



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:








# Sensibilización de la piel

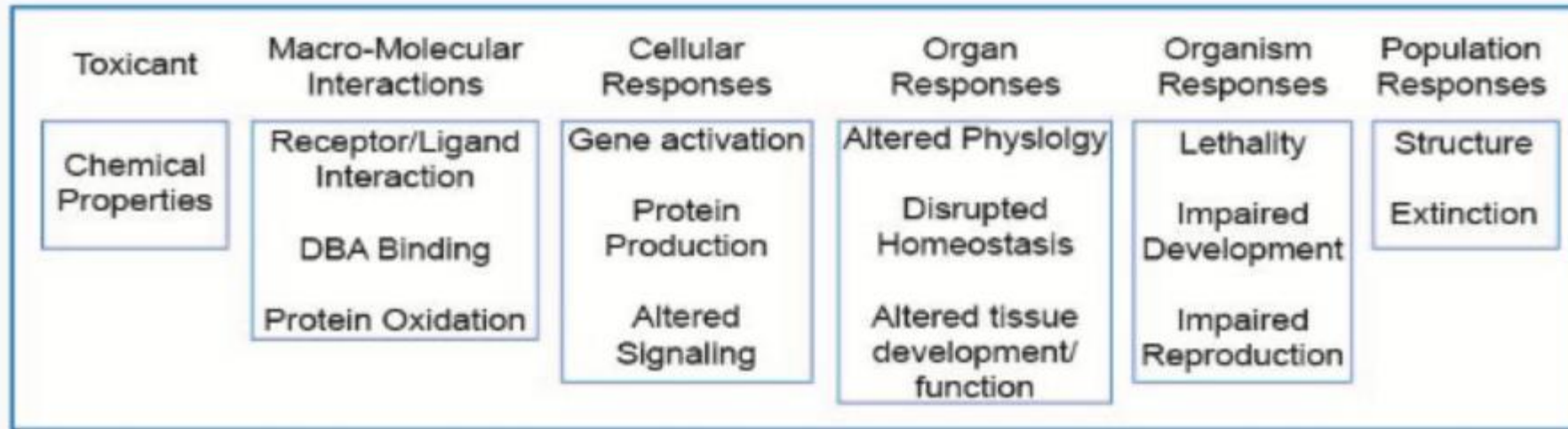
- ✓ El término "sensibilizante de la piel" se refiere a una sustancia que puede conducir a una respuesta alérgica después de un contacto repetido con la piel.



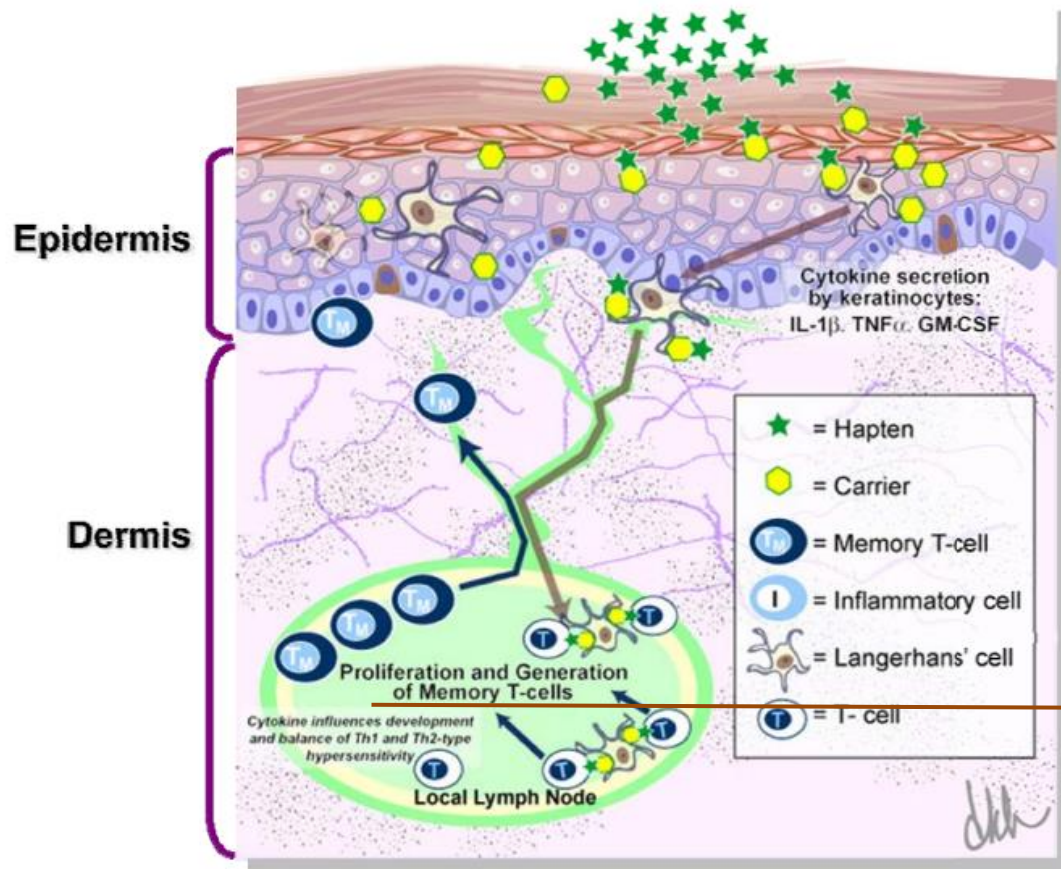
# Sensibilización– Clasificación según el SGA

<b>SGA 2019</b>	<b>Cat.1</b>	<b>Sub Cat. 1A</b>	<b>Sub Cat. 1B</b>
	Casos en humanos de sensibilización por contacto y/o Si un ensayo en animales mostró resultado positivo	<u>Frecuencia elevada</u> de casos en humanos y/o <u>Alta potencia</u> de sensibilización en animales de laboratorio	<u>Frecuencia baja a moderada</u> de casos en humanos y/o <u>Baja o moderada potencia</u> de sensibilización en animales de laboratorio
	<b>ATENCIÓN</b>  Puede provocar una reacción alérgica cutánea	<b>ATENCIÓN</b>  Puede provocar una reacción alérgica cutánea	<b>ATENCIÓN</b>  Puede provocar una reacción alérgica cutánea

# Vía de resultado adverso



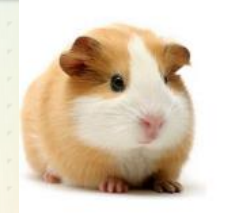
Una vía de resultado adverso (AOP) describe una secuencia lógica de eventos causalmente vinculados en diferentes niveles de organización biológica, que sigue la exposición a una sustancia química y conduce a un efecto adverso para la salud en los seres humanos o la vida silvestre.



