NiSO₄ en un rango de concentraciones de 7,81 - 1000 µg/mL.

5.3.3.2. Búsqueda de la concentración CV75 para el Glicerol

El ensayo para la medición de la citotoxicidad y búsqueda de la concentración CV75 del glicerol fue realizado partiendo de una concentración máxima de glicerol en placa de 2500 µg/mL (Figura 21). En este ensayo, el compuesto no muestra ser citotóxico. La viabilidad celular resultó mayor a 75% para todas las concentraciones analizadas. Se debe repetir este ensayo evaluando una concentración máxima en placa de 5000 µg/mL para analizar si el compuesto es citotóxico a la máxima concentración de reactivo que la guía permite utilizar. De no serlo, para el análisis de los niveles de expresión de los marcadores de superficie CD54 y CD86, se usará la concentración 5000 µg/mL como máxima.

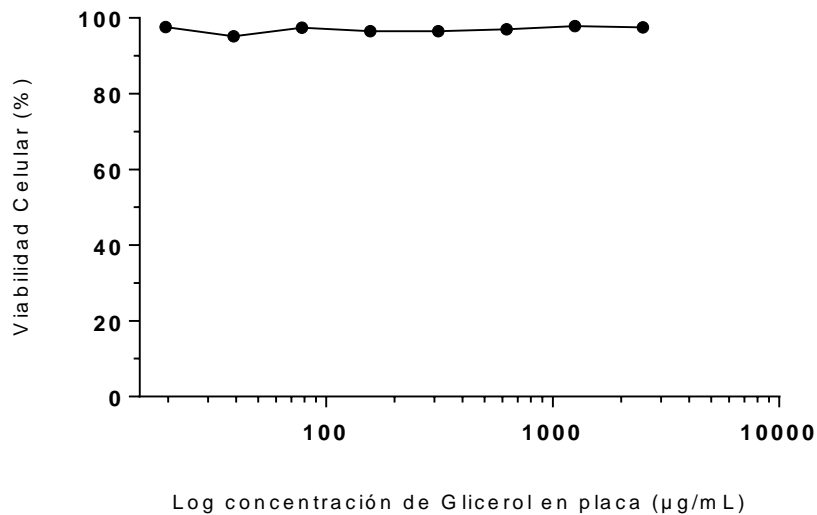


Figura 21. Curva dosis/respuesta obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad realizado con el reactivo glicerol en un rango de concentraciones de 19,55 - 2500 µg/mL.

5.3.3.3. Búsqueda de la concentración CV75 para el Isopropanol

En el caso del isopropanol, el ensayo para la búsqueda de la concentración CV75 fue llevado a cabo, en primer lugar, partiendo de una concentración máxima en placa de 1000 µg/mL (Figura 22 A), donde la viabilidad celular resultó mayor a 75% para todas las concentraciones analizadas y el compuesto no muestra ser citotóxico. Posteriormente, se realizó un segundo ensayo donde la concentración máxima de isopropanol en placa fue 2500 µg/mL (Figura 22 B). En este segundo ensayo, el compuesto tampoco demostró citotoxicidad. Se deberá repetir el ensayo evaluando una concentración máxima en placa de 5000 µg/mL para verificar la ausencia de citotoxicidad o comprobar lo contrario para poder establecer una concentración CV75. De no presentar citotoxicidad cuando sea evaluada la concentración 5000 µg/mL, para el análisis de los niveles de expresión de los marcadores de superficie CD54 y CD86, la misma se usará como concentración máxima.

