



virtual  
libre y gratuito  
requiere inscripción

CAPACITACIONES ICCAS

## SEMINARIO

### Ciencias Regulatorias: Métodos alternativos para productos formulados

DESDE EL MARTES 4 DE OCTUBRE  
HASTA EL JUEVES 20 DE OCTUBRE

Más información:  
[info@iccas.org.ar](mailto:info@iccas.org.ar)  
[www.iccas.org.ar](http://www.iccas.org.ar)

CON EL APOYO DE:





# **Metodologías alternativas para evaluación del potencial de Irritación/Corrosión Dermal**

**Rosana Murata**  
**Toxicóloga Regulatória LatAm - Bayer**  
**11 de Octubre, 2022**





# Agenda

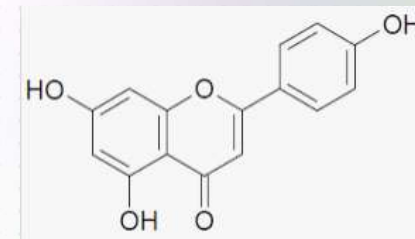
- Historia del enfoque por etapas
- Enfoque Integrado Sobre Pruebas y Evaluación
- Métodos alternativos Validados - Irritación/corrosión Dermal
- Método alternativo - Corrosión Dermal
- Método alternativo - Irritación Dermal
- Discusión
- Conclusión



# Historia del enfoque por etapas

Desde 2002, la guía OECD 404 de estudio in vivo recomendaba:

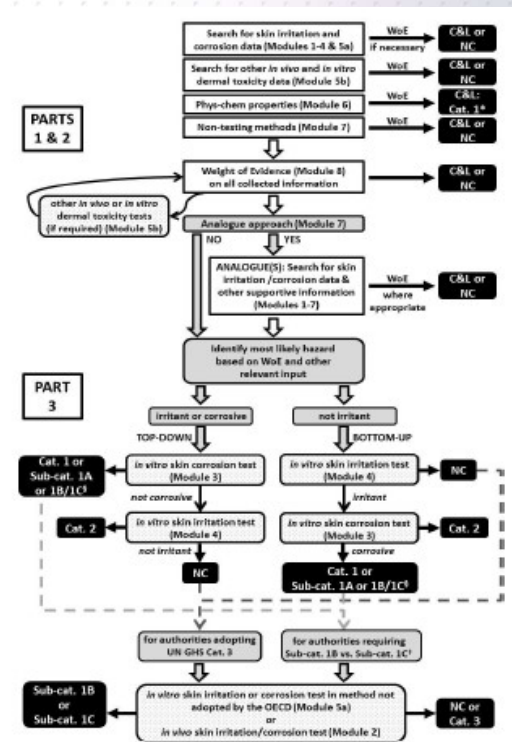
- 1) datos existentes sobre humanos y / o animales,
- 2) Relación estructura-actividad (SAR)
- 3) pH
- 4) toxicidad sistémica por vía dérmica,
- 5) el uso de pruebas in vitro o ex vivo validadas y aceptadas de corrosión cutánea,
- 6) el uso de pruebas in vitro o ex vivo validadas y aceptadas para irritación de la piel, y
- 7) el uso de una prueba confirmatoria en conejo in vivo de manera escalonada si un resultado negativo





# Estrategia IATA - Enfoque Integrado Sobre Pruebas y Evaluación

- Parte 1 - datos existentes:
  - Módulos 1 a 5: información existente y disponible se recupera de la literatura y las bases de datos y otras fuentes
  - Módulo 6 : las propiedades físico-químicas, principalmente el pH, son considerados.
  - Módulo 7 cubre los métodos que no son experimentales.
- Parte 2 - peso de la evidencia
- Parte 3 - La experimentación con estudios in vitro y con los animales como último recurso





# Comunicación de peligros (SGA)

**A1.19** Corrosión/irritación cutánea (véase el capítulo 3.2 para los criterios de clasificación)

Clasificación			Etiquetado				Código de indicación de peligro SGA
Clase de peligro SGA	Categoría de peligro SGA	Clase o división de la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas	Pictograma SGA	Pictograma de la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas	Palabra de advertencia SGA	Indicación de peligro SGA	
Corrosión/irritación cutánea	1, IA, IB, IC	8			<b>Peligro</b>	Provoca graves quemaduras en la piel y lesiones oculares	H314
	2	<i>No se aplica</i>		<i>No se aplica</i>	<b>Atención</b>	Provoca irritación cutánea	H315
	3		<i>Sin pictograma</i>		<b>Atención</b>	Provoca una leve irritación cutánea	H316