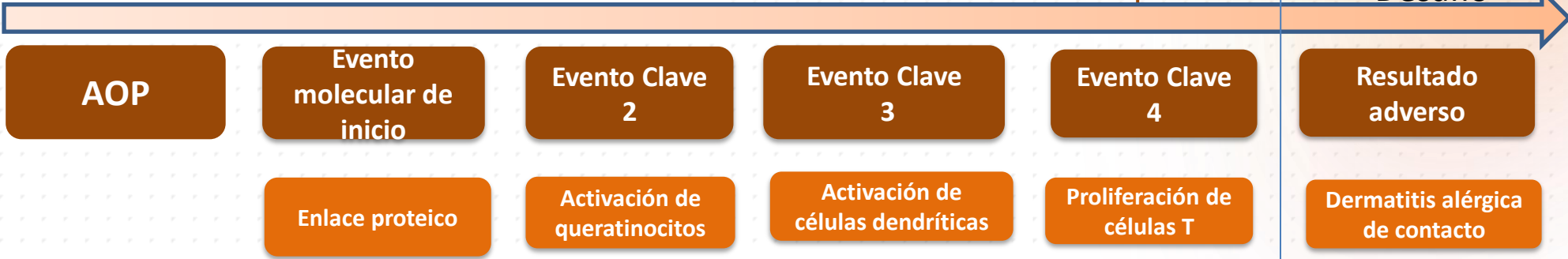
Mecanístico  
Sensibilización

LLNA  
OECD TG 429

Maximization/  
Buehler OECD TG  
406



Observacional  
Desafío

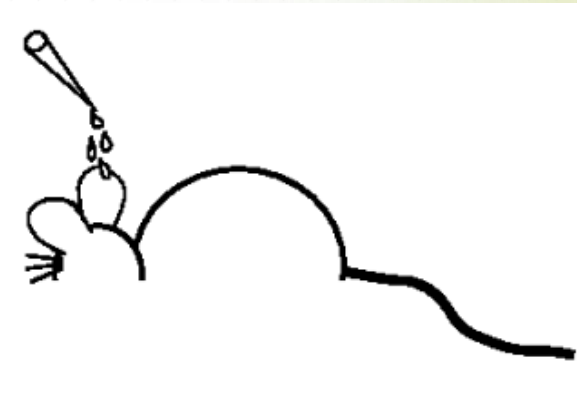


# Ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA, OCDE 429)



- Sensibilización: 3 tratamientos diarios (aplica la sustancia sobre la superficie dorsal del pabellón auricular)
  - Por lo menos 3 concentraciones (25  $\mu$ L)
  - Por lo menos 4 animales/grupo
  - Control negativo/control positivo
  - *Se realiza un pre-test para determinar la mayor concentración que puede ser usada*
    - 1 o 2 animales/grupo
    - 3 tratamientos diarios
    - 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%
    - Los animales se observan hasta el día 6
    - La mayor concentración a usar en el estudio no puede causar toxicidad sistémica ni irritación dérmica excesiva (eritema o espesor del pabellón auricular)

Imagen de Helen Wahlkvist 1999 " Predictive testing for contact allergy Comparison of some guinea pig and mouse protocols including dose-response designs "



# Ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA, OCDE 429)



- Día 4 y 5 sin tratamiento

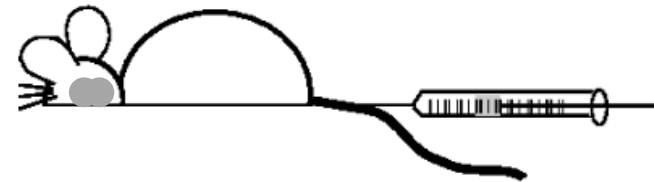
Imagen de Helen Wahlkvist 1999 " Predictive testing for contact allergy Comparison of some guinea pig and mouse protocols including dose-response designs "



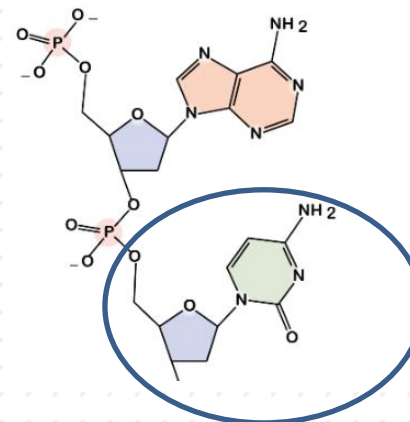
# Ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA, OCDE 429)



Imagen de Helen Wahlkvist 1999 " Predictive testing for contact allergy Comparison of some guinea pig and mouse protocols including dose-response designs "



- Día 6: inyección de 3H-timidina en la vena caudal
- 5 horas más tarde se extraen los ganglios linfáticos regionales de cada oreja



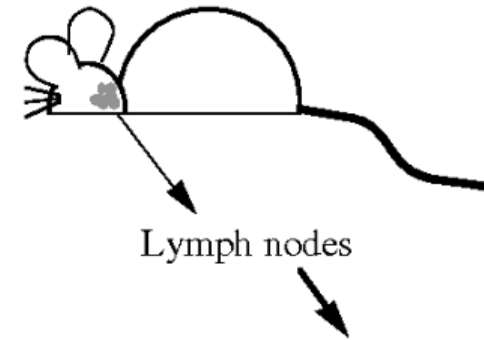
# Ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA, OCDE 429)

- Resultados:

-**Índice de estimulación (SI)** si la proliferación celular es más de 3 veces superior (>3) al grupo control el resultado se considera positivo: sensibilizante

-**Concentración estimada 3 (EC3):** Concentración necesaria para producir un índice de estimulación(SI) de 3.

Imagen de Helen Wahlkvist 1999 " Predictive testing for contact allergy Comparison of some guinea pig and mouse protocols including dose-response designs "



- Suspensión de células linfáticas (individual)
  - Se mide la proliferación celular (dpm)
  - Se calcula el valor medio para cada grupo
  - Se compara con el valor de proliferación celular del grupo control



# Sensibilización– Clasificación según el SGA




<b>SGA 2019</b>	<b>Cat.1</b>	<b>Sub Cat. 1A</b>	<b>Sub Cat. 1B</b>
	Casos en humanos de sensibilización por contacto y/o Si un ensayo en animales mostró resultado positivo	<u>Frecuencia elevada</u> de casos en humanos y/o <u>Alta potencia</u> de sensibilización en animales de laboratorio	<u>Frecuencia baja a moderada</u> de casos en humanos y/o <u>Baja o moderada potencia</u> de sensibilización en animales de laboratorio
	<b>ATENCIÓN</b> 	<b>ATENCIÓN</b> 	<b>ATENCIÓN</b> 
	<b>Puede provocar una reacción alérgica cutánea</b>	<b>Puede provocar una reacción alérgica cutánea</b>	<b>Puede provocar una reacción alérgica cutánea</b>