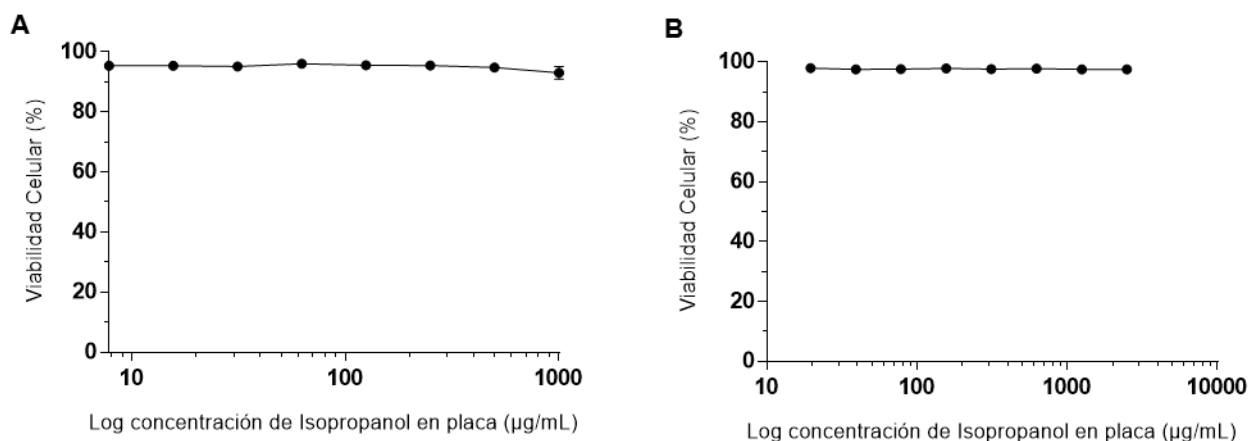


Figura 22. Curvas dosis/respuesta obtenidas a partir de los ensayos de citotoxicidad realizados con el reactivo isopropanol. A. El rango de concentraciones del reactivo utilizado fue de 15,625 - 2000 µg/mL. **B.** El rango de concentraciones del reactivo utilizado fue de 19,55 - 2500 µg/mL.

5.3.3.4. Búsqueda de la concentración CV75 para el PARAQUAT (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo)

Finalmente, se buscó determinar la concentración CV75 del herbicida PARAQUAT mediante un ensayo de dosis/respuesta, donde la concentración máxima del reactivo en placa fue de 500 µg/mL. En el caso de este reactivo, en vez de un formato de ocho diluciones en serie propuesto por la guía, se generaron siete (Figura 23). El cálculo de la concentración CV75 para este reactivo fue realizado como se indica en la sección 4.5.1.5. y resultó ser 135,76 µg/mL. Podría repetirse este mismo ensayo para verificar el valor de concentración CV75 obtenido antes de realizar el análisis del cambio en los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD54 y CD86.

Este reactivo ha sido previamente analizado para sensibilización cutánea mediante la prueba *in vivo* en cobayos (TG 406), donde se determinó al mismo como no sensibilizador (Nutrien Ag Solutions Argentina, 2016).

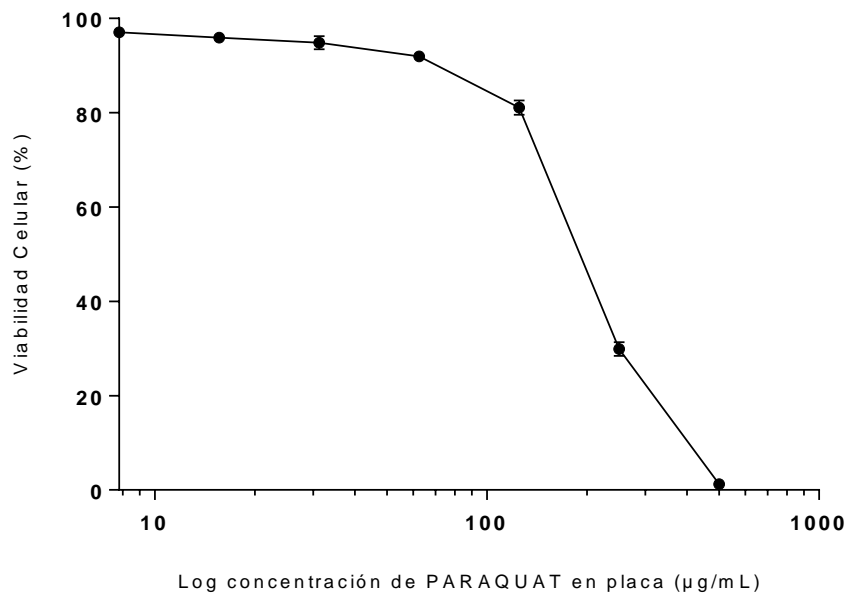


Figura 23. Curva dosis/respuesta obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad realizado con el reactivo PARAQUAT. El rango de concentración del reactivo en placa fue 7,81 - 500 µg/mL.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, en primer lugar, se caracterizó la línea celular THP-1 mediante la generación de una curva de crecimiento, a partir de la cual se estimó el tiempo de generación de la línea, el cual resultó ser de 20,39 horas. Además, fueron evaluados los cambios en las concentraciones de glucosa y lactato en función del tiempo transcurrido en un cultivo discontinuo y se estimó la tasa de incorporación de glucosa.