**Sin categoría** – es la clasificación usada para los productos que no provocan irritación dermal





# Métodos alternativos Validados

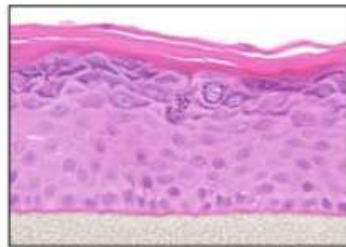


OECD	Indication	Title
430	Potential corrosion	Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)
431	Potential corrosion	Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method
435	Potential corrosion	In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
439	Potential irritation	Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method

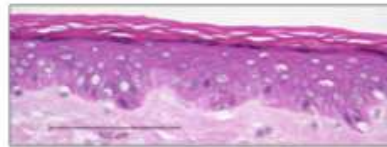


# Test in vitro - Corrosión Dermal (OECD 431) y Irritación Dermal (OECD 439)

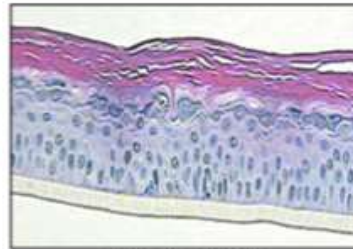
## *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Models Validated for Regulatory Purposes



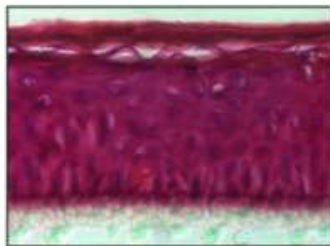
MatTek Corp. EpiDerm™ (EPI-200)



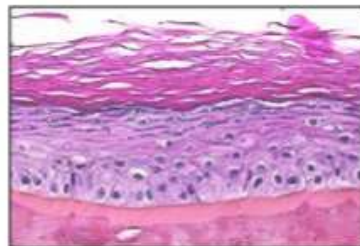
Native human skin



SkinEthic™ RHE



Cell Systems epiCS®



EpiSkin™ (SM)



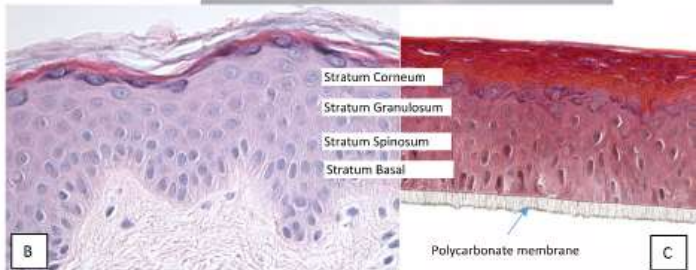
J-TEC LabCyte EPI-MODEL

- The EpiDerm™, epiCS®, LabCyte EPI-MODEL, EpiSkin™ y SkinEthic™
- Los modelos de tejido hechos de células epiteliales humanas, de cultivo celular.
- Las células se diferencian para formar una epidermis completa con un estrato córneo funcional.



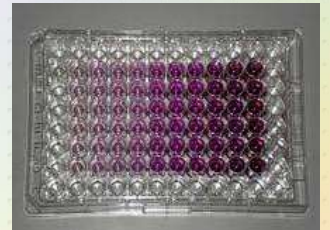
# Test in vitro - Corrosión Dermal (OECD 431) y Irritación Dermal (OECD 439)

- La viabilidad celular se mide por la conversión enzimática del MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en sal de formazán azul
- Formazán azul se mide cuantitativamente.
- Los productos químicos coloreados también se pueden evaluar mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- La reducción de MTT en tejidos tratados con material de prueba se expresa como un porcentaje en relación con los cultivos tratados con control negativo.
- Una ventaja de usar tejidos de Epidermis Reconstruida (RhE) es que los materiales de prueba se aplican tópicamente, con la concentración total de la formulación, sin dilución, de modo que la mayoría de los tipos de materiales de prueba se pueden aplicar a los cultivos de la misma manera que ocurre in vivo.