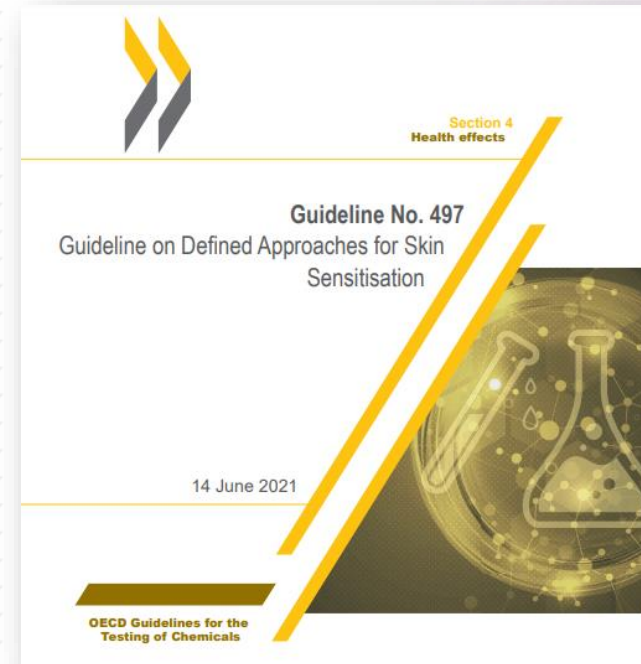
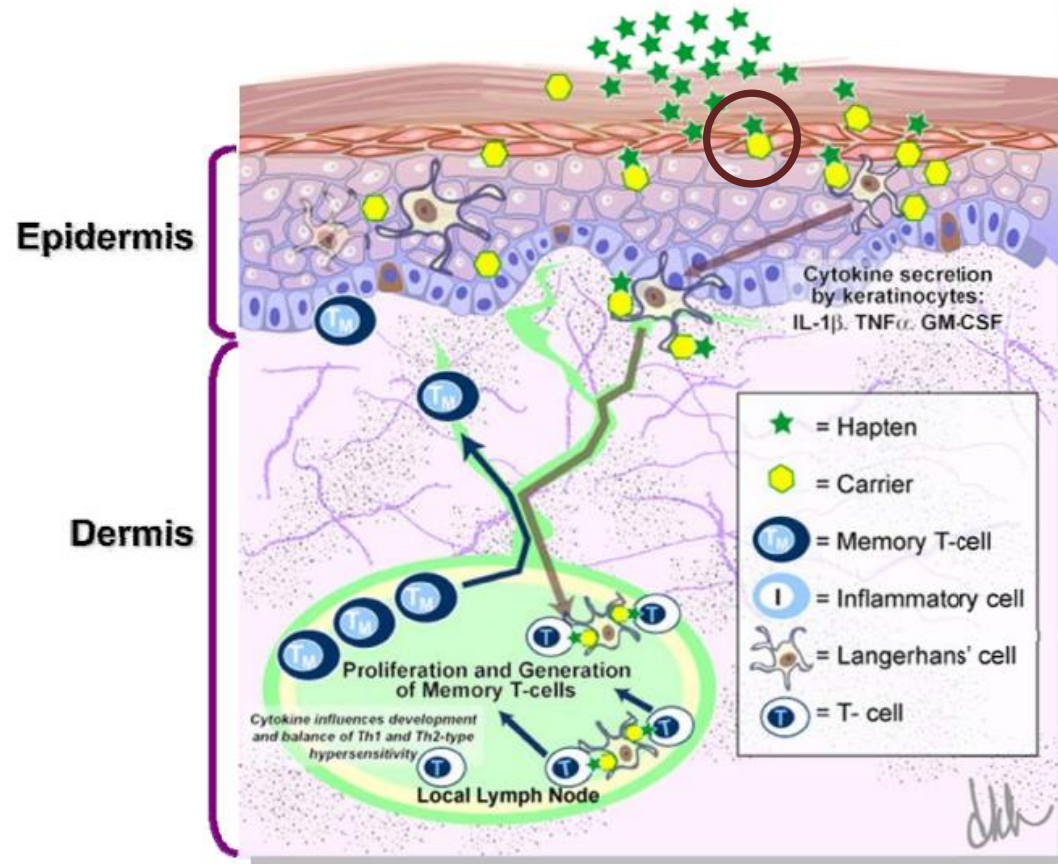
Tabla 3.4.3: Resultados de ensayos en animales para la subcategoría 1A

Ensayo	Criterios
Ensayo local en nódulos linfáticos	Valor de la CE3 ≤ 2%

Tabla 3.4.4: Resultados de ensayos en animales para la subcategoría 1B

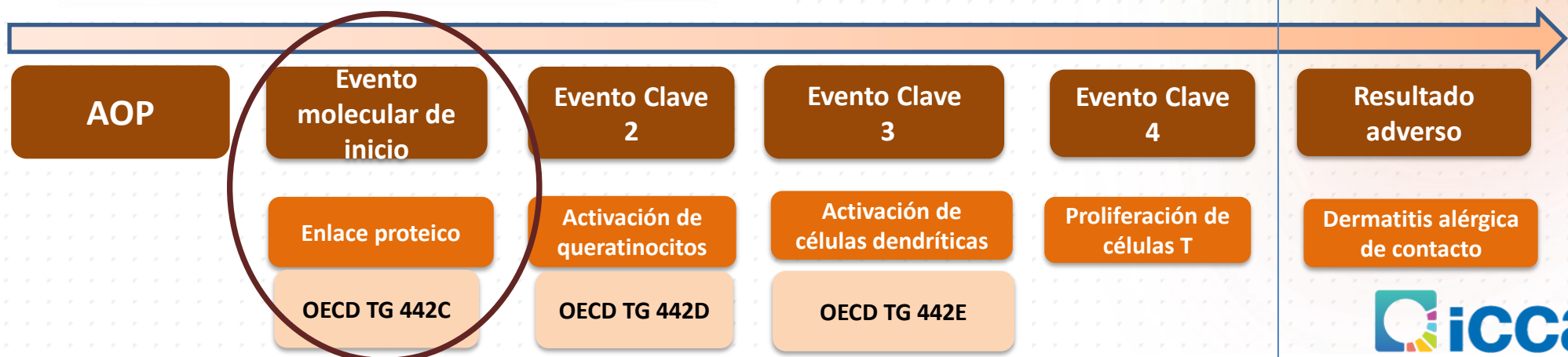
Ensayo	Criterios
Ensayo local en nódulos linfáticos	Valor de la CE3 > 2%