En segundo lugar, se inició la puesta a punto de un ensayo basado en PCR para la verificación de especie de líneas celulares, el cual puede utilizarse para la detección de contaminación cruzada entre líneas celulares de diferentes especies. Se determinaron las condiciones óptimas para los pares de cebadores involucrados en este ensayo y se comenzó a evaluar la especificidad de especie y la sensibilidad de detección de los mismos. Hasta el momento, se comprobó que los juegos de cebadores diseñados para la detección de la beta globina y la beta actina de rata, así como los diseñados para la detección de la beta globina de hámster, no detectan inespecíficamente ADN genómico de ratón.

Por último, se comenzó con la implementación del ensayo *in vitro* de Activación de Línea Celular Humana correspondiente a la guía OECD 442E, para la evaluación de la potencialidad de compuestos químicos de inducir una respuesta de hipersensibilidad tras el contacto de los mismos con la piel. Se evaluó la citotoxicidad de cinco de las diez sustancias de competencia recomendadas por esta guía para la implementación del ensayo, si bien es necesario expandir las concentraciones evaluadas para alguna de ellas. En cuanto a los cambios en los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD54 y CD86 para células THP-1 se evaluó el efecto de las sustancias de competencia DNCB y ácido láctico, las cuales son propuestas por la guía para ser usadas como controles positivo y negativo de

sensibilización dérmica, respectivamente. En el caso del ácido láctico es necesario realizar un nuevo ensayo que cumpla con todos los criterios de aceptación.

Aunque es necesario seguir trabajando en el ensayo hCLAT para lograr mejores resultados y continuar analizando las demás sustancias de competencia propuestas por la guía, este trabajo presenta una primera instancia de aproximación a la implementación del método hCLAT para la evaluación *in vitro* de la potencialidad de las sustancias de ser sensibilizadores cutáneos. Sumado a esto, es importante recalcar que esta aproximación experimental no es suficiente para la designación de un compuesto como sensibilizador o no sensibilizador cutáneo. Es necesario considerar el resultado de varios enfoques alternativos a la experimentación animal en un marco integrativo para llegar a realizar este tipo de conclusiones. Debido a esto, se ha planteado comenzar también con la implementación del método KeratinoSens y DPRA en el marco del Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal del Institut Pasteur de Montevideo.

En particular, comenzar a implementar este tipo de metodologías *in vitro*, las cuales se encuentran validadas a nivel mundial y se realizan siguiendo protocolos establecidos en las guías internacionales de la OECD, constituye un avance para Uruguay, donde todavía no existe experiencia en el establecimiento y utilización de este tipo de ensayos. Es vital que surjan iniciativas en nuestro país que busquen alinearse con la tendencia mundial que existe hacia el reemplazo de animales de experimentación para la realización de pruebas de toxicidad y bioseguridad con productos químicos potencialmente peligrosos para la salud humana y/o animal por ensayos alternativos a la experimentación animal.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ågren UM, Tammi RH, Tammi MI. Reactive Oxygen Species Contribute to Epidermal Hyaluronan Catabolism in Human Skin Organ Culture. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(7):996-1001.

Alejandro A, García-Bilbao A, Aristimuño C. Avances en la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos. *Rev toxicol.* 2014;31:130-139.

Antonopoulos C, Cumberbatch M, Dearman RJ, Daniel RJ, Kimber I, Groves RW. Functional Caspase-1 Is Required for Langerhans Cell Migration and Optimal Contact Sensitization in Mice. *J Immunol.* 2001;166(6):3672-3677.

Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, Aiba S. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol Vitro.* 2002;16(6):711-716.

Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, et al. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern Lab Anim.* 2010;38(4):275-284..

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current Protocols in Molecular Biology: Preface.* *Curr Protoc Mol Biol.* 2010.

Balls M. Alternatives to Animal Experiments: Time to Focus on Replacement. *Altern to Anim Test Exp.* 2007;12(2):145-154.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-771.

Bowdish, D. Maintenance & Culture of THP-1 cells. 2011. In *Pract. Bowdish Lab.*

Butler M. Cell Counting and Viability Measurements. In: Animal Cell Biotechnology. New Jersey: Humana Press; 1999;131-144.

Clouet E, Kerdine-Römer S, Ferret P-J. Comparison and validation of an in vitro skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references. Toxicol In Vitro. 2017;45(3):374-385.