# Test in vitro - Corrosión Dermal (OECD 431) y Irritación Dermal (OECD 439)



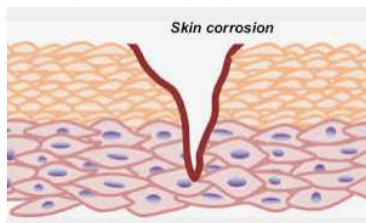
- Controles adicionales:
  - Reducción de MTT: Verificar si hay o no interacción del material de prueba con colorante vital  
Material de prueba + MTT son incubados por 3 horas a 37°C.
  - Evaluación de la tinción de tejidos: Verificar la capacidad del material de prueba en colorear los tejidos  
Material de prueba + tejido son incubados por 30 min en temperatura ambiente.





# Test in vitro de Corrosión Dermal (OECD 431)

- Modelo de epidermis humana reconstruida (RhE - Reconstructed Human Epidermis)
- Corrosión cutánea se define como la producción de daño irreversible en la piel, generalmente evidente como necrosis a través de la epidermis y en la dermis.
- La prueba de corrosión cutánea in vitro identifica productos químicos capaces de inducir corrosión cutánea (categoría 1 de SGA).
- Este método de prueba proporciona una medida de viabilidad celular en los tejidos de la epidermis humana reconstruida (RhE) después de un único tratamiento químico de aplicación tópica, en comparación con los tratados con control negativo.
- El principio de la prueba es que las sustancias corrosivas pueden infiltrarse en la célula y reducir la viabilidad celular en las capas de la piel hasta un cierto punto.





# Test in vitro - Corrosión Dermal (OECD 431)

	OECD 431
Aplicación y lavado (día 0)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Llenar los pocillos en una placa de ensayo con el medio de ensayo precalentado a 37°C (2 ml por pocillo).</li> <li>- Colocar las unidades de epidermis con el medio en contacto con la epidermis en cada pocillo preparado.</li> <li>- Aplicar 50 µL de la sustancia de prueba o control (negativo y positivo) a cada una de las dos unidades de piel.</li> <li>- Incubar durante 4 horas (± 10 min) a temperatura ambiente (22,6-22,9 ° C).</li> <li>- Enjuagar las dos unidades de piel para eliminar cualquier material restante.</li> </ul>
MTT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agrega solución de MTT (2 mL de 0.3 mg / mL) a cada pocillo debajo de las unidades de piel</li> <li>- Incubar a 37° C en una incubadora con 5% de CO2 durante 3 horas (± 5 minutos), protegida de la luz, en un &gt; 95% de atmósfera humidificada.</li> </ul>
Extracción de formazán	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cortar un disco de epidermis de cada unidad de piel</li> <li>- colocar en un tubo con 500 µl de isopropanol acidificado</li> <li>- Incubar durante la noche protegida de la luz con agitación suave (~ 150 rpm).</li> </ul>
Viabilidad celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- colocar 2 x 200 µL de muestra de cada tubo en los pocillos</li> <li>- Medir la DO (densidad óptica o absorbancia) de las muestras usando un lector de placas a 570 nm.</li> </ul>



# Test in vitro de Corrosión Dermal (OECD 431)

## Evaluación del resultado - EpiSkin

431

OECD/OCDE

Table 4. EpiSkin™ prediction model

Viability measured after exposure time points (t='3,' 60 and 240 minutes)	Prediction to consider
< 35% after 3 min exposure	<b>Corrosive:</b> Optional Sub-category 1A *
≥ 35% after 3 min exposure AND < 35% after 60 min exposure <b>OR</b> ≥ 35% after 60 min exposure AND < 35% after 240 min exposure	<b>Corrosive:</b> A combination of optional Sub-categories 1B-and-1C
≥ 35% after 240 min exposure	<b>Non-corrosive</b>

Classification	Packing group	Criteria for <i>In Vitro</i> interpretation
UN GHS / EU-CLP	Sub Category 1A	If corrosive after 3 min exposure
	Sub Category 1B	If not corrosive after 3 min exposure and corrosive after 1 hour exposure
	Sub Category 1C	If not corrosive after 1 hour exposure and corrosive after 4 hours exposure
	Non corrosive	If not corrosive after 4 hours exposure

\*) According to the data generated in view of assessing the usefulness of the RhE test methods for supporting sub-categorisation, it was shown that around 22 % of the Sub-category 1A results of the EpiSkin™ test method may actually constitute Sub-category 1B or Sub-category 1C substances/mixtures (i.e. over classifications) (see Annex 3).