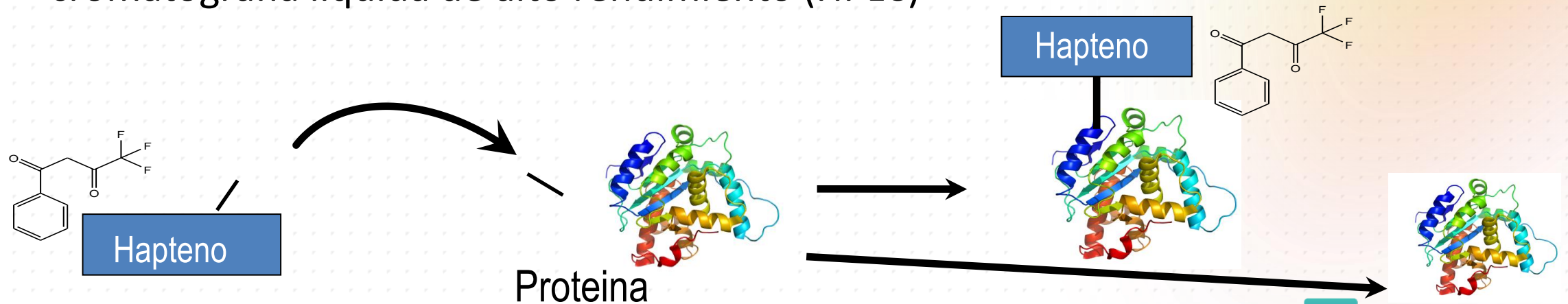
Mecanístico

Observacional

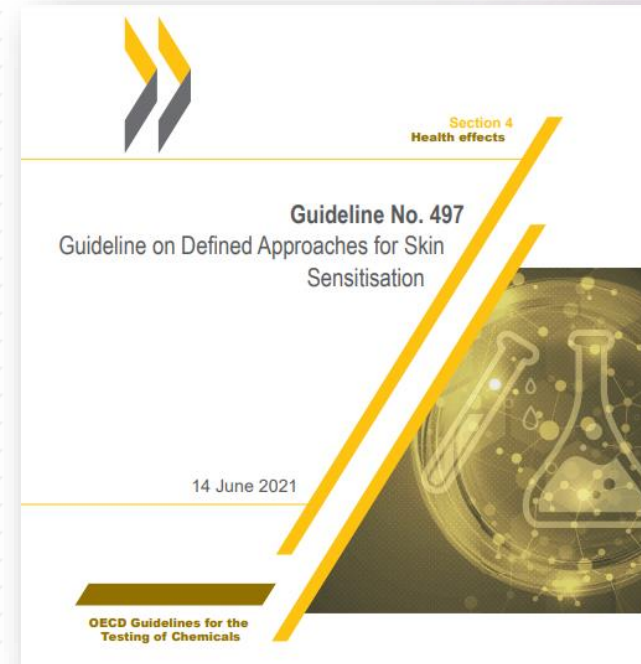
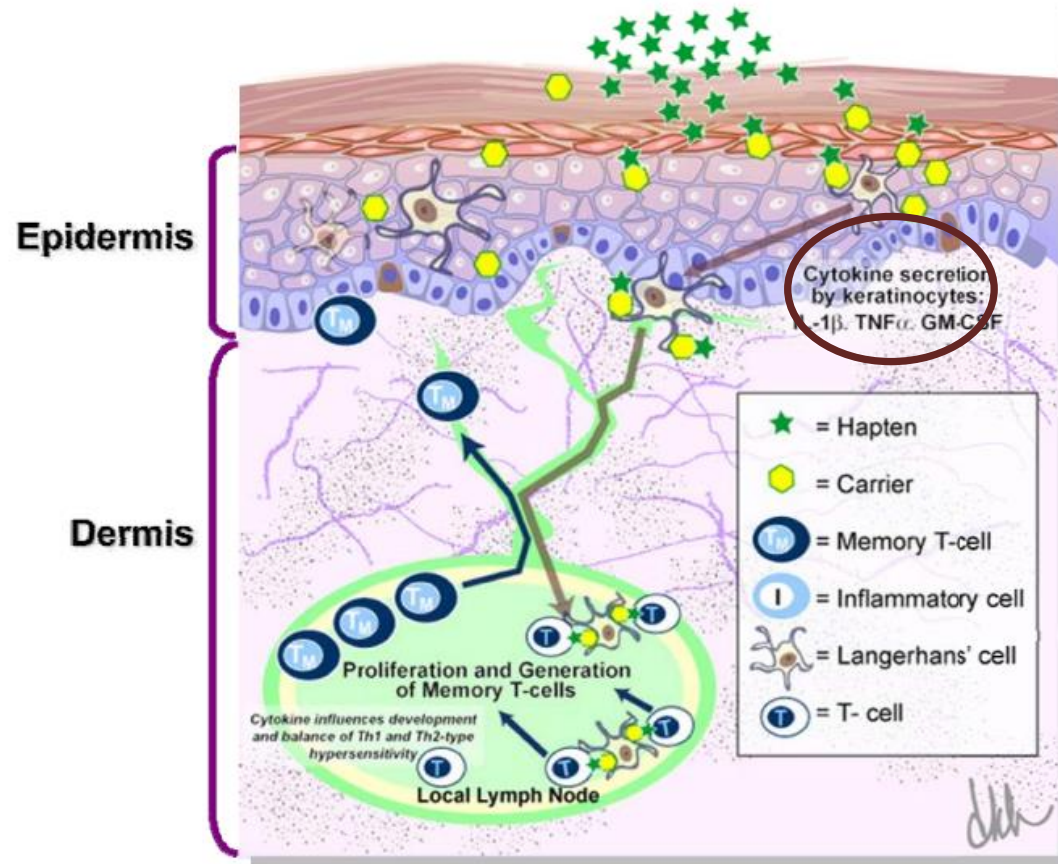


# Ensayo directo de reactividad peptídica (OCDE TG 442C)

- **Evento molecular inicial (EMI)** de sensibilización
- Método *in chemico*
- Evaluar la reactividad de una sustancia (hapteno) con proteínas sintéticas que contienen los aminoácidos lisina o cisteína, luego de 24 horas de incubación
- Medir el % de disminución de la proteína sintética libre (sin hapteno) con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

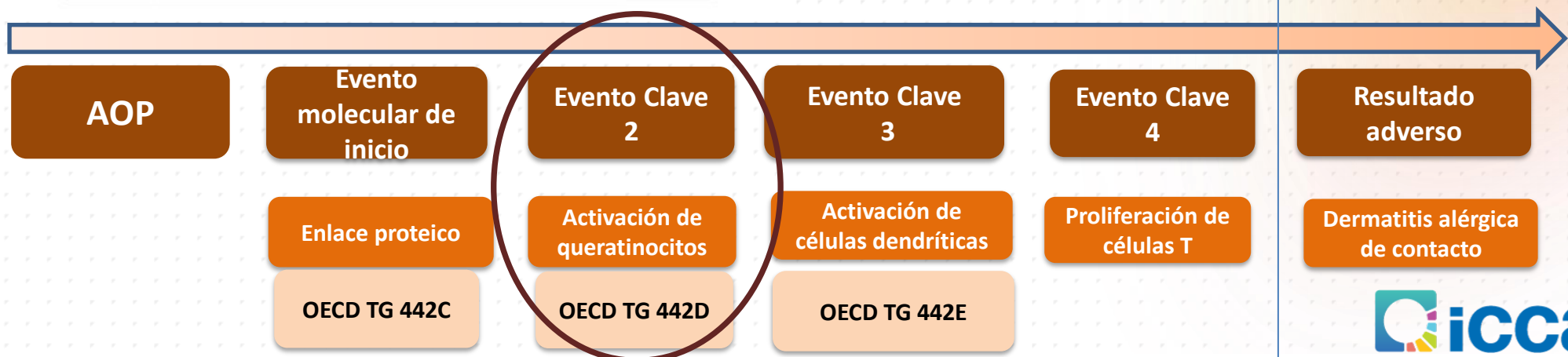


*Hapteno: sustancia de bajo peso molecular que precisa estar ligada a una proteína para ser reconocida por el sistema inmune*