Comisión Europea. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo relativa a la prohibición de la experimentación con animales y de comercialización y la situación en que se encuentran los Métodos Alternativos en el ámbito de los cosméticos. 2013. Accedido (Julio 2018) desde <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013DC0135&from=EN>

Comrie WA, Li S, Boyle S, Burkhardt JK. The dendritic cell cytoskeleton promotes T cell adhesion and activation by constraining ICAM-1 mobility. J Cell Biol. 2015.

Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. Trends Pharmacol Sci. 2007;28(9):465-472.

Doyle HA, Mamula MJ. Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease. Curr Opin Immunol. 2012;24(1):112-118.

EC EURL-ECVAM. Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report. 2012 A. Accedido (Julio 2018) desde http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvamrecommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

EC EURL ECVAM. Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. 2012 B. Accedido (Julio 2018) desde <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>

EC EURL-ECVAM. Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. 2013 A. Accedido (Julio 2018) desde http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurlecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assaydpra

EC EURL-ECVAM. Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. 2013 B. Accedido (Julio 2018) desde <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>

EC EURL-ECVAM. 2014. Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin Sensitisation testing. 2014. Accedido (Julio 2018) desde http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvamrecommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation

EC EURL ECVAM. 2015. Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). 2015. Accedido (Julio 2018) desde <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>

Emter R, Ellis G, Natsch A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;245(3):281-290.

Esser PR, Wölfle U, Dürr C, et al. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One.* 2012;7(7):e41340.

Fabian E, Vogel D, Blatz V, et al. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol.* 2013;87(9):1683-1696.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol.* 1997;159(3):1451-1458.

Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* 2006;176(7):3877-3883.

Gęgotek A, Skrzydlewska E. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch Dermatol Res.* 2015;307(5):385-396.

Hassell T, Gleave S, Butler M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol.* 1991;30(1):29-41.

Heise R, Skazik C, Rodriguez F, et al. Active Transport of Contact Allergens and Steroid Hormones in Epidermal Keratinocytes is Mediated by Multidrug Resistance Related Proteins. *J Invest Dermatol.* 2010;130(1):305-308.

Hu WS, Dodge TC, Frame KK, Himes VB. Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Dev Biol Stand.* 1987;66:279-290.

Hulspas R, O'Gorman MRG, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytom Part B Clin Cytom.* 2009;76B(6):355-364.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76-86.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89-116.

Kim H-J, Barajas B, Wang M, Nel AE. Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of TH1 immunity: Role of dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(5):1255-1261.

Krasteva M, Peguet-Navarro J, Moulon C, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro primary sensitization of hapten-specific T cells by cultured human epidermal Langerhans cells-a screening predictive assay for contact sensitizers. *Clin Exp Allergy.* 1996;26(5):563-570.

Lao MS, Toth D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Prog.* 1997;13(5):688-691.

Lilienblum W, Dekant W, Foth H, et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Arch Toxicol.* 2008;82(4):211-236.

Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002;23(9):445-449.

Maecker HT, Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A.* 2006;69(9):1037-1042.

Mark BJ, Slavin RG. Allergic contact dermatitis. *Med Clin North Am.* 2006;90(1):169-185.

Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: The silent and neglected danger. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 1998;34(1):1-8.

Martin SF, Esser PR, Weber FC, et al. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy.* 2011;66(9):1152-1163.

Martin SF. Allergic contact dermatitis: xenoinflammation of the skin. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(6):720-729.

Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, et al. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 2008;205(9):2151-2162.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):229-265.

Mather, J.P., y Roberts PE. *Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique.* 1998:71-75.

Matsue H, Edelbaum D, Shalhevet D, et al. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J Immunol.* 2003;171(6):3010-3018.

Mizun, M., Yoshida, M., Kodama, T., Kosaka, N., Okamoto, K., Sono, S., Yamada, T., Hasegawa, S., Ashikaga, T., Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y OY. Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese interlaboratory study. *AATEX.* 2008;13(70-82).

Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene.* 2002;294(1-2):1-12.

Moulon C, Péguet-Navarro J, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro primary sensitization and restimulation of hapten-specific T cells by fresh and cultured human epidermal Langerhans' cells. *Immunology.* 1993;80(3):373-379.

Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology*, 7th Edition. 2014.

Natsch A. The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers—Functional Relevance and a Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicol Sci.* 2010;113(2):284-292.

Natsch A, Emter R. Skin Sensitizers Induce Antioxidant Response Element Dependent Genes: Application to the In Vitro Testing of the Sensitization Potential of Chemicals. *Toxicol Sci.* 2008;102(1):110-119.