# Test in vitro de Corrosión Dermal (OECD 431)

## Evaluación del resultado – EpiDerm, SkinEthic, EpiCS, Labcyte

OECD/OCDE 431 |

Table 5. EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 SCT

Viability measured after exposure time points (t=3 and 60 minutes)	Prediction to be considered
<b>STEP 1 for EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 SCT</b>	
< 50% after 3 min exposure	Corrosive
≥ 50% after 3 min exposure AND < 15% after 60 min exposure	Corrosive
≥ 50% after 3 min exposure AND ≥ 15% after 60 min exposure	Non-corrosive

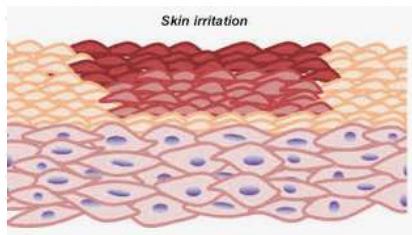
<b>STEP 2 for EpiDerm™ SCT - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1</b>	
< 25% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 25% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B-and-1C
<b>STEP 2 for SkinEthic™ RHE - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1</b>	
< 18% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 18% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B-and-1C
<b>STEP 2 for epiCS® - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1</b>	
< 15% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 15% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B-and-1C
<b>STEP 2 for LabCyte EPI-MODEL24 SCT - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1</b>	
< 15% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 15% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B-and-1C

\* According to the data generated in view of assessing the usefulness of the RHE test methods for supporting sub-categorisation, it was shown that around 29%, 31%, 33% and 30% of the Sub-category 1A results of the EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 SCT, respectively, may actually constitute Sub-category 1B or Sub-category 1C substances/mixtures (i.e. over-classifications) (see Annex 3).



# Test in vitro de Irritación Dermal (OECD 439)

- Modelo de epidermis humana reconstruida (RhE - Reconstructed Human Epidermis)
- Irritación cutánea se define producción de daño reversible a la piel después de una exposición química definida.
- La prueba de irritación cutánea identifica los productos químicos capaces de inducir una productos de categoría 1 y 2 de GHS), así como los que no requieren clasificación por su potencial de irritación cutánea.
- Este método de prueba proporciona una medida de viabilidad celular en los tejidos de la epidermis humana reconstruida (RhE) después de un único tratamiento químico de aplicación tópica, en comparación con los tratados con control negativo.





# Test in vitro - Irritación Dermal (OECD 439)

	OECD 439
Pre incubación (día -1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Llenar los pocillos en una placa de ensayo con el medio de ensayo precalentado a 37°C (2 ml por pocillo).</li> <li>- Colocar las unidades de epidermis con el medio en contacto con la epidermis en cada pocillo preparado y incubar durante la noche a 37 ° C en una incubadora con 5% de CO2, en una atmósfera humidificada &gt; 95%.</li> </ul>
Aplicación y lavado (día 0)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aplicar 20 µL de la sustancia de prueba o control (negativo y positivo) a cada una de las dos unidades de piel.</li> <li>- Incubar durante 15 minutos (± 0,5 min) a temperatura ambiente (25,3-25,9 ° C).</li> <li>- Enjuagar las dos unidades de piel para eliminar cualquier material restante.</li> </ul>
Incubación	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colocar en los pocillos de la placa medio de mantenimiento precalentado nuevo (2 mL/pocillo)</li> <li>- Incubar durante 42 horas (± 1 h) a 37 ° C en una incubadora con 5% de CO2, en un &gt; 95% atmósfera humidificada</li> </ul>
MTT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agrega solución de MTT (2 mL de 0.3 mg / mL) a cada pocillo debajo de las unidades de piel</li> <li>- Incubar a 37° C en una incubadora con 5% de CO2 durante 3 horas (± 5 minutos), protegida de la luz, en un &gt; 95% de atmósfera humidificada.</li> </ul>
Extracción de formazán	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cortar un disco de epidermis de cada unidad de piel</li> <li>- colocar en un tubo con 500 µl de isopropanol acidificado</li> <li>- Incubar durante dos horas, protegida de la luz con agitación suave (~ 150 rpm).</li> </ul>
Viabilidad celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- colocar 2 x 200 µL de muestra de cada tubo en los pocillos</li> <li>- Medir la DO (densidad óptica o absorbancia) de las muestras usando un lector de placas a 570 nm.</li> </ul>