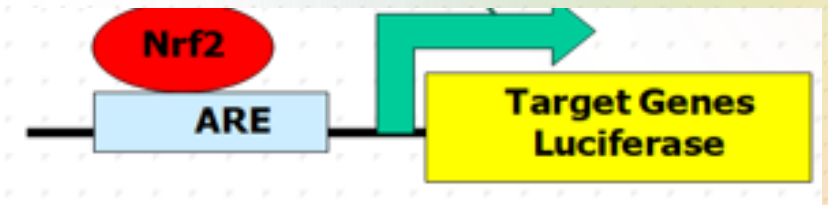
Mecanístico

Observacional

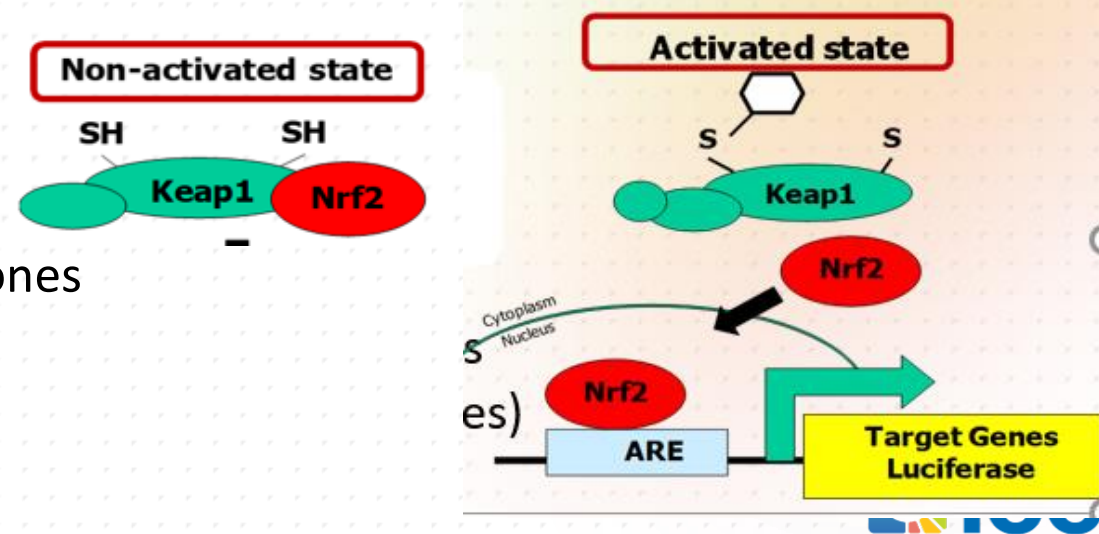


# Ensayo keratinosens (OCDE TG 442D)

- Método in vitro en células de piel humana inmortalizadas portadoras del gen de la luciferasa controlado por el gen ARE (*antioxidant response element*)
- El gen ARE es a su vez regulado por el factor de transcripción Nrf2

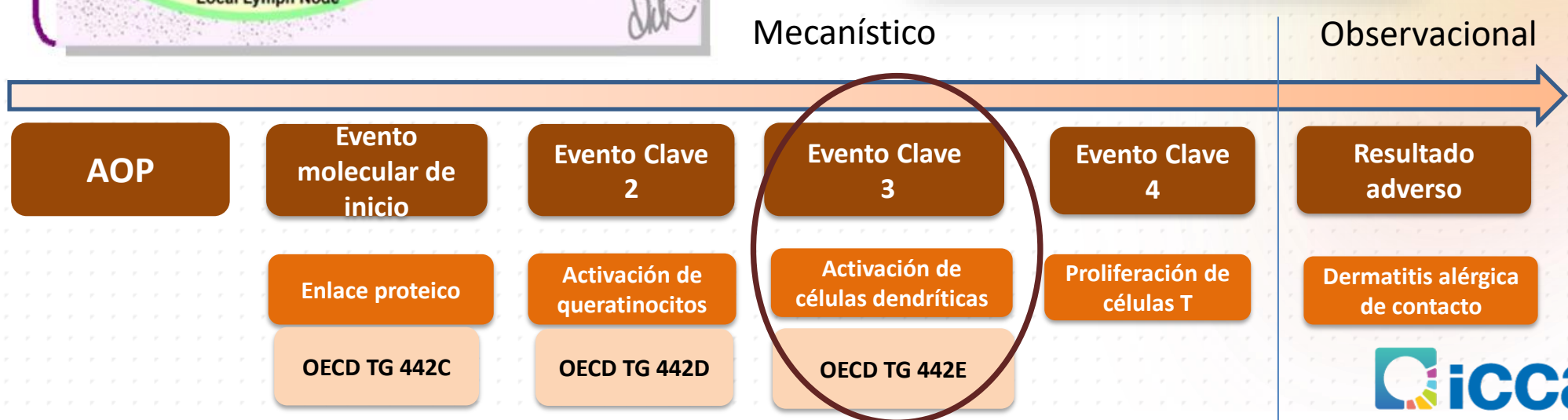
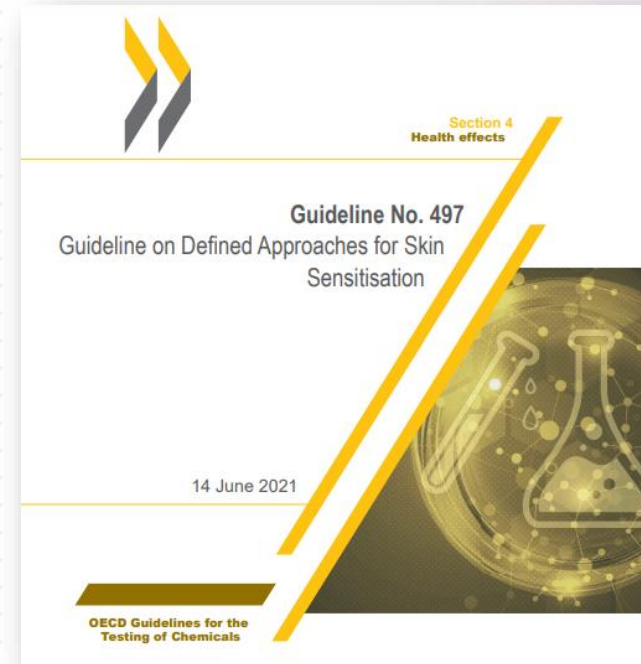
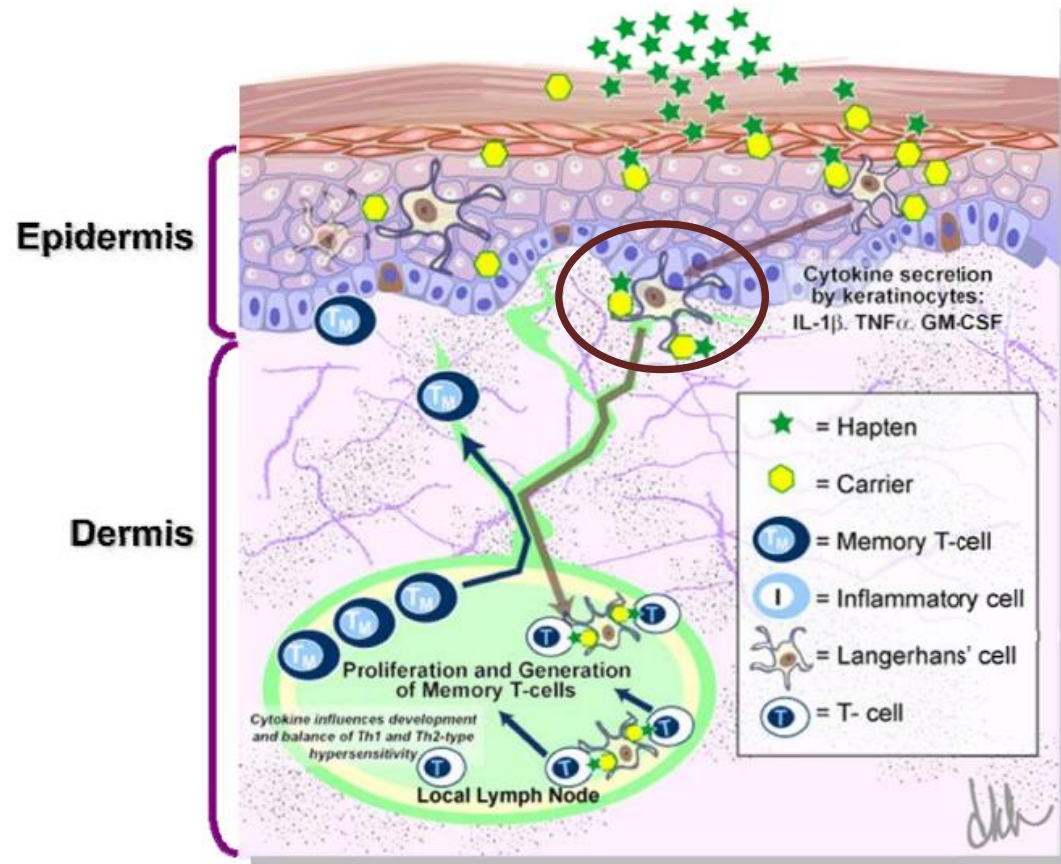