Nelson-Rees WA, Daniels DW, Flandermeyer RR. Cross-contamination of cells in culture. *Science.* 1981;212(4493):446-452.

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:233-260.

Novak N, Baurecht H, Schäfer T, et al. Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene and Allergic Contact Sensitization to Nickel. *J Invest Dermatol.* 2008;128(6):1430-1435.

Nutrien Ag Solutions Argentina. 2016. Accedido (Diciembre 2018) desde <https://asp-la.com/wp-content/uploads/2018/01/FDS-KEMAZ%C3%93N.pdf>

OECD. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. 2012. OECD Environment, Health and Safety Publications.

OECD. Test N°. 406: Skin Sensitisation. 1992. Guideline for Testing of Chemicals N°. 406.

OECD. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. 2005. OECD Series on Testing and Assessment.

OECD. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay 429. 2010. OECD Guideline for the Testing of Chemicals N°. 429.

OECD. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. 2010. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals N°. 442B.

OECD. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. 2010. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A.

OECD. Test N°. 442C: In Chemico Skin Sensitisation. 2015a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals N°. 442C.

OECD. Test N°. 442D: In Vitro Skin Sensitisation. 2015b. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals N°. 442D.

OECD. Test N°. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). 2018a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals N°. 442E.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 2018b. Accedido (Julio 2018) desde <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>

Ozturk SS, Thrift JC, Blackie JD, Naveh D. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnol Bioeng.* 1997;53(4):372-378.

Peiser M, Tralau T, Heidler J, et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(5):763-781.

Powell JD, Horton MR. Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res.* 2005;31(3):207-218.

Russell W, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique. 1959.

Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular Mechanisms of Nickel Allergy. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):202.

Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 2006;177(2):1272-1281.

Schmidt M, Raghavan B, Müller V, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol.* 2010;11(9):814-819.

Shornick LP. Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Exp Med.* 1996;183(4):1427-1436.

Skazik C, Heise R, Ott H, et al. Active transport of contact allergens in human monocyte-derived dendritic cells is mediated by multidrug resistance related proteins. *Arch Biochem Biophys.* 2011;508(2):212-216.

Stacey GN. Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action now. *Nature.* 2000;403(6768):356.

Steube KG, Meyer C, Uphoff CC, Drexler HG. A simple method using beta-globin polymerase chain reaction for the species identification of animal cell lines--a progress report. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003;39(10):468-475.

Steube KG, Koelz A-L, Drexler HG. Identification and verification of rodent cell lines by polymerase chain reaction. *Cytotechnology.* 2008;56(1):49-56.

Stewart NT, Byrne KM, Hosick HL, Vierck JL, Dodson M V. Traditional and emerging methods for analyzing cell activity in cell culture. *Methods Cell Sci.* 1999;22(1):67-78.

Surprenant A, North RA. Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu Rev Physiol.* 2009;71(1):333-359.

Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity.* 2006;24(3):317-327.

Takahashi T, Kimura Y, Saito R, et al. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci.* 2011;124(2):359-369.

Tice RR, Austin CP, Kavlock RJ, Bucher JR. Improving the human hazard characterization of chemicals: a Tox21 update. *Environ Health Perspect.* 2013;121(7):756-765.

Tsao Y-S, Cardoso AG, Condon RGG, et al. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *J Biotechnol.* 2005;118(3):316-327.

United Nations. 2015. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Accedido (Diciembre 2018) desde https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf

Wagner R. Metabolic Control of Animal Cell Culture Processes. In: *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production.* Berlin, New York: DE GRUYTER; 1997:193-232.

Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, et al. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2007;127(8):1956-1963.

Wei L, Zhou Y, Yao J, et al. Lactate promotes PGE2 synthesis and gluconeogenesis in monocytes to benefit the growth of inflammation-associated colorectal tumor. *Oncotarget*. 2015;6(18):16198-16214.

Worth AP, Patlewicz G. Integrated Approaches to Testing and Assessment. *Adv Exp Med Biol*. 2016;856:317-342.

Yoshida Y, Sakaguchi H, Ito Y, Okuda M, Suzuki H. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol In Vitro*. 2003;17(2):221-228.

ANEXO

A0: Composición de medios de cultivo, buffers y soluciones

A0.1. Medio de cultivo RPMI-1640 completo (THP-1).