# Test in vitro - Irritación Dermal (OECD 439)

## Evaluación del resultado

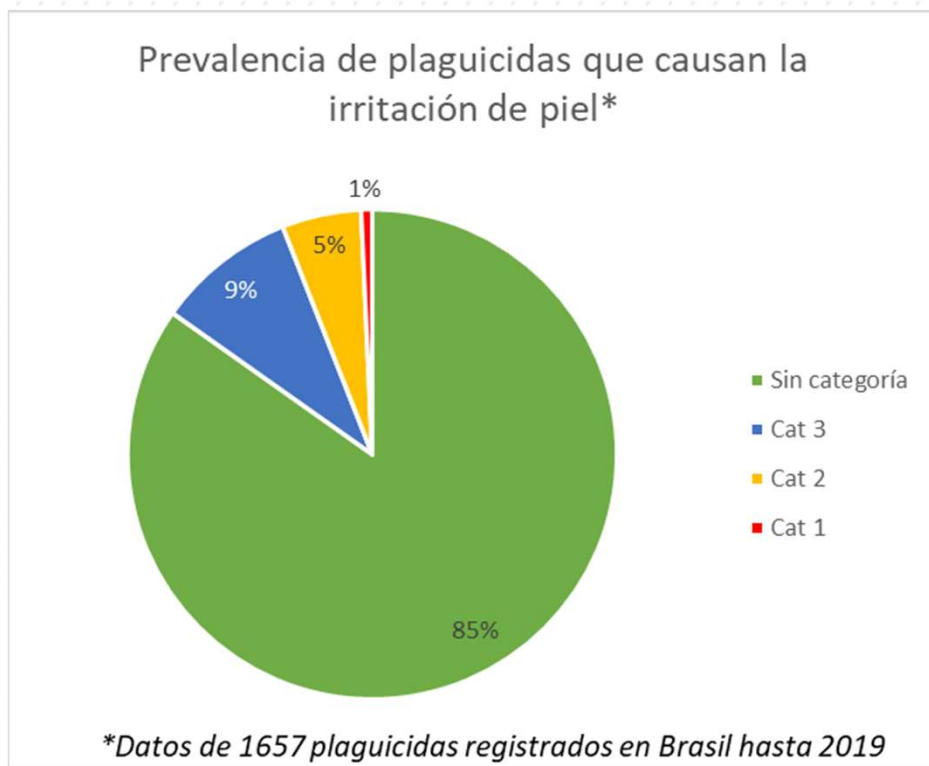
Criteria for <i>In Vitro</i> interpretation	Classification
	UN GHS/ CLP
Mean tissue viability % is $\leq 50$ %	Category 2 or Category 1
Mean tissue viability % is $> 50$ %	Non-Irritant*

\*Note: If there is clear evidence that the test item is not corrosive, then it can be determined as No Category according to the UN GHS. It is plausible that some weaker corrosives could be classified as non-irritant in this *in vitro* assay.

- Si la viabilidad relativa media de tres tejidos individuales después de 15 minutos de exposición y 42 horas de la incubación es  $\leq 50\%$  de la viabilidad media de los controles negativos = Categoría 2 o Categoría 1
- En caso de que se determine que el elemento de prueba no es corrosivo y muestra que la viabilidad del tejido después de la exposición y la incubación posterior al tratamiento es  $\leq 50\%$ , se considera irritante para la piel = Categoría 2
- Si la viabilidad relativa media de tres tejidos individuales después de 15 minutos de exposición y 42 horas de incubación es  $> 50\%$  de la viabilidad media de los controles negativos = Sin Categoría



# Plaguicidas - consideraciones generales



- La mayoría de los plaguicidas se clasifica como **Sin categoría (SGA)**

**Sin categoría:** no provoca irritación dermal; **Categoría 3:** provoca leve irritación dermal; **Categoría 2:** provoca irritación dermal; **Categoría 1:** provoca lesiones dermales graves



# Discusión – aceptación de los resultados

**Table 4**  
Predictive capacity of the in vitro skin corrosion test (OECD TG 431) to predict in vivo skin corrosion (OECD TG 404) of agrochemical formulations.