- Las sustancias sensibilizantes actúan sobre la proteína Keap1, provocando la disociación del factor Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) de esa proteína



- Cada sustancia es evaluada a 12 concentraciones
- Se mide la luminiscencia celular

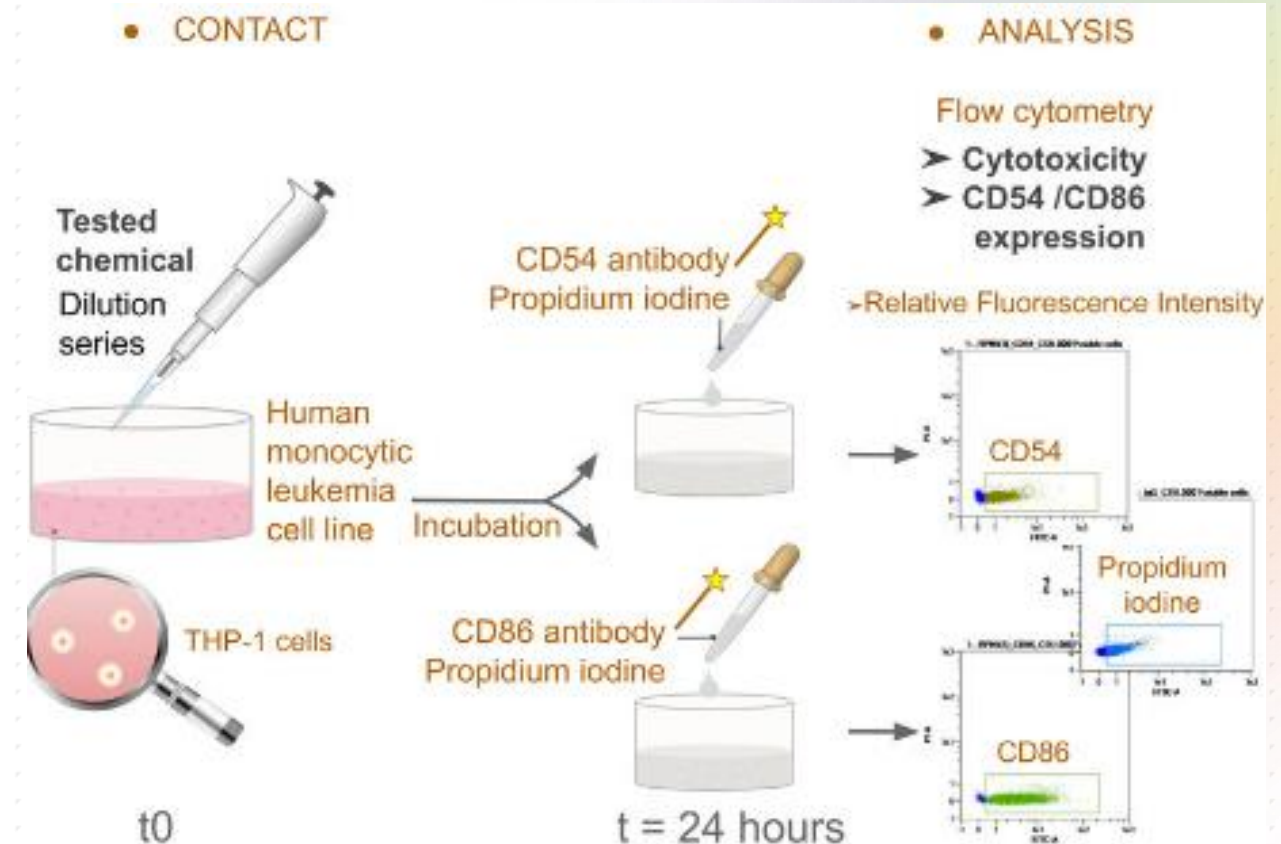
factor de transcripción: proteína que se liga al ADN y controla la transcripción de ADN a ARN mensajero