- Medio base RPMI-1640 (GIBCO, #61870-036).
- 10% Suero fetal bovino no inactivado (Capricorn Scientific, #FBS-11A).
- 10 mM Buffer HEPES (Sigma Aldrich, # 15630106).
- 1mM Piruvato de Sodio (GIBCO, # 11360070).
- 0,05 mM 2-Mercaptoetanol (Sigma Aldrich, #M7522).

A0.2. Medio de cultivo DMEM completo

- Medio base DMEM (GIBCO, #10566016)
- 10% Suero fetal bovino no inactivado (Capricorn Scientific, #FBS-11A).

A0.3. Solución de Congelado

- 10% DMSO (Sigma Aldrich, D5879).
- 40% Medio RPMI-1640 completo.
- 50% Suero fetal bovino no inactivado (Capricorn Scientific, #FBS-11A).

A0.4. Buffer TAE (0,5 X).

- 20 mM Tris base.
- 10 mM Ácido acético glacial.
- 0,5 mM EDTA.

A0.5. Buffer de tinción

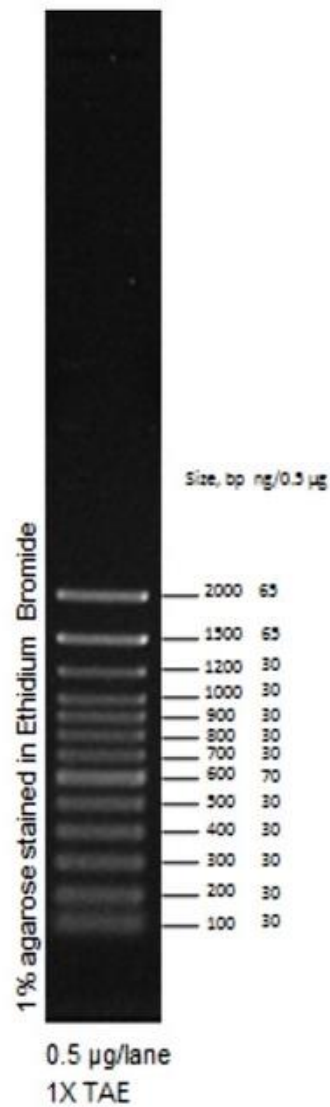
PBS 1X – BSA (Seroalbúmina bovina) 0,1%.

A0.6. Solución de bloqueo

PBS 1X – BSA 2%.

A1: Marcador de peso molecular

Para los ensayos de electroforesis en geles de agarosa (1,2%) se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder #15628-019, Invitrogen.



A2: Tablas

Tabla A2.1. Sustancias de competencia recomendadas por la guía OECD 442E (TG 442E) ensayadas.

Sustancia de competencia	CASRN	Estado físico	Solubilidad	Predicción <i>In vivo</i>	CV75 rango de referencia en µg/mL	Resultado hCLAT para CD86	EC150 rango de referencia en µg/mL	Resultado hCLAT para CD54	EC200 rango de referencia en µg/mL
2,4-Dinitroclorobenceno	97-00-7	Sólido	DMSO	Sensibilizador (extremo)	2-12	Positivo	0,5 - 10	Positivo	0,5-15
Sulfato de Níquel	106-50-3	Sólido	Agua	Sensibilizador (fuerte)	5-95	Positivo	<40	Negativo	>1,5
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Agua	No sensibilizador	>5000	Negativo	>5000	Negativo	>5000
Glicerol	56-81-5	Líquido	Agua	No sensibilizador	>5000	Negativo	>5000	Negativo	>5000
Ácido Láctico	50-21-5	Líquido	Agua	No sensibilizador	1500-5000	Negativo	>5000	Negativo	>5000

Tabla A2.2. Resultados del ensayo de medición de la citotoxicidad para el compuesto DNCB.

Dilución	Concentración de DNCB en placa (µg/mL)	Viabilidad Celular (%)		Promedio de Viabilidad Celular (%)	Desvío estándar (%)
		Réplica A	Réplica B		
1	1000	1,9	1,4	1,65	0,35
2	500	3,3	1,2	2,25	1,48
3	250	1,5	1,8	1,65	0,21
4	125	2	1,8	1,9	0,14
5	62,5	2,2	1,3	1,75	0,64
6	31,25	2,3	2,3	2,3	0,00
7	15,625	49,6	38,9	44,25	7,57
8	7,812	68,5	72,8	70,65	3,04
9	3,906	74,2	72	73,1	1,56
Control de disolvente (DMSO)	0	99,66	95,31	97,485	3,08