	Data subset	UN GHS
Sensitivity	All	n/a
	Liquids	n/a
	Solids	n/a
Specificity	All	95% (77/81)
	Liquids	95% (70/74)
	Solids	100% (7/7)
Accuracy	All	95% (77/81)
	Liquids	95% (70/74)
	Solids	100% (7/7)

Corrosión  
81 pares de estudios  
95% especificidad  
95% precisión

Los métodos de ensayos alternativos validados son confiables para identificar los plaguicidas que no provocan lesiones dermales graves

**Table 6**  
Predictive capacity of the in vitro skin irritation test (OECD TG 439) to predict in vivo skin irritation (OECD TG 404) of agrochemical formulations.<sup>a</sup>

	Data subset	CLP	DSD
Sensitivity	All	44% (11/25)	46% (12/26)
	Liquids	44% (11/25)	46% (12/26)
	Solids	n/a	n/a
Specificity	All	60% (24/40)	62% (24/39)
	Liquids	56% (20/36)	57% (20/35)
	Solids	100% (4/4)	100% (4/4)
Accuracy	All	54% (35/65)	55% (36/65)
	Liquids	51% (31/61)	52% (32/61)
	Solids	100% (4/4)	100% (4/4)

Irritación  
65 pares de estudios  
44% sensibilidad  
60% especificidad  
54% precisión

<sup>a</sup> Agrochemical formulations not classified as well as UN GHS Cat 3 based on in vivo are considered non-irritant (cf. Table 1).

(Kolle et al., 2017)



# Discusión – Categorización x Cálculo de adición

## Skin Irritation

A)

		GHS Category (by calculation)			
		1	2	3	NC
GHS Category (in vivo)	1	0	2	0	0
	2	0	11	23	6
	3	0	9	6	13
	NC	1	22	11	103
Total		1	44	40	122

Matches:	58.0 %	(n = 120)
Underestimation:	21.3 %	(n = 44)
Overestimation:	20.8 %	(n = 43)

Total 207 formulaciones

Skin irritation	Prediction using 2 combined non-testing evidence		
	Evidence 1: existing eye	Evidence 2: GHS calculation	Prediction
Negatives <i>in vivo</i> (GHS not classified): 136	Negatives: 89	Negatives: 62	True negatives
	Positives: 47	Positives: 27	Inconclusive
Positives <i>in vivo</i> (GHS cat 1, 2A or 2B): 69	Negatives: 21	Negatives: 6	Inconclusive
		Positives: 41	False positives
	Positives: 48	Negatives: 7	False Negatives
		Positives: 14	Inconclusive
		Negatives: 4	Inconclusive
		Positives: 44	True positives

- El cálculo del SGA realizado antes de cualquier prueba *in vitro* o *in vivo* puede proporcionar información útil
- El potencial predictivo es notablemente alto en el resultado negativo (82-98%).
- Los resultados negativos de los cálculos de adición (SGA no clasificado) deben considerarse fiables.

(Corvaro et al., 2017)



# Conclusiones

1) Utilice el método de cálculo del SGA.

Negativo - Se puede aceptar a la alta predictividad negativa.

Positivo - Se puede aceptar resultados positivos (con alta tasa de sobrepredicción).



(Corvaro et al., 2017)



# Conclusiones



2) Utilice métodos de prueba in vitro validados y aceptados por las reglamentaciones

Combinación de Cálculo de adición + prueba in vitro

Negativo - Se puede aceptar como un resultado verdadero.