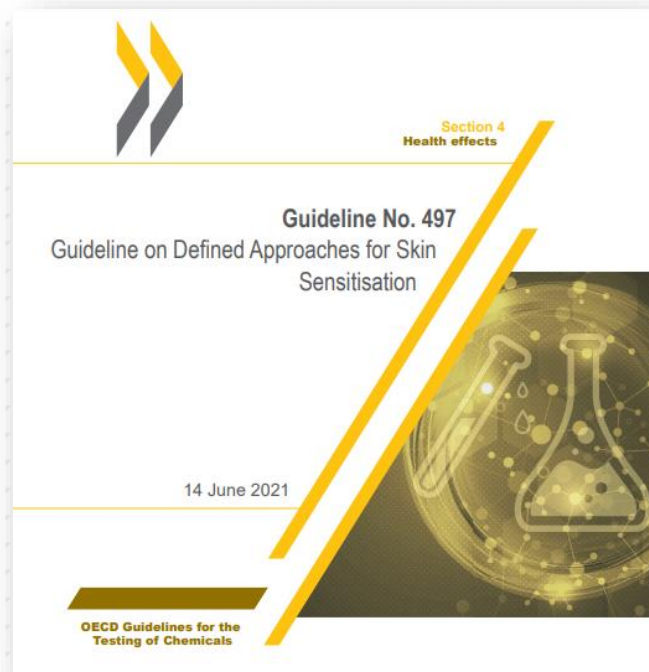




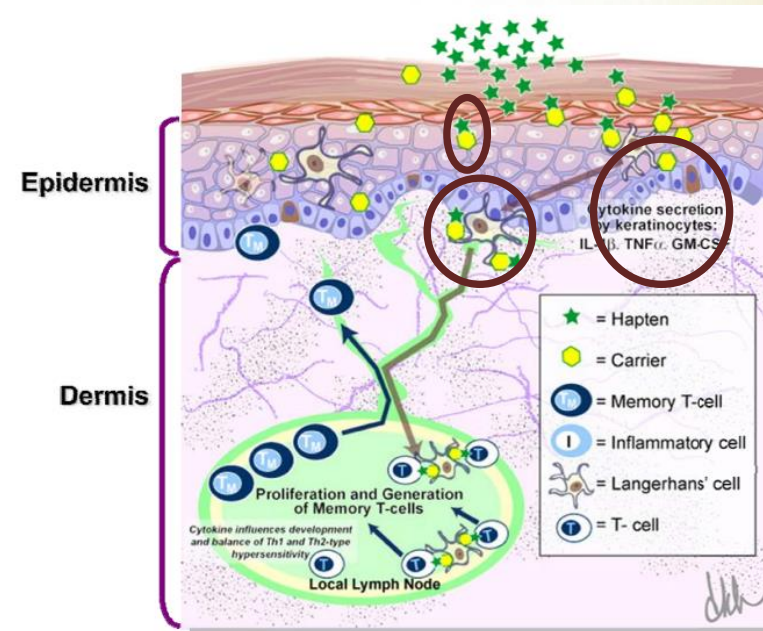
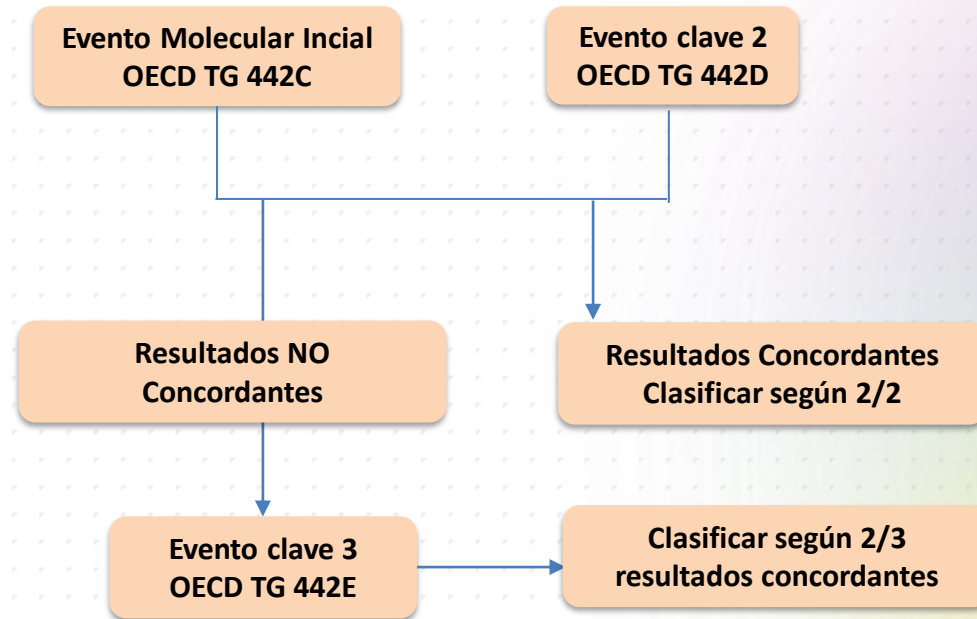
# Activación de células dendríticas (OCDE TG 442E)

- Evalúa la expresión de los marcadores de membrana celular (CD54 y CD86) en células humanas
- Controles positivo y negativo
- Se incuban (24 horas) las células con la sustancia en evaluación (12 concentraciones)
- Se mide la viabilidad celular ( $\geq 75\%$ )
- Se introducen anticuerpos anti CD54 y anti CD 68 marcados con fluoresceína
- Los cambios son medidos usando la técnica de citometría de flujo, evaluando la fluorescencia comparada con un control negativo