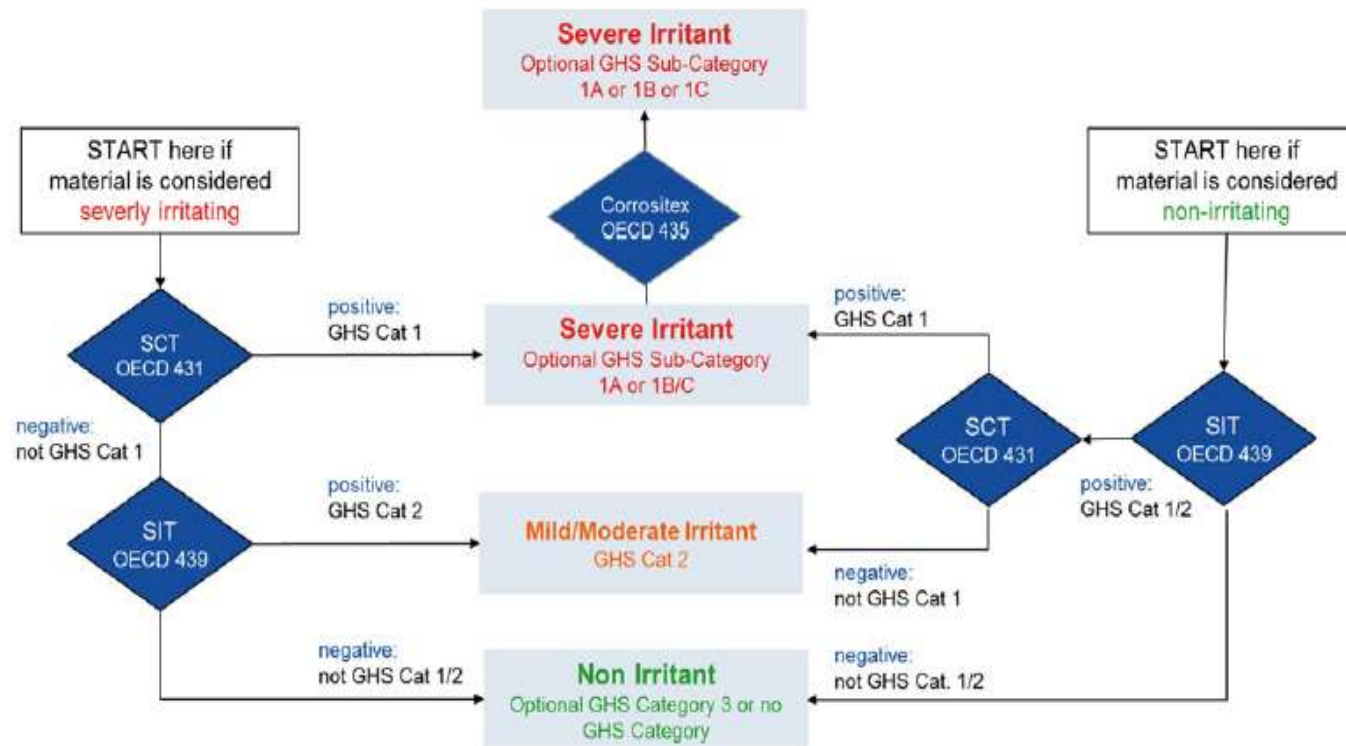
Positivo – Se puede aceptar una clasificación como irritante y el uso del EPI relevante en la etiqueta\*.

\* no se caracteriza completamente el peligro intrínseco (potencia de la irritación), pero se garantiza la seguridad humana

*(Corvaro et al., 2017)*



# Conclusiones



**Fig. 2** Combination of in vitro methods to assess skin irritation/corrosion. Depending on the expected effects (severely irritating or nonirritating), the first test conducted is chosen. *Cat* category, *OECD* OECD test guideline, *SCT* skin corrosion test, *SIT* skin irritation test

(Kolle & Landsiedel, 2021)



# Conclusiones

- ✓ No se recomiendan las pruebas en conejos in vivo (OECD 404) y solo debe realizarse como último recurso
- ✓ Si es necesario evaluar la potencia de irritación cutánea de las formulaciones, lamentablemente el ensayo in vivo sigue siendo necesario.



*(Corvaro et al., 2017 ; Kollé & Landsiedel, 2021)*



# Referencias

- OCDE – IATA Guidance 203, <https://doi.org/10.1787/20777876>
- OECD Guidance 431, 2019 <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>
- OECD Guidance 439, 2021 <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- SGA (Rev 9) (2021) [https://unece.org/sites/default/files/2022-01/GHS\\_Rev9S.pdf](https://unece.org/sites/default/files/2022-01/GHS_Rev9S.pdf)
- M. Corvaro, et al. (2017). A retrospective analysis of in vivo eye irritation, skin irritation and skin sensitisation studies with agrochemical formulations: Setting the scene for development of alternative strategies. Regulatory Toxicology and Pharmacology, V. 89, Pages 131-147, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.06.014>
- S. N. Kolle, et al. (2017). Regulatory accepted but out of domais: In vitro skin irritation tests for agrochemical formulations. Regulatory Toxicology and Pharmacology, V. 89, Pages 125-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.016>
- S. N. Kolle, R. Landsiedel (2021). Human-Derived in vitro models used for skin toxicity testing under REACh. In: M. Schäfer-Korting et al. (eds.), Organotypic Models in Drug Development, Handbook of Experimental Pharmacology 265, [https://doi.org/10.1007/164\\_2020\\_368](https://doi.org/10.1007/164_2020_368)



# Gracias!

[rosana.murata@bayer.com](mailto:rosana.murata@bayer.com)