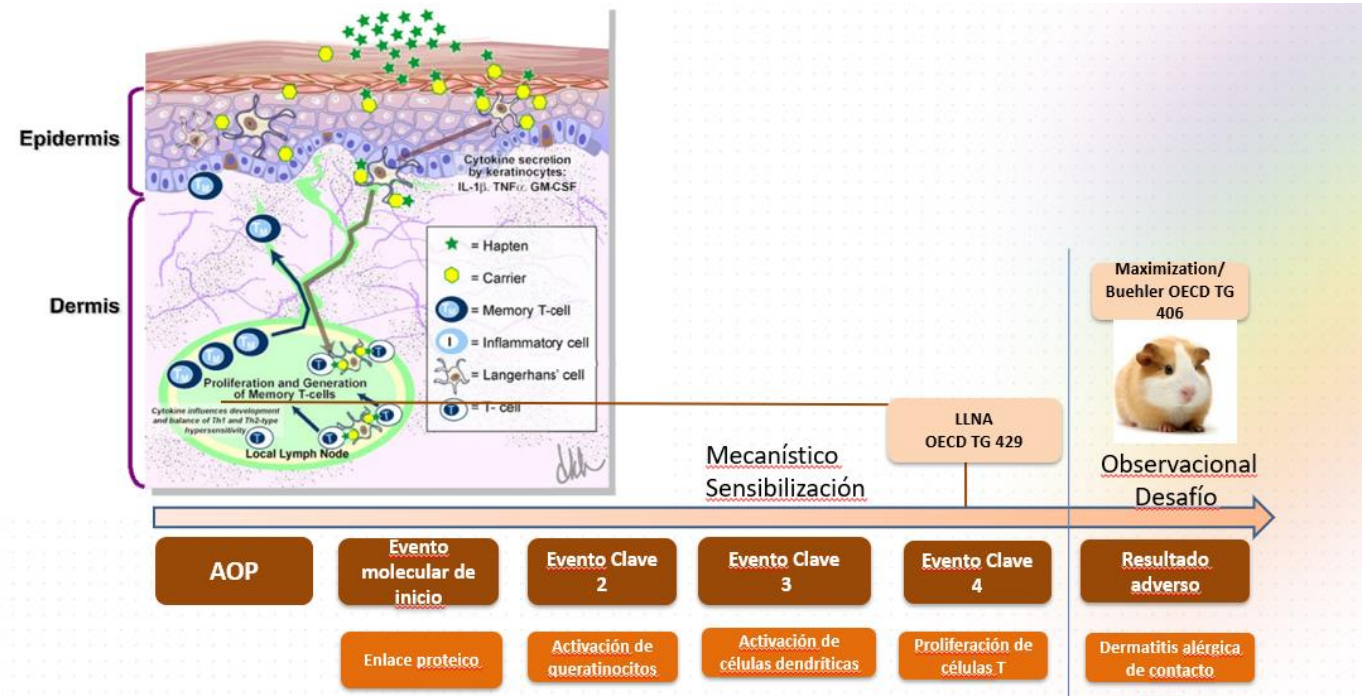
- Limitaciones de los métodos individuales *in chemico/in vitro* para predecir sensibilización
- Estrategia de pruebas 3 ensayos (2/3)
- EMI → EC2
- → EC3 (*mayores falsos positivos*)



# Aplicabilidad de métodos alternativos a los plaguicidas

- Productos formulados fitosanitarios

– Hoy, LLNA es el método de elección (Evento Clave 4)





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:








# Sensibilización

“cuando no se dispone de datos experimentales  
específicos”



# Sensibilización– Clasificación según el SGA

<b>SGA 2019</b>	<b>Cat.1</b>	<b>Sub Cat. 1A</b>	<b>Sub Cat. 1B</b>
	Casos en humanos de sensibilización por contacto y/o Si un ensayo en animales mostró resultado positivo	<u>Frecuencia elevada</u> de casos en humanos y/o <u>Alta potencia</u> de sensibilización en animales de laboratorio	<u>Frecuencia baja a moderada</u> de casos en humanos y/o <u>Baja o moderada potencia</u> de sensibilización en animales de laboratorio
	<b>ATENCIÓN</b>  Puede provocar una reacción alérgica cutánea	<b>ATENCIÓN</b>  Puede provocar una reacción alérgica cutánea	<b>ATENCIÓN</b>  Puede provocar una reacción alérgica cutánea



# Sensibilización– Clasificación de mezclas cuando no se dispone de datos experimentales

- ✓ Principios de extrapolación
- ✓ Valores de corte



# Sensibilización– Clasificación de mezclas cuando no se dispone de datos experimentales

- ✓ Principios de extrapolación
  - ✓ *Variación entre lotes*
  - ✓ *Dilución*
  - ✓ *Concentración*
  - ✓ *Extrapolación de una misma categoría para una 3ª mezcla*
  - ✓ *Mezclas esencialmente similares*



# Sensibilización– Clasificación de mezclas: extrapolación

## *Variación entre lotes*

- ✓ El potencial para provocar sensibilización de un lote se considera equivalente al de otro lote del mismo producto obtenido por el mismo fabricante o bajo su control



# Sensibilización– Clasificación de mezclas: extrapolación

## *Dilución*

- ✓ Si una mezcla ya evaluada se diluye con un diluyente no sensibilizante, la mezcla diluida se clasificará igual a la mezcla original.

	mezcla A	→	mezcla A diluida
Componente 1 Cat 1	10%		5%
Componente 2 No sensibilizante	90%		45%
Diluyente No sensibilizante	-		50%



# Sensibilización – Clasificación de mezclas: extrapolación

## *Concentración de mezclas sensibilizantes*

- ✓ A partir de una mezcla ya evaluada, Cat 1 o SubCat.1A, si se incrementa la concentración de los componentes Cat 1 o SubCat. 1A.

	mezcla A Cat 1 / 1A	mezcla A concentrada Cat 1 / 1A
Componente 1 Cat 1/ 1A	70%	90%
Componente 2 Cat. 1B	30%	10%



# Sensibilización– Clasificación de mezclas: extrapolación

## *Extrapolación de una misma categoría para una 3ª muestra*

- ✓ Tres mezclas (A, B y C) con componentes idénticos, A y B fueron evaluadas y pertenecen a la misma categoría/subcategoría, esa categoría se extrapola para la mezcla C si los componentes se encuentran en concentraciones intermedias entre A y B

	mezcla A	mezcla C	Mezcla B
Componente 1 Cat 1	30%	25%	20%
Componente 2 Cat 2	20%	15%	10%
H <sub>2</sub> O	50%	60%	70%



# Sensibilización– Clasificación de mezclas: extrapolación

## *Mezclas esencialmente similares*

- ✓ Los componentes similares se encuentran en concentración similar
- ✓ La concentración de los componentes diferentes sea la misma y no sean sensibilizantes

	mezcla A + <u>B</u>	mezcla A + <u>C</u>
Componente A - Cat 1	30%	30%
Componente B - No sensibilizante	50%	-
Componente C – No sensibilizante	-	50%



# Sensibilización– Clasificación de mezclas: extrapolación

## *Mezclas esencialmente similares*

- ✓ Los componentes similares se encuentran en concentración similar
- ✓ La concentración de los componentes diferentes sea la misma y no sean sensibilizantes

	mezcla A + <u>B</u>	→	mezcla A + <u>C</u>
Componente A - Cat 1	30%		30%
Componente B - No sensibilizante	50%		-
Componente C – No sensibilizante	-		50%



# Sensibilización– Clasificación de mezclas cuando no se dispone de datos experimentales

- ✓ Valores de corte



# Sensibilización– Clasificación de mezclas: valores de corte

Componente clasificado como	Valor de corte que determina la clasificación de la mezcla como sensibilizante
Sensibilizante Cat 1 (sin subcategoría)	> 1%*
Sensibilizante Cat 1A	>0.1%
Sensibilizante Cat 1B	> 1%

*\*algunas autoridades pueden exigir la clasificación de la mezcla como Cat 1 si el componente cuando se encuentra en concentraciones >0.1%*



# Sensibilización– Clasificación de mezclas cuando no se dispone de datos experimentales

- ✓ Principios de extrapolación
  - ✓ *Dilución*
  - ✓ *Variación entre lotes*
  - ✓ *Concentración*
  - ✓ *Extrapolación de una misma categoría para una 3ª mezcla*
  - ✓ *Mezclas esencialmente similares*
- ✓ *Valores de corte*



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:

