



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

Desarrollo de nuevos modelos de tejido
reconstruido in vitro como método alternativo a
la experimentación animal en la evaluación de
peligros para la salud humana

Trabajo de investigación realizado por Manuel Chacón Rodríguez para
optar al Grado de Doctor por la Universidad de Oviedo

Oviedo, octubre 2023



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo de nuevos modelos de tejido reconstruido in vitro como método alternativo a la experimentación animal en la evaluación de peligros para la salud humana	Inglés: Development of new in vitro reconstructed tissue models as an alternative method to animal experimentation in human health safety assessment
2.- Autor	
Nombre: Manuel Chacón Rodríguez	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

La Unión Europea cuenta con una de las mayores legislaciones sobre seguridad referente a productos de uso humano. De este modo, todo producto que entre en el mercado europeo debe identificar y comunicar adecuadamente los potenciales peligros que puede suponer para la salud humana, haciendo de obligada evaluación la toxicidad aguda, la corrosión e irritación cutánea, las lesiones oculares graves o irritación ocular, la sensibilización respiratoria o cutánea, la mutagenicidad en células germinales, la toxicidad específica en determinados órganos tras exposición única y tras exposición prolongada y el peligro por aspiración. En lo referente a las lesiones cutáneas y lesiones oculares la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD) ha implementado la utilización del test de Draize en la Guía de Trabajo (TG) 404. En el test de Draize, los productos químicos son aplicados directamente en la piel, ojos y mucosas de animales de experimentación, teniendo por tanto el potencial de causar una gran incomodidad y dolor a los animales, levantando por tanto grandes críticas en la ética y bienestar animal. Debido a ello, la legislación Europea promueve el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal con el objetivo de reducir, reemplazar y refinar el uso de animales en investigación, lo cual ha llevado a la implementación de las TG, 431, 439 y 492 como métodos alternativos para la evaluación de la corrosión e irritación cutánea y la evaluación del daño ocular. El desarrollo de métodos alternativos ha supuesto una decisión que ha cambiado el paradigma europeo tras la aplicación de la Regulación 1223/2009 la cual ha implementado una prohibición de la evaluación en animales de productos cosméticos, así como sus ingredientes y mezcla de ingredientes y una prohibición de la comercialización y distribución de cualquier producto cosmético evaluado en animales, la cual está vigente desde marzo del 2013. Muchos otros países han seguido la estela de la Unión Europea en eliminar la experimentación animal para pruebas toxicológicas y recientemente, la Agencia para la Protección Medioambiental de los Estados Unidos de América ha anunciado su compromiso a eliminar todas las propuestas de estudio y financiación que utilicen mamíferos para el año 2035.

Entre los métodos alternativos para la evaluación de la corrosión e irritación cutánea y el daño ocular severo o irritación ocular, se encuentra el uso de test in vitro basados en epitelios humanos reconstruidos que reflejan la estructura histológica, morfológica, bioquímica y fisiológica de la parte superior de la piel y de la córnea humana. La última versión de las TGs 431 (corrosión cutánea), 439 (irritación cutánea) y 492 (irritación ocular) lista 5 modelos de epitelio reconstruido comercialmente disponibles que se han sometido a una validación formal. Esta validación, es realizada mediante la evaluación de productos de referencia con propiedades irritantes conocidas y la comparación de los resultados obtenidos con los datos de referencia de estudios in vivo.

En la presente tesis doctoral se desarrollan nuevos modelos de tejidos reconstruidos in vitro y nuevas metodología de evaluación acorde a las exigencias de la OECD para la evaluación de productos químicos en modelos de epitelios reconstruidos y con ello, se establecen las bases de nuevos métodos alternativos a la experimentación animal en la evaluación de los peligros para la salud humana de productos químicos.



RESUMEN (en Inglés)

The European Union has one of the most extensive safety legislations on products intended for human use. Thus, all products entering the European market must adequately identify and communicate the potential hazards to human health, making it mandatory to assess acute toxicity, corrosion and skin irritation, serious eye damage or eye irritation, respiratory or skin sensitization, mutagenicity in germ cells, specific toxicity in certain organs after single exposure and after prolonged exposure, and the toxicity by aspiration. For skin and eye damage, the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) has implemented the use of the Draize test in Test Guideline (TG) 404. In the Draize test, chemicals are applied directly to the skin, eyes and mucous membranes of experimental animals, thus having the potential to cause great discomfort and pain to the animals, thus having the potential to cause great discomfort and pain to the animals, thus raising great criticism in animal ethics and animal welfare. Because of this, European legislation promotes the development of alternative methods to animal testing with the aim of reducing, replacing and refining the use of animals in research, which has led to the implementation of the TH 431, 439 and 492 as alternative methods for the assessment of skin corrosion and irritation and the assessment of eye damage. The development of alternative methods has been a paradigm-shifting decision in Europe following the implementation of Regulation 1223/2009 which has implemented a ban on the animal testing of cosmetic products, their ingredients and mixtures of ingredients and a ban on the marketing and distribution of any cosmetic products tested on animals, which has been in force since March 2013. Many other countries have followed the lead of the European Union in phasing out animal testing for toxicological testing and recently, the United States Environmental Protection Agency has announced its commitment to eliminate all proposed studies and funding using mammals by 2035.

Alternative methods for the assessment of skin corrosion and irritation and severe eye damage or eye irritation include the use of in vitro test based on reconstructed human epithelia that reflect the histological, morphological, biochemical and physiological structure of human upper skin and cornea. The latest version of TGs 431 (skin corrosion), 439 (skin irritation) and 492 (eye irritation) includes 5 commercially available reconstructed epithelia models that have undergone formal validation. This validation is performed by evaluating reference products with known irritant properties and comparing the results obtained with reference data from in vivo studies.

This doctoral thesis develops new in vitro reconstructed tissue models and new evaluation methodologies in line with OECD requirement for the evaluation of chemicals in reconstructed epithelial models and thereby establishes the basis of new alternative methods to animal testing in the evaluation of human health hazards of chemicals.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____**

Pain is pain, and the importance of preventing unnecessary pain and suffering does not diminish because the being that suffers is not a member of our own species

Peter Singer – *Animal liberation* - 1975

Agradecimientos

Quisiera comenzar esta tesis agradeciendo a todas las personas que han estado a mi lado y cuyo apoyo ha sido parte fundamental para alcanzar esta meta en mi vida.

A mis Directores de Tesis, Prof. Jesús Merayo y Dr. Álvaro Meana. Gracias a ambos por confiar en mí desde el primer momento y empujarme siempre a superar mis propios límites y alcanzar cualquier objetivo. Gracias, Jesús, por ser un ejemplo de ambición, perseverancia y resultado, sin ti hoy no sería ni graduado, ni máster, ni estaría en camino de convertirme en doctor, gracias ayudarme a ser “persona”. Gracias Álvaro por ser mi mentor en el mundo de la ciencia y gracias por hacerme ver la investigación desde una perspectiva realista y funcional. Es un honor ser con quien decides cerrar tu ciclo de tesis; espero estar a la altura.

A todos los que han sido mis compañeros en la FIO; tanto a los pocos que seguís, como a todos los que ya os habéis ido. Gracias por todos estos años. En especial, a los que son y han sido mis compañeros en el Grupo de Superficie Ocular: Natalia, Nacho, Sergio, Mairobi y Cristina. Gracias por ser y haber sido una fuente constante de apoyo, motivación y ayuda a pesar de que no siempre haya sido fácil.

A Ramón y Silvia por estar siempre disponibles para echarme una mano en los mil y un chollos del día a día de la FIO. Gracias por haber hecho mi trabajo mucho más fácil.

Gracias a las chicas del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos: Marta, Sara, Paz y Rosana, por tender siempre una mano ante los problemas y por vuestra disponibilidad para colaborar en cualquier proyecto. Parte de esta tesis no se habría hecho sin vosotras.

Gracias a Tomás y a todo el equipo de trasplantes del *Schepens Eye Research Institute* por abrirme las puertas de su laboratorio durante mi pequeña estancia en Boston y hacerme sentir uno más del equipo. En especial, gracias a Shima por confiarme su trabajo. Espero que pronto nos volvamos a ver.

Agradecimientos

A mis padres, Asunción y Manuel. Gracias por haberme dado la libertad de recorrer mi propio camino en la vida y haberme apoyado siempre tanto en mis buenas como en mis malas decisiones; pero, sobre todo, gracias por seguir apoyándome día tras día y por tender siempre vuestra mano para ayudarme sea cual sea el motivo. Espero ser capaz de transmitir estos mismos valores en el futuro. Soy quien soy gracias a vosotros.

A Lara, mi compañera de vida. Gracias por tu cariño incondicional, por tu apoyo y por seguirme siempre hasta el fin del mundo. Has sido y eres mi mayor fuente de fuerza y motivación. Gracias por estar siempre a mi lado.

A Salem, gracias por ser siempre lo primero que veo cuando llego a casa y lo último que veo cuando me voy. Gracias por estar siempre con nosotros, nada sería igual sin ti.

A Deva, por ser mi presente y mi futuro. Gracias por darme una razón para mejorar cada día y darme la motivación para alcanzar metas aún más altas. Espero poder inspirarte a perseguir las tuyas propias y demostrarte que puedes conseguir todo lo que te propongas. Siempre contarás con mi cariño, apoyo y guía en cada etapa de tu vida.

A todos los que involuntariamente no he mencionado, pero que durante estos años os habéis preocupado por mí, ya sea con un mensaje o con una cerveza. Gracias a todos.

1.	Resumen	5
2.	Motivación, pregunta de investigación y estructura de la tesis	11
3.	Glosario.....	17
4.	Abreviaturas.....	21
5.	Introducción	27
	I. El sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (GHS).....	29
	a. Implementación del GHS en la Unión Europea.....	32
	b. Irritación/corrosión cutánea e irritación ocular/daño ocular severo ...	35
	c. Reglamento 1223/2009 y prohibición de la experimentación animal ..	39
	d. Alternativas al uso de animales.....	42
	II. La impedancia	46
	a. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	46
	b. Definición de impedancia	47
	c. El epitelio como un circuito eléctrico	50
	d. Aplicación de la impedancia en modelos de tejido in vitro	52
6.	Justificación	55
7.	Hipótesis	59
8.	Objetivos	63
9.	Material y método.....	67
	I. Tejidos humanos	69
	a. Aislamiento de células epiteliales corneales.....	69
	b. Aislamiento de queratinocitos.....	70
	II. Desarrollo de modelos RhCE y RhE	71
	a. Generación del modelo QobuR-RhCE	71

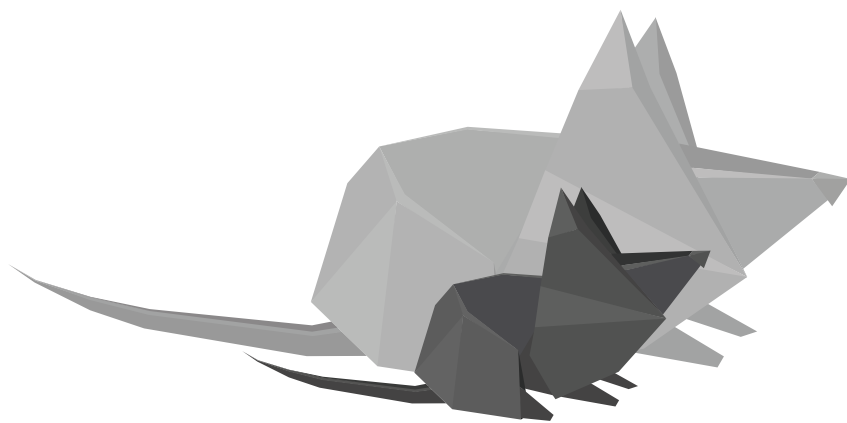
b. Generación del modelo QileX-RhE	71
III. Análisis del contenido lipídico del estrato córneo	72
IV. Evaluación de la TEER	72
V. Evaluación de la capacitancia	73
VI. Evaluación de la viabilidad celular	73
VII. Evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo en el modelo QobuR-RhCE	74
VIII. Evaluación de la irritación cutánea en el modelo QileX-RhE	74
IX. Evaluación del daño celular	75
X. Análisis histológico	75
XI. Análisis estadístico	76
Capítulo 1. Desarrollo de un modelo de epitelio corneal reconstruido	79
C1.1. Introducción	83
C1.2. Diseño experimental	84
C1.3. Resultados	85
C1.4. Discusión.....	91
Capítulo 2. Desarrollo de un modelo de epidermis reconstruida	95
C2.1. Introducción	99
C2.2. Diseño experimental	101
C2.3. Resultados	103
C2.4. Discusión.....	109
Capítulo 3. Pre-validación del modelo QobuR-RhCE para la evaluación de la irritación ocular y el daño ocular severo	113
C3.1. Introducción	117
C3.2. Diseño experimental	118
C3.3. Resultados	124

Índice

C3.4. Discusión	130
Capítulo 4. Pre-validación del modelo QileX-RhE para la evaluación de la irritación cutánea	133
C4.1. Introducción	137
C4.2. Diseño experimental.....	138
C4.3. Resultados	143
C4.4. Discusión	149
Capítulo 5. Uso de la capacitancia para la evaluación de la irritación ocular y el daño ocular severo	151
C5.1. Introducción	155
C5.2. Diseño experimental.....	157
C5.3. Resultados	159
C5.4. Discusión	169
Capítulo 6. Uso de la capacitancia para la evaluación de la irritación cutánea	175
C6.1. Introducción	179
C6.2. Diseño experimental.....	180
C6.3. Resultados	181
C6.4. Discusión	187
Capítulo 7. Evaluación del efecto protector de pomadas enriquecidas en vitamina A	193
C7.1. Introducción	197
C7.2. Diseño experimental.....	199
C7.3. Resultados	200
C7.4. Discusión	202
10. Discusión.....	205
11. Perspectivas de futuro	213
12. Conclusiones	217

13.	Bibliografía	221
14.	Divulgación científica	245
15.	Financiación	255
16.	Anexos.....	259

Resumen



Mus musculus

3.879.691 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

La Unión Europea cuenta con una de las mayores legislaciones sobre seguridad referente a productos de uso humano. De este modo, todo producto que entre en el mercado europeo debe identificar y comunicar adecuadamente los potenciales peligros que puede suponer para la salud humana, haciendo de obligada evaluación la toxicidad aguda, la corrosión e irritación cutánea, las lesiones oculares graves o irritación ocular, la sensibilización respiratoria o cutánea, la mutagenicidad en células germinales, la toxicidad específica en determinados órganos tras exposición única y tras exposición prolongada y el peligro por aspiración. En lo referente a las lesiones cutáneas y lesiones oculares, la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD) ha implementado la utilización del test de Draize en la Guía de Trabajo (TG) 404. En el test de Draize, los productos químicos son aplicados directamente en la piel, ojos y mucosas de animales de experimentación, teniendo por tanto el potencial de causar una gran incomodidad y dolor a los animales, levantando grandes críticas en la ética y bienestar animal. Debido a ello, la legislación Europea promueve el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal con el objetivo de reducir, reemplazar y refinar el uso de animales en investigación, lo cual ha llevado a la implementación de las TG 431, 439 y 492 como métodos alternativos para la evaluación de la corrosión e irritación cutánea y la evaluación del daño ocular. El desarrollo de métodos alternativos ha supuesto una decisión que ha cambiado el paradigma europeo tras la aplicación de la Regulación 1223/2009, la cual ha implementado una prohibición de la evaluación en animales de productos cosméticos, así como sus ingredientes y mezcla de ingredientes y una prohibición de la comercialización y distribución de cualquier producto cosmético evaluado en animales, la cual está vigente desde marzo del 2013. Muchos otros países han seguido la estela de la Unión Europea en eliminar la experimentación animal para pruebas toxicológicas y recientemente, la Agencia para la Protección Medioambiental de los Estados Unidos de América ha anunciado su compromiso a eliminar todas las propuestas de estudio y financiación que utilicen mamíferos para el año 2035.

Entre los métodos alternativos para la evaluación de la corrosión e irritación cutánea y el daño ocular severo o irritación ocular, se encuentra el uso de test *in vitro* basados en epitelios humanos reconstruidos que reflejan la

estructura histológica, morfológica, bioquímica y fisiológica de la parte superior de la piel y de la córnea humana. La última versión de las TG 431 (corrosión cutánea), 439 (irritación cutánea) y 492 (irritación ocular) lista varios modelos de epitelio reconstruido comercialmente disponibles que se han sometido a una validación formal. Esta validación es realizada mediante la evaluación de productos de referencia con propiedades irritantes conocidas y la comparación de los resultados obtenidos con los datos de referencia de estudios *in vivo*.

En la presente tesis doctoral se desarrollan nuevos modelos de tejidos reconstruidos *in vitro* y nuevas metodologías de evaluación acorde a las exigencias de la OECD para la evaluación de productos químicos en modelos de epitelios reconstruidos y con ello, se establecen las bases de nuevos métodos alternativos a la experimentación animal en la evaluación de los peligros para la salud humana de productos químicos. Por último, se evalúa la utilidad de los modelos desarrollados para la evaluación de la eficacia de nuevos productos farmacéuticos para el tratamiento de patologías oculares.

The European Union has one of the most extensive safety legislations on products intended for human use. Thus, all products entering the European market must adequately identify and communicate the potential hazards to human health, making it mandatory to assess acute toxicity, corrosion and skin irritation, serious eye damage or eye irritation, respiratory or skin sensitization, mutagenicity in germ cells, specific toxicity in certain organs after single exposure and after prolonged exposure, and the toxicity by aspiration. For skin and eye damage, the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) has implemented the use of the Draize test in Test Guideline (TG) 404. In the Draize test, chemicals are applied directly to the skin, eyes and mucous membranes of experimental animals, thus having the potential to cause great discomfort and pain to the animals, thus having the potential to cause great discomfort and pain to the animals, thus raising great criticism in animal ethics and animal welfare. Because of this, European legislation promotes the development of alternative methods to animal testing with the aim of reducing, replacing and refining the use of animals in research, which has led to the implementation of the TG 431, 439 and 492 as alternative methods for the assessment of skin corrosion and irritation and the assessment of eye damage. The development of alternative methods has been a paradigm-shifting decision in Europe following the implementation of Regulation 1223/2009 which has implemented a ban on the animal testing of cosmetic products, their ingredients and mixtures of ingredients and a ban on the marketing and distribution of any cosmetic products tested on animals, which has been in force since March 2013. Many other countries have followed the lead of the European Union in phasing out animal testing for toxicological testing and recently, the United States Environmental Protection Agency has announced its commitment to eliminate all proposed studies and funding using mammals by 2035.

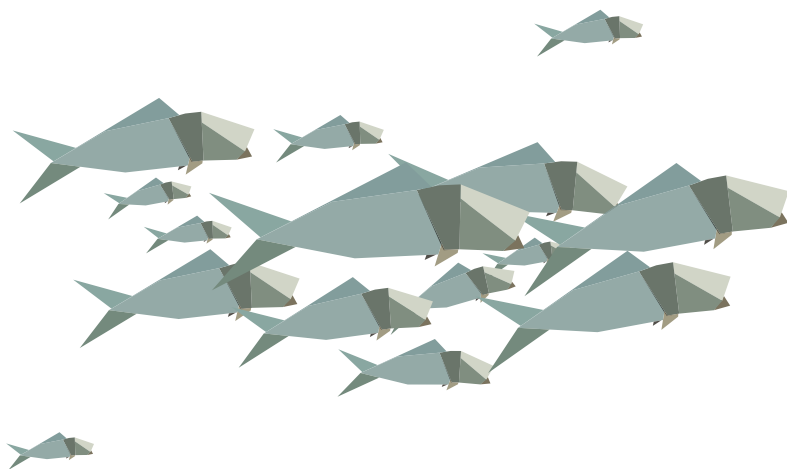
Alternative methods for the assessment of skin corrosion and irritation and severe eye damage or eye irritation include the use of in vitro test based on reconstructed human epithelia that reflect the histological, morphological, biochemical and physiological structure of human upper skin and cornea. The latest version of TGs 431 (skin corrosion), 439 (skin irritation) and 492 (eye irritation) includes 5 commercially available reconstructed epithelia models that

Abstract

have undergone formal validation. This validation is performed by evaluating reference products with known irritant properties and comparing the results obtained with reference data from in vivo studies.

This doctoral thesis develops new in vitro reconstructed tissue models and new evaluation methodologies in line with OECD requirement for the evaluation of chemicals in reconstructed epithelial models and thereby establishes the basis of new alternative methods to animal testing in the evaluation of human health hazards of chemicals.

Motivación, pregunta de investigación y estructura de la tesis



Oryzias latipes

1.914.039 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Desde mi incorporación en el año 2009 al equipo de investigación de la Fundación de Investigación Oftalmológica como técnico de laboratorio con el fin de dar asistencia a los diferentes grupos de investigación, he sido consciente de los grandes retos a los que mis compañeros habían de hacer frente para dar respuesta a las diferentes preguntas que nacen en el ámbito de la investigación biomédica.

Tras tres años dando soporte a los diferentes grupos de investigación, se establece y se me traslada al Grupo de Medicina Regenerativa de la Superficie Ocular, un cambio que para mí supuso una motivación y una oportunidad para desarrollarme como científico. De este modo, en el año 2014 comienzo mi formación universitaria en el Grado en Biología de la Universidad de Oviedo, compaginando mis estudios con mi trabajo como técnico de laboratorio. Tras completar mi formación de Grado, continué mi formación con un Máster en Biomedicina con el objetivo de seguir avanzando en mi formación académica.

El haber podido compaginar mi formación académica con el trabajo práctico en el laboratorio me ha permitido comprender de primera mano la carrera científica, contribuyendo al crecimiento y a la estabilización del Grupo de Medicina Regenerativa de la Superficie Ocular. De este modo, durante los años previos a esta tesis doctoral he podido formar parte de diversos proyectos de investigación, centrando mi experiencia práctica en el desarrollo de estrategias de ingeniería tisular para el tratamiento de diferentes patologías de la superficie ocular.

Con la base de esta experiencia, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿es posible desarrollar de forma estandarizada tejidos epiteliales artificiales que puedan establecerse como una herramienta biomédica para la evaluación toxicológica y farmacológica, representando una alternativa a la experimentación en animales?

La experimentación animal, a pesar de ser una herramienta que ha aportado grandes avances en la medicina, está actualmente limitada en la Unión Europea, no solo por el gran componente ético que supone limitar la vida de seres sintientes a un entorno de laboratorio, sino también porque no representa de

forma fidedigna la respuesta humana. Esto ha podido ser observado a lo largo de los años con la retirada de fármacos, cosméticos y otros consumibles que, después de haber sido sometidos satisfactoriamente a la evaluación toxicológica en modelos animales, han dado finalmente lugar a la aparición de graves efectos adversos en humanos. El desarrollo y utilización de modelos de tejido humano en donde puedan ser evaluados nuevos productos representa, por tanto, el siguiente paso lógico en la evaluación toxicológica.

De este modo, en el año 2016 obtuvimos la primera financiación competitiva de ámbito regional (IDE/2016/000215) para el desarrollo de tejidos artificiales corneales y epidérmicos para su utilización como alternativa a la experimentación animal. Los resultados de este proyecto fueron continuados a través de una segunda financiación competitiva regional (IDE/2018/000415) que exploró la idoneidad del análisis de impedancia a través de la detección mediante espectroscopía de impedancia electroquímica de variaciones en la capacitancia celular en el modelo de epitelio corneal para la evaluación de nuevos medicamentos oftalmológicos. Por último, los estudios de pre-validación del modelo corneal y del modelo epidérmico como sustituto a la experimentación animal para la evaluación de la irritación corneal y cutánea se han desarrollado a través de la obtención de financiación competitiva de ámbito nacional (PID2019-111745RG-I00 y PLEC2022-009463).

El trabajo de investigación de esta tesis doctoral resume, por tanto, más de 7 años de trayectoria científica, englobando el desarrollo y caracterización de un modelo de epitelio corneal artificial y un modelo de epidermis artificial; el desarrollo de nuevos métodos de evaluación de la toxicidad basados en el análisis de la capacitancia; la pre-validación de un método de evaluación de la irritación corneal y cutánea y la aplicación práctica del modelo corneal para la evaluación de la seguridad de nuevos productos oftalmológicos de aplicación tópica. Como se puede intuir, el trabajo recogido en esta tesis doctoral comienza antes de mi periodo oficial de estudios de doctorado, por lo que me gustaría poner en antecedentes al lector, haciendo constar que parte de los resultados incluidos en los capítulos 1 y 2 han sido utilizados como parte de mi Trabajo Fin de Grado y Trabajo Fin de Máster respectivamente.

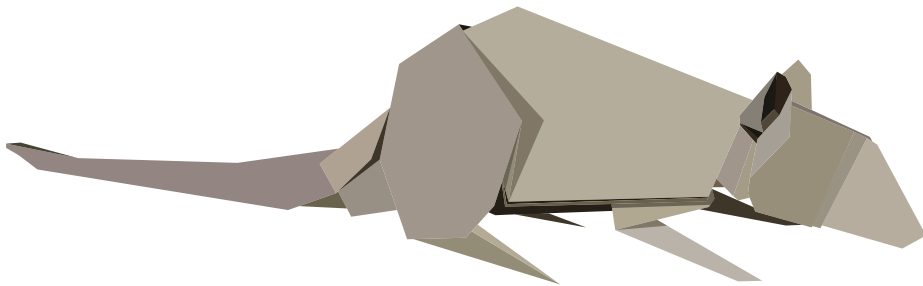
El presente trabajo de investigación se ha desarrollado siguiendo el método científico, y para su mejor comprensión se ha dividido en 3 grandes bloques:

El primer bloque presenta una introducción general sobre el estado actual de la normativa europea con respecto a los ensayos de seguridad, los ensayos en animales y los métodos alternativos. Además, se presenta una descripción de las bases teóricas de la impedancia y su utilidad como método alternativo. Asimismo, en este bloque se plantean la justificación, la hipótesis de trabajo y los objetivos.

El segundo bloque está compuesto por distintos capítulos correspondientes al trabajo experimental de investigación. En los capítulos 1 y 2, se desarrollan y caracterizan los modelos de epitelio corneal y epidermis respectivamente. En los capítulos 3 y 4, se pre-valida la metodología para la evaluación de la irritación corneal y la irritación cutánea respectivamente en base a la normativa vigente. En los capítulos 5 y 6, se desarrolla y evalúa la utilidad de la impedancia como método alternativo a la evaluación de la viabilidad celular para la identificación de compuestos irritantes. Por último, en el capítulo 7, se explora la aplicación del modelo de epitelio corneal para la evaluación de la seguridad y efectividad de nuevos productos oftalmológicos de aplicación tópica.

El tercer y último bloque presenta una discusión general de todos los resultados, se plantea un breve debate sobre el futuro de la investigación en el campo de los tejidos artificiales con fines toxicológicos y se plantean las conclusiones.

Glosario



Rattus norvegicus
665.155 utilizadas con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Capacitancia	Capacidad de un componente o circuito para recoger y almacenar energía en forma de carga eléctrica
Corrosión cutánea	Formación de una lesión irreversible de la piel tras la exposición a una sustancia o mezcla
Daño ocular severo	Lesión de los tejidos oculares que no es totalmente reversible como consecuencia de la exposición del ojo a una sustancia o mezcla
DED (<i>Dry Eye Disease</i>)	Enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por una pérdida de homeostasis de la película lagrimal, acompañada de síntomas oculares, en los que la inestabilidad de la película lagrimal, la hiperosmolaridad, la inflamación, el daño de la superficie ocular y las anomalías neurosensoriales desempeñan papeles etiológicos.
Epitelio reconstruido	Modelo tridimensional de epitelio generado mediante el cultivo <i>in vitro</i> de células sobre un filtro inerte e incubado en interfase aire-líquido
Especificidad	Porcentaje de verdaderos negativos
GHS (<i>Globally Harmonised System</i>)	Iniciativa mundial para promover criterios uniformes para la clasificación y etiquetado de los productos químicos
Impedancia	Medida de oposición a la corriente alterna que presenta el efecto combinado de la resistencia y la reactancia en un circuito
Inductancia	Capacidad de un componente o circuito para recoger y almacenar energía en forma de campo magnético
Irritación cutánea	Formación de una lesión reversible en la piel tras la exposición a una sustancia o mezcla
Irritación ocular	Lesión reversible de los tejidos oculares como consecuencia de la exposición del ojo a una sustancia o mezcla

Método alternativo	Método que puede ser utilizado en investigación para reemplazar los ensayos tradicionales con animales por métodos no invasivos o de sustitución
OD (<i>Optical Density</i>)	Medida de absorbancia definida como la relación entre la intensidad de la luz que incide sobre un material y la intensidad transmitida
Precisión	Porcentaje de compuestos correctamente clasificados frente al total de compuestos evaluados
Pre-validación	Proceso mediante el cual se analiza la fiabilidad y reproducibilidad de un método alternativo para predecir una respuesta <i>in vivo</i>
QileX-RhE	Modelo de epidermis reconstruida desarrollado en la presente tesis doctoral. Su nombre hace referencia a la encina (<i>Quercus ilex</i>)
QobuR-RhCE	Modelo de epitelio corneal reconstruido desarrollado en la presente tesis doctoral. Su nombre hace referencia al roble (<i>Quercus robur</i>)
Rango de aceptabilidad	Intervalo de confianza del 95%
Reactancia	Medida de oposición a la corriente alterna por inductancia o capacitancia
Resistencia	Medida de oposición al flujo de la corriente eléctrica
Sensibilidad	Porcentaje de verdaderos positivos
TEER (<i>Transepithelial Electrical Resistance</i>)	Medida de resistencia eléctrica a través de una capa celular <i>in vitro</i>
Validación	Proceso mediante el cual se verifica el rendimiento, la utilidad y las limitaciones de un ensayo cuando se utiliza en el entorno reglamentario para apoyar la identificación y la evaluación de riesgos

Abreviaturas



Gallus gallus

423.737 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Abreviaturas

A

AC	<i>Alternating Current</i> – Corriente alterna
AUC	<i>Area Under the Curve</i> – Área bajo la curva

C

CASRN	<i>Chemical Abstracts Service Registry Number</i> – Registro numérico de la Chemical Abstracts Service
CLP	<i>Classification, Labelling and Packaging</i> – Clasificación, etiquetado y envasado

D

DC	<i>Direct Current</i> – Corriente continua
DED	<i>Dry Eye Disease</i> – Enfermedad de ojo seco
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> – Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido

E

ECHA	<i>European Chemicals Agency</i> – Agencia europea de sustancias y mezclas químicas
EIS	<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> – Espectroscopía de impedancia electroquímica
EIT	<i>Eye Irritation Test</i> – Test de irritación ocular
EU	<i>European Union</i> – Unión Europea
EURL	<i>European Union Reference Laboratory - European Centre for the</i>
ECVAM	<i>Validación of Alternative Methods</i> – Laboratorio de Referencia de la Unión Europea - Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos

F

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> - Suero bovino fetal
-----	--

G

GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i> – Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
-----	---

Abreviaturas

H

HCE *Human Corneal Epithelium* – Epitelio corneal humano

I

IATA *Integrated Approach on Testing and Assessment* – Métodos integrados de ensayo y evaluación

M

MTT Bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio

O

OD *Optical Density* – Densidad óptica

OECD *Organisation for Economic Co-operation and Development* – Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

P

PBS *Phosphate buffered saline* – Tampón fosfato salino

R

Rcf *Relative centrifugal force* – Fuerza centrífuga relativa

REACH *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* – Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas

RhCE *Reconstructed human Cornea-like Epithelium* – Epitelio humano reconstruido similar a la córnea

RhE *Reconstructed human Epidermis* – Epidermis humana reconstruida

ROC *Receiver Operating Characteristic* – Característica operativa del receptor

S

SDS *Safety Data Sheet* - Ficha de datos de seguridad

SLS *Sodium Lauryl Sulfate* – Laurilsulfato sódico

T

TEER *Transepithelial Electrical Resistance* – Resistencia eléctrica transepitelial

TG	<i>Test Guideline</i> – Guía de ensayo
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> – Marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa

Introducción



Oryctolagus cuniculus
343.521 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

I. El sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (GHS)

La utilización de productos químicos, ya sea en procesos o en productos, que contribuyen a mejorar la calidad de vida de los seres humanos es una práctica extendida en todo el mundo. No obstante, a pesar de que en gran medida la utilización de estos productos puede resultar en un beneficio, su utilización puede conllevar la aparición de efectos adversos no deseados tanto para los seres humanos como para el medio ambiente. Debido a ello, un gran número de países y organizaciones han desarrollado leyes o reglamentos que estipulan el requerimiento de transmitir la información necesaria a los usuarios de productos químicos, bien sea a través de etiquetas o a través de fichas de datos de seguridad (SDS). A pesar de que estas leyes o reglamentos son similares en muchos aspectos entre países, sus diferencias son lo bastante relevantes como para traducirse en etiquetas o SDS diferentes para un mismo producto en función del país de procedencia. Así, un producto puede considerarse inflamable, cancerígeno o irritante en un país, pero no en otro, debido a que las decisiones sobre cuándo y cómo comunicar los peligros mediante etiquetas o SDS varían en función del país[1].

Teniendo en cuenta el comercio mundial de productos químicos y la presencia de programas nacionales que regulan los mecanismos de seguridad para la utilización, transporte y eliminación de sustancias peligrosas, se ha evidenciado la necesidad de un enfoque internacionalmente armonizado de clasificación y etiquetado. Con ello, se dispondría de la información apropiada acerca de los productos químicos importados con el objetivo de establecer con garantías toda la infraestructura necesaria para controlar la exposición a los mismos, independientemente del país de origen y proteger de este modo a las personas y al medio ambiente[1].

De este modo, a raíz de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo celebrada en el año 1992, se aprobó el mandato internacional para el desarrollo de un sistema de esta índole, requiriéndose, dentro de lo posible, la disposición de un sistema de clasificación y etiquetado mundialmente armonizado para el año 2000, focalizándose en tres aspectos

Introducción

técnicos concretos que fueron asignados a distintos comités de expertos. Así, la evaluación de los peligros físicos fue asignada al Subcomité de Expertos en Transporte de Mercancías Peligrosas del Consejo Económico y Social; la evaluación de los peligros sobre la salud y el medio ambiente a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) y la comunicación de los peligros a la Organización Internacional del Trabajo[2].

Con respecto a los peligros sobre la salud y el medio ambiente, el trabajo de la OECD comenzó con el análisis de los sistemas de clasificación vigentes en las distintas legislaciones y con la determinación del alcance de la tarea de armonización. Si bien muchos países ya contaban con legislación específica, se acordó tomar como punto de partida las Directivas de la Unión Europea sobre la clasificación y etiquetado de sustancias y preparados peligrosos con el objetivo de desarrollar un sistema armonizado. Como resultado, a través de la OECD se han publicado distintas Guías de Ensayo (TG) que establecen las bases de los mecanismos de identificación de diferentes peligros, ya sea para la salud humana o para el medio ambiente, los cuales deberán ser adecuadamente etiquetados en una etapa posterior[1].

Las TG de la OECD son, por tanto, una herramienta para la evaluación de los potenciales efectos adversos que los productos químicos pueden generar sobre la salud humana y sobre el medio ambiente, estando clasificados en 5 secciones:

1. Propiedades físico-químicas
2. Efectos sobre sistemas bióticos
3. Comportamiento y destino medioambiental
4. Efectos sobre la salud
5. Otras TG

El trabajo de la OECD, la Organización Internacional del Trabajo y el Subcomité de Expertos en Transporte de Mercancías Peligrosas del Consejo Económico y Social fue agrupado y presentado al Subcomité de Expertos en el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (Subcomité GHS) en el año 2001, siendo este el encargado de promover la aplicación y actualización del GHS desde entonces, proporcionando directrices

y garantizando su estabilidad con el fin de facilitar su adopción. La primera tarea del Subcomité GHS fue conseguir que el GHS estuviera disponible para ser aplicado y utilizado en todo el mundo, aprobándose la primera versión en el año 2002, publicándose por primera vez en el año 2003 y siendo actualizada cada dos años desde entonces[1].

En el GHS se establecen, por tanto, unos criterios armonizados para la clasificación de sustancias y mezclas en base a sus peligros físicos, ambientales y para la salud humana, así como se establecen los elementos armonizados de comunicación de dichos peligros en lo relativo a etiquetas y SDS. Sin embargo, el GHS es únicamente un mecanismo para el cumplimiento de los requerimientos básicos para la identificación de los peligros de un producto químico y la preparación del etiquetado y/o las SDS. De este modo, los países y organizaciones que deseen adoptar el GHS deberán seleccionar los criterios y las provisiones que deseen e implementarlos a través de su propia legislación y reglamentación. Por tanto, el GHS representa las bases de un acuerdo voluntario internacional limitado a proveer a los países y organizaciones de los recursos para el desarrollo uniforme de políticas nacionales, pudiendo acomodar cualquier requisito adicional que resulte conveniente.

Hoy, un gran número de países han implementado el GHS como su sistema principal de identificación y comunicación de peligros (Figura 1). Sin embargo, dada la libertad de elección de los recursos específicos a implementar por parte de los distintos países y organizaciones, a medida que nuevos países y organizaciones adoptan el GHS, surgen diferencias de enfoque que resultan en pequeñas desviaciones dentro de un sistema aparentemente armonizado. A pesar de ello, la implementación del GHS ha resultado un gran paso en la estandarización de procedimientos a nivel global, esperándose que las potencias tractoras consigan armonizar las pequeñas diferencias con el paso del tiempo.

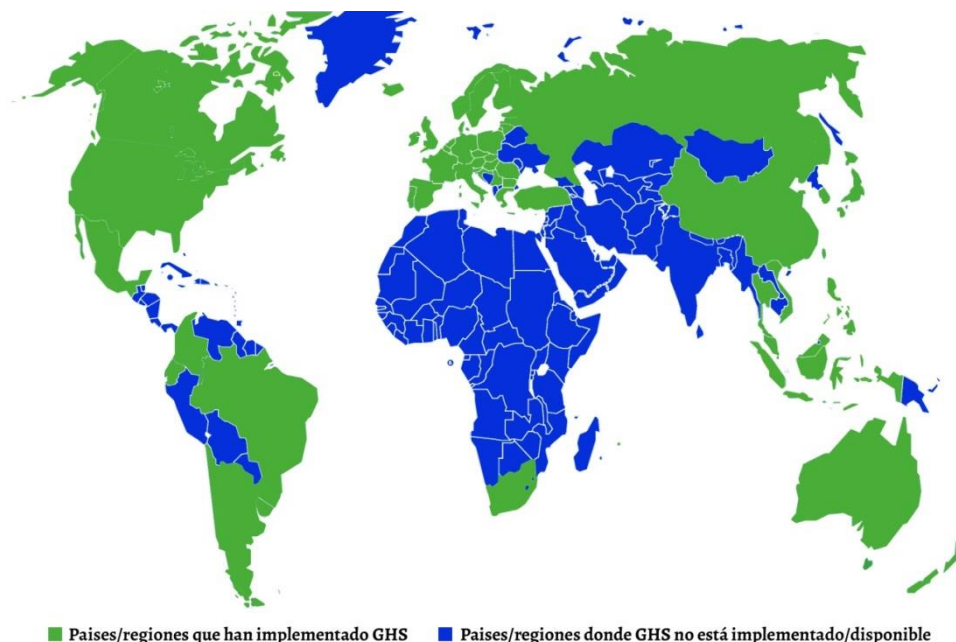


Figura 1: Mapa mundial de implementación del GHS. Actualizado a fecha: 02.09.2021.
Fuente original: <http://ghs.dhigroup.com/GHSImplementationMap.aspx>

a. *Implementación del GHS en la Unión Europea*

La implementación del GHS en la Unión Europea (EU) se hace efectivo en el año 2009 mediante el Reglamento sobre Clasificación, Etiquetado y Envasado de sustancias y mezclas (CLP)[3]. El Reglamento CLP surge de manera complementaria al Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las Sustancias y Preparados Químicos (REACH); un Reglamento adoptado con el fin de mejorar la protección de la salud humana y el medio ambiente a través de una mejor y más temprana identificación de las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas. Esta identificación es realizada a través de los 4 procesos que regula REACH: el registro, la evaluación, la autorización y la restricción de productos químicos[4].

El Reglamento REACH entra en vigor en el año 2007, siendo sus disposiciones implementadas a través de diferentes fases a lo largo de 11 años debido a que, aunque REACH es aplicable principalmente a la industria química, es un Reglamento transversal que de un modo u otro aplica a toda la industria

europea. Esto hace que el Reglamento REACH sea considerado como la legislación más compleja de la historia de la EU y la más importante en los últimos 20 años.

El desarrollo e implementación de REACH estuvo motivado por el hecho de que, a pesar del gran número de sustancias manufacturadas y presentes en el mercado europeo, la información relativa a los peligros que estos productos suponían para la salud humana o para el medio ambiente se hacía insuficiente. Por tanto, REACH surge con el objetivo de subsanar las carencias existentes en la industria para la identificación de los riesgos de sus productos e identificar e implementar medidas de gestión de riesgos para proteger a los seres humanos y al medio ambiente.

De este modo, tanto el Reglamento REACH como el Reglamento CLP establecen los requisitos de producción y uso de sustancias químicas; sin embargo, ambas son piezas independientes de la legislación química europea. Por un lado, REACH establece la obligatoriedad de clasificación de las sustancias químicas, mientras que CLP se encarga de recoger los criterios para su clasificación y etiquetado. El Reglamento CLP incorpora los criterios y las reglas de etiquetado del GHS para la identificación y comunicación de los peligros con el fin de comunicarlos de manera adecuada. De este modo, uno de los principios del Reglamento CLP es proporcionar las herramientas para la auto-clasificación de una sustancia o mezcla por parte de los fabricantes, importadores o usuarios intermedios; los cuales deben proveer a la Agencia Europea de Sustancias y Preparados (ECHA) la información relativa a la seguridad y gestión de riesgos de cualquier sustancia que fabriquen o comercialicen dentro de la EU.

En lo relativo a los peligros para la salud humana, en el Reglamento CLP se recoge la obligatoriedad de evaluar la toxicidad aguda, la corrosión o irritación cutánea, las lesiones oculares graves o irritación ocular, la sensibilización respiratoria o cutánea, la mutagenicidad en células germinales, la carcinogenicidad, la toxicidad para la reproducción, la toxicidad específica en determinados órganos tras exposición única y tras exposiciones repetidas y la evaluación del peligro por aspiración como requisitos mínimos de evaluación de una sustancia o mezcla, quedando recogidas las metodologías de ensayo aceptadas dentro de los criterios de REACH en el Reglamento 440/2008[5].

Introducción

Todas las sustancias y mezclas presentes en el mercado europeo, y que entren en el ámbito de aplicación de CLP, deben ser evaluadas con el objetivo de establecer una decisión sobre los diferentes criterios y establecer por tanto las necesidades de clasificación y etiquetado. De igual modo, las sustancias que no se encuentren en el mercado deberán ser clasificadas siempre y cuando estén sujetas a registro o notificación bajo REACH. No obstante, el Reglamento CLP no resulta de aplicación en un gran número de sustancias o mezclas en su fase de producto terminado, al existir normas específicas de etiquetado en la legislación comunitaria, o bien están excluidas del ámbito de aplicación de CLP (Tabla 1)[3].

Tabla 1: Ámbito de aplicación del Reglamento CLP

Sustancias excluidas del ámbito de aplicación de CLP

- Las sustancias y mezclas radiactivas
- Las sustancias y mezclas sometidas a supervisión aduanera, siempre que no sean objeto de ningún tipo de tratamiento o transformación, y que estén en depósito temporal o en una zona franca o en un depósito franco con el fin de volverse a exportar o en tránsito
- Las sustancias intermedias no aisladas
- Las sustancias y mezclas destinadas a la investigación y el desarrollo científicos, no comercializadas, siempre que se usen en condiciones controladas de conformidad con la legislación comunitaria sobre el lugar de trabajo y el medio ambiente
- Los residuos, tal y como se definen en la Directiva 2006/12/CE

Sustancias y mezclas en fase de producto terminado y destinado al usuario final donde el Reglamento CLP no es de aplicación al existir normas específicas de etiquetado

- Los medicamentos, tal como se definen en la Directiva 2001/83/CE
 - Los medicamentos veterinarios, tal y como se definen en la Directiva 2001/82/CE
 - Los productos cosméticos, tal como se definen en la Directiva 76/768/CEE
 - Los productos sanitarios, tal como se definen en las Directivas 90/385/CEE y 93/42/CEE, que sean invasivos o se apliquen en contacto directo con el cuerpo humano, y en la Directiva 98/79/CE
 - Los alimentos o piensos, tal y como se definen en el Reglamento (CE) N° 178/2002, incluyendo cuando son utilizados como aditivos dentro del ámbito de aplicación de la Directiva 89/107/CEE; como aromatizantes en los productos alimenticios dentro del ámbito de aplicación de la Directiva 88/388/CEE y de la Decisión 1999/217/CE; como aditivos en los piensos dentro del ámbito de aplicación del Reglamento (CE) N° 1831/2003; y cuando son utilizados en la alimentación animal dentro del ámbito de aplicación de la Directiva 82/471/CEE
-

CLP: Clasificación, Etiquetado y Envasado

b. Irritación/corrosión cutánea e irritación ocular/daño ocular severo



I. Definición y reglas de etiquetado

Dentro de las disposiciones de CLP, se establece la obligatoriedad de identificar aquellas sustancias y mezclas que puedan causar irritación/corrosión cutánea (Tabla 2) y/o irritación ocular/daño ocular severo (Tabla 3).

La corrosión cutánea se define como la generación de daños irreversibles para la piel; generalmente, necrosis visible a través de la epidermis y hacia la dermis tras la aplicación de una sustancia o mezcla durante un máximo de 4 horas. Las reacciones corrosivas son comúnmente tipificadas por úlceras, sangrado, costras sangrantes, y decoloración debido al escaldado de la piel, áreas de completa alopecia y cicatrices.

La irritación cutánea, por el contrario, se define por la producción de daños reversibles a la piel siguiendo la aplicación de una sustancia o mezcla durante un máximo de 4 horas.

Tabla 2: Elementos de etiquetado para la corrosión/irritación cutánea

Clasificación	Categoría 1 y Sub-Categorías 1A / 1B / 1C	Categoría 2
Pictogramas GHS		
Palabra clave	Peligro	Advertencia
Declaración de peligro	H314: Causa quemaduras cutáneas graves y daño ocular severo	H315: Causa irritación cutánea
Declaración de precaución	P260 P264 P280	P264 P280
Declaración de precaución	P301 + P330 + P331 P303 + P361 + P353 P363 P304 + P340 P310 P321 P305 + P351 + P338	P302 + P352 P321 P332 + P313 P362 + P364
Declaración de precaución	P405	-
Declaración de precaución	P501	-



Introducción

Si una sustancia o mezcla es clasificada como corrosiva para la piel (Categoría 1), el daño ocular severo se considera implícito y viene reflejado en la declaración de peligro para la corrosión cutánea (H314: Causa quemaduras cutáneas graves y daño ocular severo). Por tanto, en las sustancias o mezclas corrosivas para la piel no se indica expresamente la correspondiente advertencia indicativa de daño ocular (H318: Causa lesiones oculares graves) con el fin de evitar redundancias.

El daño ocular grave se define como la generación de lesiones oculares o el detrimento significativo de la visión tras la aplicación de una sustancia o mezcla sobre la superficie anterior del ojo y que no se revierte tras 21 días desde la aplicación.

Por contra, la irritación ocular se define como la generación de cambios en el ojo tras la aplicación de una sustancia o mezcla sobre la superficie anterior del ojo, los cuales son reversibles tras 21 días desde la aplicación.

Tabla 3: Elementos de etiquetado para el daño ocular severo/irritación ocular

Clasificación	Categoría 1	Categoría 2
Pictogramas GHS		
Palabra clave	Peligro	Advertencia
Declaración de peligro	H318: Causa daño ocular severo	H319: Causa irritación ocular
Declaración de precaución		
Prevenición	P280	P264 P280
Declaración de precaución	P310	P305 + P351 + P338
Respuesta	P305 + P351 + P338	P337 + P313
Declaración de precaución		
Almacenaje	-	-
Declaración de precaución		
Eliminación	-	-

II. Evaluación de la irritación/corrosión cutánea e irritación ocular/daño ocular severo

En base al Reglamento 440/2008, que recoge los métodos de ensayo acordes a REACH, la evaluación de la irritación y corrosión cutánea se realizará de manera equivalente al método TG 404 de la OECD[5] y la evaluación de la

irritación ocular/daño ocular severo se realizará de manera equivalente a la TG 405 de la OECD[6].

El test descrito en la TG 404 para la evaluación de la irritación/corrosión cutánea está basado en la aplicación de una única dosis a la piel de un animal de experimentación; sirviendo las áreas de piel sin tratar como control[7]. El grado de irritación/corrosión es evaluado y puntuado en intervalos específicos, siendo descrito con el objetivo de proveer una evaluación completa de los efectos adversos. La duración del estudio deberá ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados. Asimismo, los animales que muestren continuos signos de angustia y/o dolor graves en cualquier etapa durante la evaluación deberán ser humanamente sacrificados, y la sustancia o mezcla evaluada será clasificada acorde[7].

En la TG 404, se hace referencia al Documento de guía N° 203 sobre los métodos integrados de ensayo y evaluación (IATA) para la irritación/corrosión cutánea[8], proponiendo una aproximación modular para la evaluación de la irritación y la corrosión cutánea. El IATA describe una serie de módulos que agrupa diferentes fuentes de información y herramientas de análisis, proporcionando una guía basada en la integración y utilización de los datos existentes procedentes de ensayos y no-ensayos para la evaluación del potencial irritante o corrosivo de una sustancia o mezcla para la piel y la propuesta de nuevos enfoques cuando es necesario realizar más ensayos[8]. De este modo, el Reglamento 440/2008 refleja la recomendación de evaluar la información existente sobre el potencial de irritación/corrosión cutánea y seguir una estrategia de evaluación secuencial, reduciendo al mínimo la necesidad de realizar ensayos *in vivo*, especialmente si es probable que la sustancia produzca reacciones graves. Los factores a tener en cuenta para una adecuada estrategia de evaluación son:

- PASO 1: Evaluación de datos existentes en seres humanos y en animales
- PASO 2: Análisis de las relaciones entre las estructuras químicas
- PASO 3: Propiedades fisicoquímicas y reactividad química
- PASO 4: Toxicidad cutánea
- PASO 5 y 6: Resultados de los ensayos *in vitro* o *ex vivo*

Introducción

- PASO 7 y 8: Ensayo *in vivo* en conejos

De este modo, el Reglamento 440/2008 recomienda la realización de pruebas *in vitro* validadas y aceptadas antes de realizar un ensayo de irritación/corrosión cutánea. Asimismo, se recomienda la aplicación sucesiva, no simultánea, de tres aplicaciones de ensayo a los animales en el ensayo *in vivo* inicial con el objetivo de reducir el número de animales utilizados.

Por otro lado, el test descrito en la TG 405 para la evaluación de la irritación/daño ocular severo está basado en la aplicación de una dosis única sobre uno de los ojos de un animal de experimentación, habiendo previamente realizado un pre-tratamiento con analgésico sistémico y anestesia tópica; actuando el ojo contralateral sano como control[6]. El grado de irritación/daño ocular severo es evaluado mediante la puntuación de las lesiones sobre la conjuntiva, la córnea y el iris a intervalos de tiempo determinados. Otros efectos sobre el ojo y sus anejos, así como efectos sistémicos, son adicionalmente descritos con el objetivo de proveer una evaluación completa de los efectos. De nuevo, la duración del estudio deberá ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos[6].

Asimismo, en la TG 405 se hace referencia al Documento de guía N° 263 sobre los métodos IATA para la irritación ocular y el daño ocular severo[9]. De este modo, si los datos disponibles son insuficientes para clasificar una sustancia o mezcla, se recomienda la realización de nuevos ensayos de manera secuencial, tal que:

- PASO 1: Evaluación de datos existentes en seres humanos y en animales
- PASO 2: Análisis de las relaciones entre las estructuras químicas
- PASO 3: Propiedades fisicoquímicas y reactividad química
- PASO 4: Consideración de otras informaciones existentes
- PASO 5 y 6: Resultados de los ensayos *in vitro* o *ex vivo*
- PASO 7: Evaluación del poder irritativo cutáneo *in vivo* de la sustancia
- PASO 8: Ensayo *in vivo* en conejos

De este modo, el Reglamento 440/2008 recomienda evaluar la información existente sobre el potencial de irritación ocular/daño ocular severo y seguir una estrategia de evaluación secuencial recomendando la utilización de ensayos *in vitro* validados y aceptados y la realización de ensayos de irritación/corrosión cutánea *in vivo* para predecir el daño ocular severo antes de realizar un ensayo ocular *in vivo*.

En cualquier caso, el Reglamento 440/2008 establece que en favor de la ciencia y del bienestar animal, no se realizarán pruebas *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos relevantes sobre el potencial de irritación/corrosión cutánea e irritación ocular/daño ocular severo incluyendo los datos obtenidos en estudios existentes realizados con seres humanos o animales de laboratorio, los demostrativos de corrosión/irritación por parte de una más sustancias relacionadas estructuralmente o por una mezcla de las mismas, los que demuestren la elevada acidez o alcalinidad de la sustancia y los obtenidos en pruebas *in vitro* o *ex vivo* validadas y aceptadas[5].

c. Reglamento 1223/2009 y prohibición de la experimentación animal

Tal y como se indica en la Tabla 1, los productos cosméticos, entendiéndose como producto cosmético toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales de cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales; están exentos de cumplir el Reglamento CLP al existir una norma específica que los regulaba, la Directiva 76/768/CEE.

La Directiva 76/768/CEE fue derogada en el año 2009 por el Reglamento 1223/2009, en el que se establecen las normas que deben cumplir todos los productos cosméticos comercializados, con el objetivo de velar por el correcto funcionamiento del mercado interior europeo y lograr un elevado nivel de protección de la salud humana[10]. La derogación de la Directiva 76/768 en favor del Reglamento 1223/2009 surge como respuesta al movimiento iniciado por toda Europa en favor de la protección de los animales utilizados para la evaluación de la toxicidad de los productos cosméticos. Durante los años '80 y '90, el incremento

Introducción

de la conciencia popular sobre el uso de animales para estudios toxicológicos en productos cosméticos llevó a la incorporación de la prohibición de la experimentación animal a la Directiva 76/768 en el año 1993[11]. No obstante, en vista de que esta modificación en la Directiva 76/768 implicaba un gran cambio en la política empresarial de gran parte de la industria cosmética, se estableció un marco de implementación de 5 años, estableciendo la prohibición a partir del 1 de enero de 1998. Sin embargo, la falta de métodos alternativos científicamente validados pospuso la fecha de prohibición inicial hasta el año 2000 y posteriormente hasta el año 2002, no siendo finalmente efectiva la prohibición de evaluación de productos cosméticos terminados hasta el año 2004[12]. A pesar de ello, la completa prohibición del uso de animales no se completa hasta el año 2009 cuando se establece la prohibición adicional de evaluación de los ingredientes, así como el marketing, la importación y la venta de productos cosméticos que hubieran sido evaluados en animales, salvo para la evaluación de la toxicidad por dosis repetida, la toxicidad reproductiva y la toxicocinética[10], para las cuales se recoge el plazo final para su prohibición en el Reglamento 1223/2009, estableciéndose la fecha de prohibición para dichos ensayos en el 11 de marzo de 2013, a pesar de la ausencia de métodos alternativos a la experimentación animal (Figura 2).

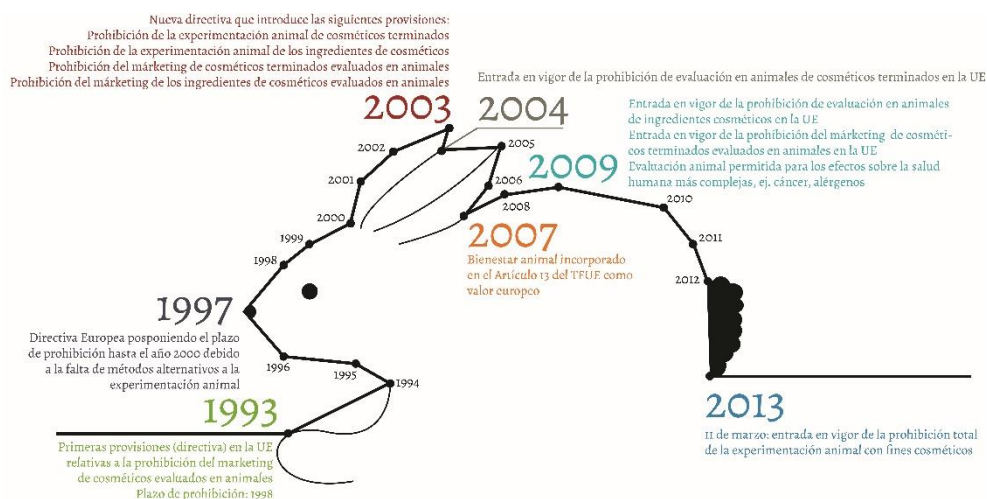


Figura 2: Historia de la prohibición de la experimentación animal para productos cosméticos en Europa

La implementación de la Regulación 1223/2009 ha revolucionado a la industria cosmética europea, convirtiéndola en el motor de cambio hacia métodos alternativos en el campo de la evaluación de los efectos adversos para la salud humana. Hoy en día, la industria cosmética reformula entre el 25% y el 30% de su portafolio cada año, siendo aproximadamente el 10% de las reformulaciones dependientes de nuevos ingredientes[13]. Eso hace que cada nuevo ingrediente que vaya a ser incluido en los productos cosméticos tenga que ser evaluado utilizando métodos alternativos a la experimentación animal con el objetivo de determinar, entre otros, los riesgos de irritación cutánea e irritación ocular, sobre todo en aquellos productos basados en química reactiva como tintes, conservantes o filtros solares.

En conjunto con la prohibición de la experimentación animal, la EU ha implementado uno de los más altos estándares a nivel mundial de bienestar animal para animales destinados a fines de investigación a través de la Directiva 2010/63/EU, la cual se articula en torno al principio de las Tres Rs: reemplazar, reducir y refinar el uso de animales[14]. Este principio afecta a cualquier legislación europea que contemple el uso de animales, siendo el fin último el reemplazo total de los procedimientos experimentales realizados en animales. Actualmente, si una metodología o estrategia de evaluación no emplea animales, y está reconocida bajo la legislación europea como disponible para obtener los resultados buscados en un estudio, deberá ser utilizada en lugar del procedimiento en animales[14].

Para fomentar el cumplimiento del principio de las Tres Rs, la EU debe fomentar activamente el desarrollo, validación e implementación de métodos alternativos capaces de reducir, refinar y reemplazar el uso de animales de experimentación. Esta tarea la lleva a cabo a través del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea - Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (EURL ECVAM), cuyas tareas principales son la financiación y gestión de estudios de validación y el apoyo a otros servicios de la EU en cuestiones relacionadas con las alternativas a los ensayos con animales[15]. Para ello, el EURL ECVAM ofrece su experiencia y asesoramiento, compartiendo las mejores prácticas para la caracterización y normalización de nuevos métodos. El objetivo general de la

Introducción

EURL ECVAM es, por tanto, la búsqueda activa de metodologías de ensayo prometedoras que reemplacen, reduzcan o refinen el uso de animales de laboratorio, así como facilitar su avance hacia la aplicación práctica y aceptación regulatoria. De este modo, los métodos desarrollados por los laboratorios de investigación son presentados ante la EURL ECVAM, cuya evaluación de solidez, fiabilidad y capacidad predictiva está basada en la revisión independiente de los informes de resultados de los estudios de validación[16].

d. Alternativas al uso de animales

I. Evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo

Actualmente, diferentes metodologías (Tabla 4) han sido validadas para la identificación de productos químicos que inducen daño ocular severo (Categoría 1) o para la identificación de productos químicos que no requieren etiquetado para irritación ocular/daño ocular severo (Sin Categoría), estando su utilización, en algunos casos, aprobada como TG por la OECD.

Tabla 4: Métodos validados para la identificación de la irritación ocular/daño ocular severo

Método de ensayo	OECD TG
Métodos <i>ex vivo</i>	
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay	TG 437
Isolated Chicken Eye (ICE) assay	TG 438
Isolated Rabbit Eye (IRE) assay	-
Hen's Egg Test on the Chorionallantoic Membrane (HET-CAM) assay	-
Ex-vivo Eye Irritation Test (EVEIT)	-
Porcine Cornea Ocular Reversibility Assay (PorCORA)	-
Métodos <i>in chemico</i>	
Ocular Irritation [®] assay	TG 496
OptiSafe [™] assay	-
Métodos <i>in vitro</i>	
Short Time Exposure (STE) assay	TG 491
Fluorescein Leakage (FL) assay	TG 460
Cytosensor Microphysiometer (CM) assay	-
Neutral Red Release (NRR) assay	-
Métodos basados en epitelios humanos reconstruidos <i>in vitro</i>	
EpiOcular [™] EIT	TG 492
SkinEthic [™] HCE EIT	TG 492
LabCyte Cornea-Model24 EIT	TG 492
MCTT HCE [™] EIT	TG 492
Vitrigel [®] - EIT Method	TG 494
EpiOcular [™] ET-50 - EIT Method	-
SkinEthic [™] HCE Time To Toxicity	-
EyeIRR-IS assay	-

EIT: Eye Irritation Test; HCE: Human Corneal Epithelium

La principal limitación que surge con la utilización de un único método alternativo para reemplazar el test *in vivo* (TG 405) es la predicción de los compuestos que causan irritación ocular (Categoría 2), recomendándose el uso de IATA para generar evidencias que puedan resultar en la apropiada clasificación de un compuesto[17]. Actualmente, se encuentra bajo discusión la aprobación de métodos definidos para la evaluación de líquidos no surfactantes, resultando en una estrategia de interpretación de datos a partir de ensayos *ex vivo* e *in vitro* para la identificación y discriminación entre las tres categorías GHS: Categoría 1: daño ocular severo; Categoría 2: irritación ocular y Sin Categoría para productos químicos que no requieren clasificación ni etiquetado para la irritación ocular o el daño ocular severo[17]. Adicionalmente, se encuentra validado por L'Oreal (Clichy, Francia) el método SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Time To Toxicity[18], habiendo sido evaluado de forma independiente y estando bajo consideración por la OECD para la identificación de compuestos GHS Categoría 1, Categoría 2 y Sin Categoría[19]. Por otro lado, el método EyeIRR-IS desarrollado por ImmunoSearch (Grasse, Francia) está propuesto para la identificación de los compuestos GHS Categoría 1, Categoría 2 y Sin Categoría utilizando una aproximación genómica mediante el análisis de la expresión de 10 biomarcadores por RT-PCR empleando el modelo SkinEthic™ HCE[20].

Estas metodologías hacen uso de modelos de epitelio humano reconstruido similar a la córnea (RhCE), los cuales se asemejan histológica, morfológica, bioquímica y fisiológicamente a un epitelio corneal humano. Hasta la fecha, 1 metodología basada en el uso de RhCE se incluye en la TG 494 para la identificación de compuestos que no requieren clasificación ni etiquetado[21]. Por otro lado, 4 metodologías basadas en modelos RhCE comercialmente disponibles se incluyen en la TG 492 para la identificación de compuestos que no requieren clasificación ni etiquetado[22]. Dentro de la TG 492 se incluyen los métodos EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT), SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT y MCTT HCE™ EIT, siendo todos ellos recomendados como científicamente válidos para la identificación de compuestos que no requieren clasificación ni etiquetado en base a sus estudios de validación y revisión independiente[23–26]. Estos métodos RhCE utilizan queratinocitos epidérmicos humanos en el caso del modelo EpiOcular™, células corneales inmortalizadas en

Introducción

el caso del modelo SkinEthic™ HCE y células corneales humanas normales en el caso de los modelos LabCyte CORNEA-MODEL24 y MCTT HCE™, habiendo sido todos ellos cultivados hasta formar una estructura altamente diferenciada que se asemeja a un epitelio corneal humano, constando con al menos tres capas celulares los modelos EpiOcular™, Labcyte CORNEA-MODEL24 y MCTT HCE™ y con al menos cuatro capas celulares el modelo SkinEthic™ HCE[22]. La evaluación del potencial peligro ocular de un producto químico de los métodos incluidos en la TG 492 está basada en la capacidad de inducir citotoxicidad en los RhCE, siendo evaluados mediante ensayos basados en la reducción de sales de tetrazolio. De este modo, la viabilidad de los RhCE tras la exposición a un producto químico se determina mediante su comparación con RhCE expuestos a una sustancia que actúa como control negativo, utilizando el valor de viabilidad relativa para predecir el potencial peligro ocular del producto evaluado[22].

Con el objetivo de facilitar la validación de nuevos métodos basados en RhCE similares a EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT y MCTT HCE™ EIT, se encuentran disponibles estándares de desempeño[27] acordes a los principios de validación y aceptación internacional de nuevos métodos para la evaluación de peligros[28], permitiendo la inclusión de nuevos métodos mediante las modificaciones que sean oportunas sobre la TG 492.

II. Evaluación de la irritación/corrosión cutánea

Hoy, diversas metodologías (Tabla 5) han sido validadas y aprobadas por la OECD como TG para la evaluación de la irritación (Categoría 2) y corrosión cutánea (Categoría 1).

Tabla 5: Métodos validados para la evaluación de la irritación/corrosión cutánea

Método de ensayo	OECD TG
Irritación cutánea	
Métodos basados en epitelios humanos reconstruidos <i>in vitro</i>	
EpiSkin™	TG 439
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	TG 439
SkinEthic™ RhE	TG 439
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	TG 439
epiCS®	TG 439
Skin+®	TG 439
KeraSkin™ SIT	TG 439

Método de ensayo	OECD TG
Corrosión cutánea	
Métodos basados en epitelios humanos reconstruidos <i>in vitro</i>	
<i>EpiSkin</i> TM	TG 431
<i>EpiDerm</i> TM SCT	TG 431
<i>SkinEthic</i> TM RHE	TG 431
<i>epiCS</i> [®]	TG 431
<i>LabCyte EPI-MODEL24</i> SCT	TG 431
Métodos <i>ex vivo</i>	
<i>Transcutaneous Electrical Resistance Test Method</i>	TG 430
Métodos <i>in vitro</i>	
<i>In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion</i>	TG 435

SIT: Skin Irritation Test; RhE: Reconstructed human Epidermis; SCT: Skin Corrosion Test

En el caso de la evaluación de la corrosión cutánea se han validado tres métodos, los cuales han sido adoptados como TG por parte de la OECD. En el caso de la irritación cutánea, la única metodología actualmente disponible como alternativa a la experimentación animal está basada en la utilización de métodos de epidermis humana reconstruida (RhE), los cuales reproducen las propiedades bioquímicas y fisiológicas de la parte superior de la piel humana; la epidermis. Todos los métodos RhE utilizan queratinocitos humanos no transformados como fuente celular para la generación de los modelos celulares, mostrando una histología y citoarquitectura representativa de la epidermis. Hasta la fecha, 7 métodos basados en RhE se incluyen en la TG 439: *EpiSkin*TM; *EpiDerm* Skin Irritation Test (SIT) (EPI-200); *SkinEthic*TM RhE; *LabCyte EPI-MODEL24* SIT; *epiCS*[®]; *Skin+*[®] y *KeraSkin*TM SIT[29]. No obstante, al igual que en el caso de los métodos basados en RhCE para la evaluación del daño ocular, se encuentran disponibles estándares de desempeño acordes a los principios de validación y aceptación internacional de nuevos métodos para la evaluación de peligros con el objetivo de facilitar la validación y evaluación de nuevos métodos de ensayo basados en métodos RhE[30].

La utilización de métodos RhE para la evaluación de la irritación/corrosión cutánea están basados nuevamente en la evaluación de la viabilidad celular a través de la conversión enzimática de sales de tetrazolio. La premisa de los métodos de evaluación se basa en que la penetración de los productos químicos a través del estrato córneo, por difusión o erosión, producen daños citotóxicos en las células de los estratos inferiores, relacionándose de este modo de manera directa con los procesos de corrosión cutánea[31]. Por otro lado,

la relación con la irritación cutánea se basa en la premisa de que la destrucción celular puede secretar mediadores pro-inflamatorios o inducir la cascada inflamatoria en las células de la dermis, fundamentalmente en las células del estroma y las células endoteliales de los vasos sanguíneos. De este modo, los métodos RhE, en ausencia de vascularización, evaluarían el evento inicial que desencadenaría el proceso de irritación, la muerte celular[29].

II. La impedancia

a. *Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)*

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es un término que engloba la evaluación de una pequeña señal de la respuesta eléctrica lineal de un material de interés y el posterior análisis de su respuesta para obtener información útil sobre las propiedades fisicoquímicas del sistema.

Desde su introducción conceptual a finales del siglo XIX, la espectroscopía de impedancia ha sufrido una enorme evolución hacia una ciencia multidisciplinar. En los últimos años, la EIS se ha establecido como una de las técnicas analíticas más populares en la investigación de materiales, siendo utilizada en un gran número de áreas de investigación y análisis de materiales como estudios de corrosión y control de corrosión[32]; monitorización de las propiedades iónicas de polímeros, coloides y recubrimientos conductores[33]; análisis de almacenamiento energético y baterías[34]; análisis biológicos y desarrollo de sensores biomédicos[35]; análisis de semiconductores y electrolitos en estado sólido[36] o estudios de cinéticas, reacciones y procesos electroquímicos[37].

En un sentido amplio, la EIS es una técnica extraordinariamente versátil, sensible e informativa que es aplicable a un gran número de estudios de cinéticas electroquímicas. Los análisis de impedancia se basan fundamentalmente en un relativamente simple análisis eléctrico que puede ser automatizado y controlado de forma remota. Al contrario que otras técnicas electroquímicas, la EIS es una técnica no invasiva que puede ser correlacionada con numerosas variables químicas, físicas, mecánicas y eléctricas. En los últimos años, debido a la evolución de los equipos automáticos de impedancia que cubren un gran número

de frecuencias y potenciales, los estudios de EIS se están popularizando cada vez más a medida que más y más científicos comprenden las bases teóricas de la espectroscopía de impedancia y adquieren competencias en la interpretación de datos de impedancia[38].

Sin embargo, la utilización generalizada de la EIS se ve obstaculizada por la falta de explicaciones fácilmente comprensibles y cohesivas de los procesos teóricos y la variabilidad en los tipos de datos adquiridos sobre los diferentes sistemas evaluados, sumado a que las revisiones bibliográficas relativas a la EIS son generalmente difíciles de interpretar por un público no especialista. Estas debilidades se ven amplificadas al considerar la gran variedad de aplicaciones prácticas de la impedancia, en donde además, es el investigador el que debe valorar si tanto las descripciones de respuesta a la impedancia existentes como su interpretación son remotamente aplicables a su investigación[38].

b. Definición de impedancia

La impedancia (Z) puede ser definida como la oposición a la corriente alterna (AC) que surge como efecto combinado de la resistencia (por la presencia de resistores) y la reactancia (por la presencia de condensadores y/o inductores) en un circuito eléctrico.

A nivel cuantitativo, la impedancia (Z) de un circuito es la relación entre la representación compleja del voltaje y la representación compleja de la intensidad que fluye a través de él, siendo generalmente su valor dependiente de la frecuencia (ω) del voltaje:

$$Z = \frac{V}{I}$$

Para entender la impedancia de un objeto electroquímico, es necesario entender primero el comportamiento de circuitos eléctricos simples, los cuales se representan mediante un conjunto de elementos eléctricos lineales simples: resistores, condensadores e inductores. El concepto de impedancia hace referencia, por tanto, a la oposición al paso de AC por cada uno de dichos componentes.

I. Resistores, condensadores e inductores

Un resistor es un elemento puramente disipativo, es decir, la energía eléctrica que absorbe es instantáneamente disipada. Un resistor obedece la Ley de Ohm, siendo su relación con el voltaje:

$$V(t) = RI(t)$$

Donde R es el valor de resistencia del elemento resistor y su valor se encuentra expresado en ohmios (Ω).

Por el contrario, un condensador es un elemento con capacidad de acumular carga eléctrica, siendo dicha capacidad diferente para cada valor de voltaje aplicado. Su relación fundamental con el voltaje es:

$$V(t) = \frac{1}{C} \int_0^t I(t) dt$$

Siendo C el valor de capacitancia del elemento condensador y estando su valor expresado en faradios (F).

Por último, los inductores son elementos que producen una fuerza electromotriz que se opone al cambio de intensidad, siendo su relación con el voltaje:

$$V(t) = L \frac{dI(t)}{dt}$$

Siendo L el valor de inductancia del elemento inductor y estando su valor expresado en henrios (H).

II. Representación de un circuito eléctrico

Cuando nos encontramos con un circuito con conexiones en serie de resistores, condensadores e inductores, las relaciones entre el voltaje y la intensidad se representan como la suma de las relaciones de cada elemento:

$$V(t) = RI(t) + \frac{1}{C} \int_0^t I(t) dt + L \frac{dI(t)}{dt}$$

Si, por lo tanto, queremos obtener el valor de la impedancia del circuito a una determinada frecuencia (ω), debemos conocer la señal sinusoidal de voltaje $V(t)$ y cuantificar la señal sinusoidal de intensidad $I(t)$ o viceversa. Sin embargo, para determinar la contribución individual de cada elemento del circuito a la impedancia total, es necesario conocer tanto la resistencia como la reactancia de cada elemento. La reactancia es la medida de oposición que un elemento ofrece al paso de una corriente alterna y está relacionada con la capacidad del elemento para almacenar energía eléctrica. En el caso de condensadores e inductores, la reactancia se expresa en términos de la integral y la derivada de la función sinusoidal de la intensidad $I(t)$, respectivamente. Resolver estas ecuaciones es necesario para determinar correctamente la contribución de cada elemento a la impedancia total del circuito.

Para simplificar este análisis, la transformación de Fourier descompone la señal sinusoidal de voltaje y la señal sinusoidal de intensidad en sus componentes de frecuencia, lo que permite determinar fácilmente la impedancia total del circuito a una frecuencia dada. Esto simplifica significativamente el proceso de análisis de circuitos complejos y permite una comprensión más clara de la relación entre la señal de entrada y la señal de salida en diferentes frecuencias.

Con ello, es posible redefinir la anterior descripción del circuito eléctrico en función de la frecuencia (ω) tal que:

$$\check{V}(\omega) = (R + \frac{1}{j\omega C} + j\omega L)\check{I}(\omega)$$

Siendo $\check{V}(\omega)$ e $\check{I}(\omega)$ las transformadas de Fourier de las señales de voltaje e intensidad respectivamente y j la unidad imaginaria ($\sqrt{-1}$). Al redefinir la descripción del circuito en función de la frecuencia, podemos determinar fácilmente el valor de la impedancia Z de cada uno de sus componentes (Figura 3), tal que:

$$Z = \frac{\check{V}(\omega)}{\check{I}(\omega)} = R + \frac{1}{j\omega C} + j\omega L$$

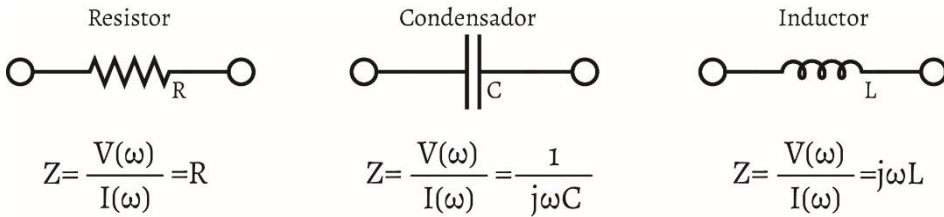


Figura 3: Principales elementos de un circuito eléctrico y su relación con la impedancia. R: Resistencia; C: Capacitancia; L: Inductancia; ω : frecuencia; $j: \sqrt{-1}$.

c. El epitelio como un circuito eléctrico

Un epitelio puede describirse de manera simplificada como una conexión en serie de un conjunto de resistencias, con valor de resistencia total R , y un conjunto de condensadores, con valor de capacitancia total C , conectados en paralelo. Bajo este esquema, el valor de la resistencia total se correspondería con los canales iónicos abiertos que se encuentran en la membrana lipídica en la vía transcelular y a las uniones intercelulares estrechas que conforman la vía paracelular, mientras que el valor de capacitancia total se correspondería con la cantidad de bicapas lipídicas, las cuales actúan como un condensador debido a sus propiedades aislantes e hidrofóbicas (Figura 4).

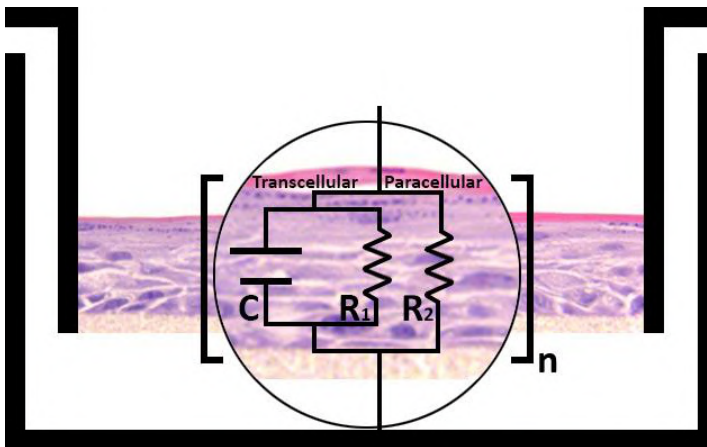


Figura 4: Epiteio representado como un conjunto (n) de conexiones seriadas de condensadores con capacitancia C y resistores con resistencia R_1 (canales iónicos) y R_2 (uniones intercelulares) conectados en paralelo.

Bajo condiciones de AC, el conjunto de resistores responde con una disminución de la amplitud de la onda de intensidad, mientras que el conjunto de condensadores responde con un cambio de fase (θ) entre 0 y -90° entre la intensidad y el voltaje. La impedancia (Z) de un epitelio puede entonces ser descrita como la suma de los componentes de resistencia y reactancia tal que:

$$Z = R + \frac{1}{j\omega C}$$

Con la evaluación de la impedancia mediante EIS (Figura 5), se hace posible, por tanto, cuantificar y diferenciar los efectos provocados por los elementos resistores y los elementos condensadores.

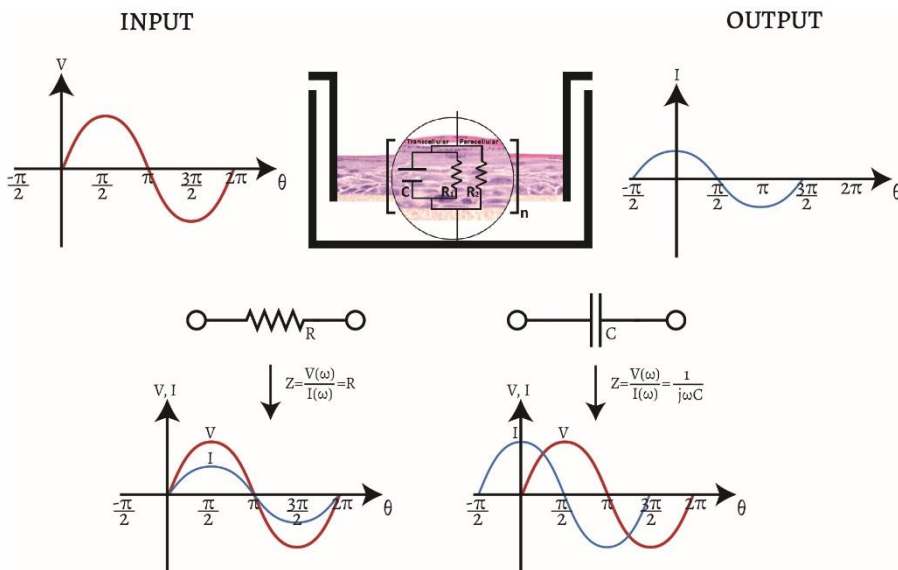


Figura 5: Evaluación de la impedancia. Nótese como la impedancia puede ser descompuesta en base a la suma de los efectos provocados por los resistores y los condensadores.

Hoy, la evaluación de la impedancia en modelos *in vitro* de tejido epitelial se reduce habitualmente a la evaluación de la TEER. La TEER son medidas de la resistencia total R de todos los componentes que se encuentran entre el par de electrodos; siendo en el caso de los modelos de tejido *in vitro*: las células epiteliales, el filtro soporte y el medio de cultivo. De manera estricta, la TEER son medidas tomadas en corriente continua (DC), a pesar de que generalmente se realizan en

condiciones cercanas a DC, esto es, utilizando condiciones AC a baja frecuencia ($\sim 3\text{-}20$ Hz) con el objetivo de evitar la polarización de los electrodos. Para muchas aplicaciones como la monitorización del crecimiento celular y la formación de estratos celulares durante la diferenciación celular, el uso de la TEER se hace suficiente para su caracterización[39].

Sin embargo, al contrario que la TEER, la evaluación de la impedancia determina la oposición al voltaje/intensidad bajo condiciones estrictas de AC, lo cual hace que el valor total de impedancia sea dependiente de la frecuencia utilizada al incluir la evaluación de elementos de reactancia, siendo generalmente el rango entre ~ 1 Hz y ~ 100 kHz el más utilizado en el caso de la evaluación de epitelios[40]. La diferencia fundamental entre la evaluación de la TEER y la impedancia en un modelo de epitelio se encuentra, por tanto, en la caracterización de los efectos sobre los componentes que actúan como condensadores, esto es, las membranas celulares, cuya integridad produce un cambio de fase entre la intensidad y el voltaje. De este modo, la evaluación de la impedancia en un modelo celular ofrece considerablemente más información acerca del estado de los modelos celulares que la TEER, dado que proporciona información tanto sobre la resistencia total R de los elementos resistivos como la capacitancia total C de los elementos capacitivos.

d. Aplicación de la impedancia en modelos de tejido *in vitro*

Los modelos de tejido *in vitro* son una de las herramientas indispensables en la biología y medicina moderna, siendo ampliamente utilizados en estudios de patogénesis y en la evaluación del metabolismo de sustancias bioactivas [41–43]. Estos modelos han ido evolucionando desde los tradicionales modelos en 2D hasta modelos en 3D, plataformas *organ-on-a-chip* y organoides [43–46] y son hoy en día una de las principales herramientas utilizadas en el área de la farmacología como sustituto de la experimentación animal, habiendo mejorado la productividad mediante el aumento de la rentabilidad[47]. Los modelos 3D de tejido humano *in vitro* presentan diversas ventajas con respecto a la experimentación animal, debido a que los procesos biológicos humanos difieren en cierta medida de los procesos en los animales de experimentación, principalmente roedores.

Actualmente, la evaluación del estado celular de los modelos de tejido *in vitro* depende mayoritariamente de la evaluación de diversos criterios finales que requieren la introducción de algún tipo de marcador. Los ensayos de tiempo final son técnicas laboriosas y que generalmente perturban de algún modo la muestra original, bien sea mediante modificación o destrucción de la misma. La evaluación de la impedancia es, por el contrario, una técnica que no requiere de marcadores y que puede ser utilizada para la cuantificación de las propiedades celulares en tiempo real sin afectar de manera significativa el estado celular. No obstante, existen ciertas restricciones en cuanto a las características de los campos electromagnéticos utilizados. La elección de valores específicos de voltaje e intensidad depende fundamentalmente de la disposición espacial de los electrodos y las células, la resistencia del medio de cultivo y el número de células[48]. De este modo, la evaluación de la impedancia en modelos celulares en suspensión requiere de intensidades relativamente pequeñas del entorno de decenas de μA [49]. En el caso de modelos celulares en 3D, pueden ser aplicados voltajes de 10-100 mV[50]. Por otro lado, en dispositivos microfluídicos, debido a la pérdida significativa de voltaje observada en los microcanales, la diferencia de potencial entre los electrodos puede alcanzar los 0,1-0,5 V[51].

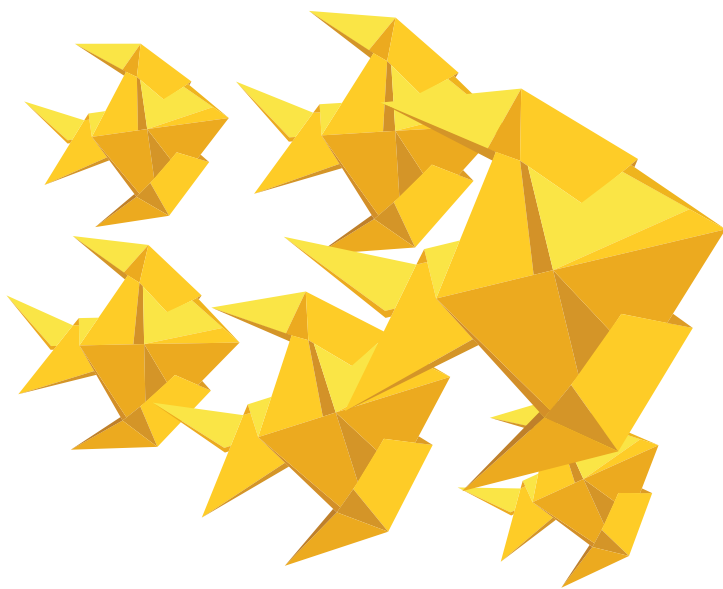
Para obtener los valores de impedancia es necesario, por tanto, generar un pequeño potencial eléctrico que atraviese la capa celular. De este modo, se requiere de al menos dos electrodos conductores situados a cada lado de la capa de células. En un rango de frecuencias entre 10 Hz y 1 MHz, la contribución a la impedancia por parte del medio de cultivo y de los soportes celulares es independiente de la frecuencia[40]. Sin embargo, la interfaz electrodo-electrolito genera una impedancia resultado de la polarización de los electrodos dependiente de la frecuencia, lo cual perturba la propia medida de impedancia[40]. Es por ello que la contribución a la impedancia por parte del conjunto electrodo-electrolito debe ser considerada en la modelación del circuito eléctrico, o eliminada mediante la separación del electrodo conductor de corriente del electrodo sensor del potencial, simplificando en gran medida el circuito eléctrico equivalente[52].

Otro aspecto a tener en cuenta es el material utilizado en los electrodos. Debido a la proximidad de los electrodos y las células, el material de los electrodos

Introducción

no debe causar efectos tóxicos y debe ser química y física estable durante los experimentos. Por ello, los electrodos de Ag/AgCl se han convertido en el principal componente de muchos sistemas electroquímicos debido a su bajo coste y a su potencial estable[53]. Sin embargo, el contacto con medios biológicos promueve los procesos de erosión, causando la degradación del recubrimiento de AgCl, modificando el potencial del electrodo e induciendo citotoxicidad[48], siendo, por tanto, los electrodos de Ag/AgCl, mayoritariamente utilizados para mediciones de corta duración donde los electrodos son introducidos en el sistema durante un breve periodo de tiempo, como es el caso de los sistemas para la evaluación de la TEER como el EVOM/STX2[54], REMS Autosampler[55] y Millicell-ERS[56].

Justificación



Danio rerio
277.328 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Justificación

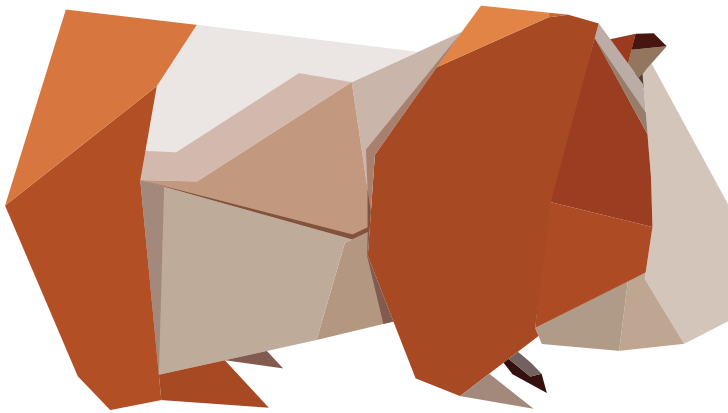
El reemplazo de la experimentación animal por métodos alternativos para la evaluación de los peligros para la salud humana es una realidad en el marco de la EU. Para ello, se promueve desde el EURL ECVAM el desarrollo de nuevos métodos que contribuyan a una mayor aceptación y aplicación internacional de métodos que no involucren el uso de animales.

En este respecto, los métodos basados en epitelios reconstruidos *in vitro* representan una alternativa eficaz para la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo y la evaluación de la irritación/corrosión cutánea. Con el objetivo de fomentar la incorporación de nuevos métodos basados en epitelios reconstruidos, se han desarrollado estándares de desempeño que permiten demostrar la relevancia y robustez de nuevos métodos con el objetivo de ser incorporados a las respectivas TG de la OECD.

Por todo ello, es pertinente y queda justificado el desarrollar nuevos modelos de tejido reconstruido *in vitro* y evaluar la relevancia y robustez de nuevos métodos basados en el uso de epitelios reconstruidos en base a los estándares de desempeño para la predicción de peligros para la salud humana con el fin de contribuir a reemplazar la experimentación animal en los ensayos de irritación ocular/daño ocular severo e irritación/corrosión cutánea.

Justificación

Hipótesis



Cavia porcellus

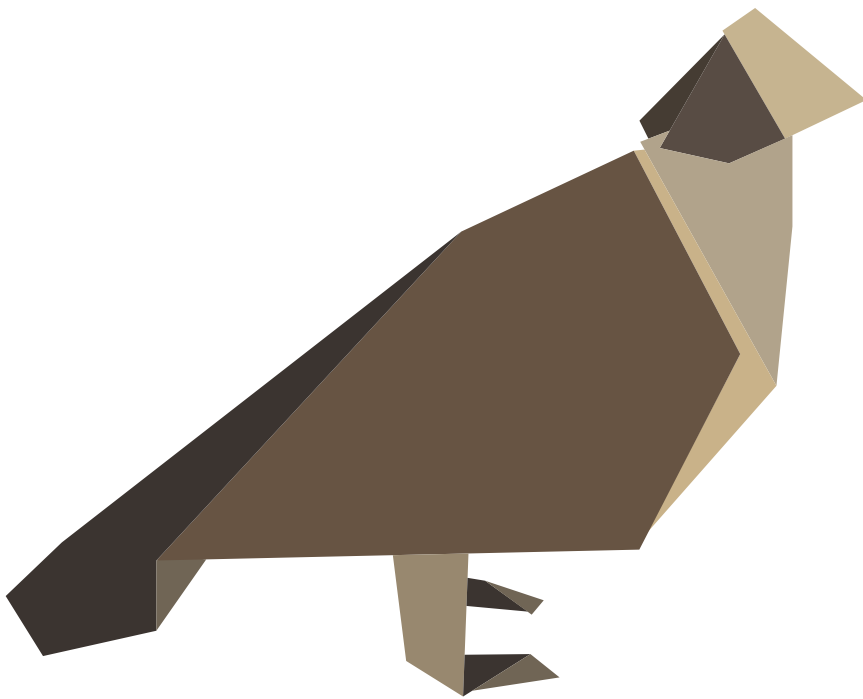
111.172 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Hipótesis

Es posible el desarrollo de modelos de tejidos humanos reconstruidos *in vitro* que puedan ser caracterizados mediante métodos analíticos y cuya eficacia para la evaluación de peligros para la salud humana pueda ser validada en base a estándares internacionales, con el fin último de sustituir la experimentación animal en ensayos toxicológicos.

Hipótesis

Objetivos



Coturnix japonica

86.371 utilizadas con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

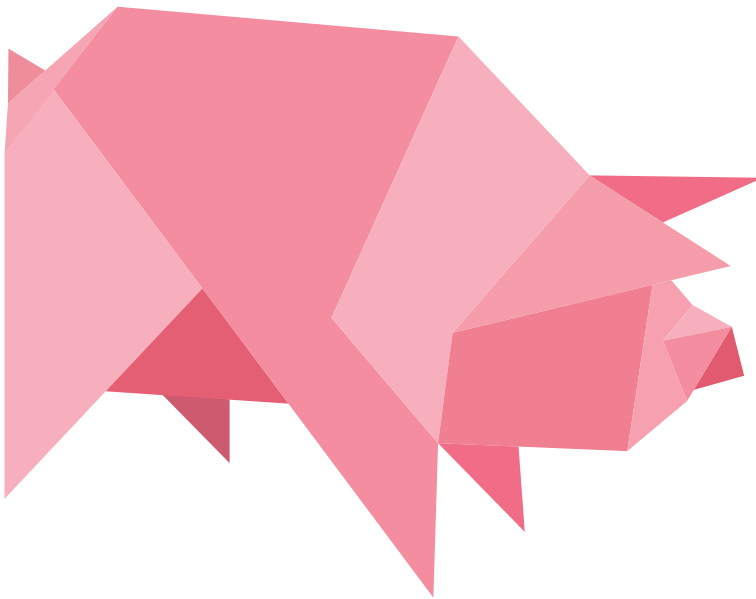
Objetivos

Los objetivos de la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Desarrollar un modelo de epitelio corneal reconstruido y un modelo de epidermis reconstruida.
2. Evaluar la capacidad predictiva de la irritación ocular/daño ocular severo y la irritación cutánea en los modelos de epitelio corneal y epidermis reconstruida en base al estudio de la viabilidad celular.
3. Evaluar el uso de la capacitancia como sistema predictivo de la irritación ocular/daño ocular severo y la irritación cutánea en los modelos de epitelio corneal y epidermis reconstruida.
4. Evaluar la seguridad de nuevos medicamentos oftalmológicos.

Objetivos

Material & método



Sus scrofa

73.509 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

I. Tejidos humanos

De acuerdo con los preceptos de la Declaración de Helsinki, se han utilizado 25 córneas humanas obtenidas de acuerdo a la legislación española para células humanas, tejidos y productos basados en células y tejidos, habiendo sido aprobada su utilización por el comité ético de investigación del Principado de Asturias (Nº 2020.050). El tejido corneal se obtuvo tras haber sido utilizado en cirugía, habiendo sido cedido por el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega o tras haber sido descartado para trasplante y siendo cedido por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias. Todos los tejidos oculares se mantuvieron a 4 °C en Eusol-C (Alchimia, Ponte S. Nicolò, Italia) o a 31 °C en Tissue-C (Alchimia) por menos de 10 días o 30 días respectivamente antes de su uso.

Adicionalmente, se han utilizado 5 biopsias de piel humana obtenidas de donantes cadáver y cedidas por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, habiendo sido su utilización igualmente aprobada por el comité ético de investigación del Principado de Asturias (Nº 2020.050).

Todos los tejidos fueron evaluados negativos para VIH, hepatitis B y hepatitis C previo a su procesamiento. Las células de diferentes donantes no fueron mezcladas para ningún experimento.

a. *Aislamiento de células epiteliales corneales*

El tejido limbar, definido como la zona que limita visualmente la esclera y la córnea, se diseccionó utilizando un microscopio quirúrgico y se troceó en pequeños fragmentos que fueron digeridos en una solución de tripsina/EDTA al 0,25% (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, la solución fue neutralizada en una mezcla de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y medio Ham's F12 (Life Technologies, California; EE. UU.) en proporción 1:1 suplementado con suero bovino fetal (FBS) (10%; Life Technologies) y penicilina/estreptomicina (1%; Merck). Posteriormente, se realizaron dos digestiones adicionales a los fragmentos de tejido sin digerir durante 30 minutos cada uno. Las soluciones recuperadas tras las digestiones fueron centrifugadas a 400 rcf durante 10 minutos y los *pellet* fueron resuspendidos en CnT-Prime

Material y método

(CellNTec, Berna, Suiza) y sembrados en frascos de cultivo de 25 cm² (BD, Nueva Jersey, EE. UU.).

Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (37 °C) y CO₂ (5%). En el momento que las células fueron confluentes, se incubaron en tripsina/EDTA 0,25%, se contaron (obteniendo entre 1,8-2,2 células por frasco) y, o bien se congelaron en una mezcla de DMEM, FBS (15%) y glicerol (10%; Merck) o bien se utilizaron para la generación de los modelos QobuR-RhCE.

b. Aislamiento de queratinocitos

Partiendo de biopsias de entre 7 y 9 cm² de piel, se troceó la piel en pequeños fragmentos. A continuación, se realizó una primera digestión enzimática con colagenasa (2 mg/mL) diluida en DMEM suplementado con 1 % de penicilina/estreptomicina, durante 3-4 horas a 37 °C en agitación constante.

Transcurrida la primera digestión, la solución de colagenasa conteniendo los fragmentos de piel, se filtró a través de una malla de 40 µm con el objetivo de recuperar los fragmentos de piel, los cuales fueron sometidos a una segunda digestión enzimática con tripsina/EDTA 0,25% durante 45-60 minutos a 37 °C en agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se volvió a filtrar la solución a través de una malla de 40 µm y la solución recogida se neutralizó con igual volumen de medio de cultivo compuesto por una mezcla de DMEM y Ham's F12 en proporción 3:1 suplementado con FBS (10%), insulina (5 µg/mL) hidrocortisona (0,4 µg/mL), triyodotironina (1,3 ng/mL), toxina colérica (8 ng/mL), adenina (24 µg/mL) y penicilina/estreptomicina (1%). La solución obtenida se centrifugó durante 10 minutos a 400 rcf, se resuspendió en medio de cultivo y se contaron las células. Los fragmentos de piel recuperados en el filtro se volvieron a digerir dos veces más en tripsina/EDTA.

Las células resultantes de las digestiones con tripsina/EDTA se sembraron a una densidad aproximada de 20.000 células/cm² en presencia de células *feeder* (3T3) letalmente irradiadas y sembradas a 100.000 células/cm².

Cuando los queratinocitos fueron confluentes se procedió a congelarlos. Para ello, las células se trataron con tripsina/EDTA 0,25% para despegarlos de la

superficie del frasco de cultivo. Seguidamente, se neutralizó con igual cantidad de medio de cultivo y se centrifugó durante 10 minutos a 400 rcf. Posteriormente, las células se resuspendieron en una mezcla de DMEM, FBS (15%) y glicerol (10%) y se congelaron durante 24 horas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente en un tanque de N_2 líquido hasta su uso en la generación de los modelos QileX-RhE.

II. Desarrollo de modelos RhCE y RhE

a. *Generación del modelo QobuR-RhCE*

El modelo QobuR-RhCE consiste en células epiteliales corneales humanas formando un epitelio escamoso estratificado semejante a un epitelio corneal humano normal[57]. Brevemente, insertos Transwell (Corning, Nueva York, EE. UU.) de $1,12\text{ cm}^2$ se sembraron con 5×10^4 células/ cm^2 en ausencia de células *feeder* en medio de cultivo definido carente de FBS (CnT-PR). Para promover la diferenciación tridimensional, el medio de cultivo se sustituyó por CnT-PR-3D (CellNTec) y los modelos fueron incubados en interfase aire-líquido durante 7-14 días.

b. *Generación del modelo QileX-RhE*

El modelo QileX-RhE consiste en células epidérmicas humanas formando un epitelio escamoso estratificado queratinizado semejante a una epidermis humana normal. Brevemente, se descongelaron viales de queratinocitos y se expandieron en 75 cm^2 en ausencia de células *feeder* hasta confluencia en medio CnT-Prime (CellNTec) optimizado para la expansión de células epiteliales en ausencia de FBS u otro componente de origen animal. Para la generación de los modelos QileX-RhE, se despegaron las células del frasco de cultivo mediante incubación con acutasa (Life Technologies) y se sembraron sobre insertos Transwell (Corning) a una densidad de 5×10^4 células/ cm^2 . Para promover la diferenciación tridimensional, se sustituyó el medio de cultivo por CnT-PR-3D (CellNTec) y los modelos fueron incubados en interfase aire-líquido durante 14-20 días.

III. Análisis del contenido lipídico del estrato córneo

El análisis del contenido lipídico fue subcontratado al Servicio de Análisis Lipídicos de la Universidad de La Laguna. Para ello, 12 modelos QileX-RhE fueron congelados a -80°C durante 24 horas y enviados en hielo seco para su análisis.

Los modelos QileX-RhE fueron separados mecánicamente de los insertos y los lípidos totales fueron extraídos de acuerdo con la metodología de Bligh y Dyer. Seguidamente, el extracto lipídico fue secado en atmosfera de nitrógeno, pesado y su composición lipídica determinada mediante cromatografía analítica de capa fina de alto rendimiento (HPTLC).

Para la separación de las clases lipídicas se ha seguido un desarrollo secuencial en (1) hexano/cloroformo/acetona (8:90:2), (2) cloroformo/acetona/metanol (76:8:16), (3) hexano/cloroformo/acetato de hexilo/acetona/metanol (6:80:0,1:10:4), (4) cloroformo/etanoato de etilo/butanona/2-propanol/etanol/metanol/agua/acetato de hexilo (36:6:6:6:16:28:2:1), (6) cloroformo/acetona/metanol (76:12:8), (7) hexano/etoxietano/etanoato de etilo (78:18:4).

IV. Evaluación de la TEER

Para la evaluación de la TEER se utilizó un multímetro Millicell-ERS2 (Merck) acoplado a un par de electrodos de Ag/AgCl. Para ello, se llevó los modelos celulares a temperatura ambiente y se sumergió los electrodos de tal manera que uno de ellos se encontrara en el interior del inserto y el otro en el exterior, manteniendo ambos estables con un ángulo de 90° con respecto a la placa de cultivo. Para obtener el valor de TEER (Ωcm^2) se utilizó la siguiente ecuación:

$$TEER = (R_{muestra} - R_{blanco}) \times \text{área}$$

Siendo:

$R_{muestra}$: valor de resistencia de los modelos QobuR-RhCE o QileX-RhE

R_{blanco} : valor de resistencia de un inserto Transwell sin células cultivadas

Área: $1,12 \text{ cm}^2$

V. Evaluación de la capacitancia

Para la evaluación de la capacitancia, se utilizó un analizador de impedancias U2817A Precision LCR Meter (Eucol, Changzhou, China) y un espectroscopio de impedancia electroquímica μ Stat-i 400s (Metrohm Dropsens, Asturias, España). En ambos casos, se aplicó un pulso AC sinusoidal de 10 mV entre un par de electrodos Ag colocados en el interior y exterior del inserto a una distancia fija. En el caso de la utilización del analizador de impedancia U2817A, se evaluó la capacitancia en diez puntos logarítmicamente distribuidos en un rango de frecuencias de [50 Hz – 100 kHz]. En el caso de la utilización del espectroscopio de impedancia electroquímica μ Stat-i 400s, se evaluó la capacitancia en 25 puntos logarítmicamente distribuidos en un rango de frecuencias de [1 Hz – 1 MHz].

VI. Evaluación de la viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo de reducción basado en el bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl (MTT) (M2128; Merck). En este ensayo, el MTT, una sal amarillenta de tetrazolio, es reducido a una sal de formazán de color morado por la acción principal de la succinato deshidrogenasa mitocondrial en las células viables.

En resumen, una vez que los modelos QobuR-RhCE o QileX-RhE fueron tratados con los respectivos compuestos y habiendo sido lavados e incubados durante el tiempo pertinente en cada caso, se añadió 0,5 mL de MTT disuelto en una mezcla de DMEM y Ham's F12 (Merck) en proporción 1:1 a una concentración final de 0,5 mg/mL sobre el inserto y 0,5 mL adicionales en la placa de cultivo y se incubó a 37 °C durante 180 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio conteniendo el MTT y las sales de formazán se solubilizaron añadiendo 1 mL de DMSO (0,5 mL sobre el inserto y 0,5 mL sobre la placa) e incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente y constante agitación. Tras la solubilización, se transfirieron 100 μ L por triplicado a una placa de 96 pocillos y la densidad óptica (OD) se cuantificó utilizando un lector de placas automatizado (PerkinElmer 2030 Multilabel Reader, Victor X5, Massachusetts, EE. UU.).

VII. Evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo en el modelo QobuR-RhCE

El método para la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo está basado en los protocolos de evaluación establecidos por la OECD TG 492. Brevemente, los modelos QobuR-RhCE se colocaron en una placa de cultivo conteniendo 500 μ L de medio de cultivo y los productos químicos de referencia se dosificaron homogéneamente por duplicado mediante la aplicación de 90 μ L para compuestos líquidos o 90 mg para compuestos sólidos sobre la superficie de los modelos. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente para los compuestos líquidos y 6 horas de incubación a temperatura ambiente para los compuestos sólidos, los productos químicos fueron decantados y los modelos QobuR-RhCE fueron lavados abundantemente en PBS. Tras el lavado, los modelos fueron post-lavados durante 12 minutos en medio de cultivo. Al finalizar el post-lavado, cada modelo fue transferido a una nueva placa de cultivo conteniendo 1 mL de medio de cultivo y los modelos fueron incubados durante 2 horas a 37 °C en el caso de los compuestos líquidos o 18 horas a 37 °C en el caso de los compuestos sólidos. Tras el periodo de incubación, se añadió 500 μ L sobre cada inserto y se evaluó la TEER y la capacitancia siguiendo la metodología previamente descrita. Finalmente, el medio de cultivo fue retirado y la viabilidad celular fue evaluada mediante MTT.

VIII. Evaluación de la irritación cutánea en el modelo QileX-RhE

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de los modelos QileX-RhE para la evaluación de la irritación cutánea, se siguió un protocolo de evaluación acorde a lo establecido por la OECD TG 439. Brevemente, tras una pre-incubación en medio de cultivo durante la cual se evaluó la TEER y la impedancia, los modelos QileX-RhE se colocaron en una placa de cultivo conteniendo 500 μ L de medio de cultivo y fueron inmediatamente expuestos a los productos químicos de referencia mediante la aplicación de los mismos por triplicado utilizando 50 μ L para los compuestos líquidos y 50 mg para los compuestos sólidos. Tras 15 minutos de exposición, los productos químicos fueron decantados y los modelos QileX-RhE fueron lavados abundantemente en un flujo suave y continuo de PBS. Tras el lavado, los modelos fueron post-lavados durante 15 minutos en medio de cultivo.

Al finalizar el post-lavado, cada modelo fue transferido a una nueva placa de cultivo conteniendo 1 mL de medio de cultivo y los modelos fueron incubados durante un total de 42 horas a 37 °C. A las 2 horas, 24 horas y 42 horas post-incubación, la TEER y la capacitancia fueron evaluadas y finalmente la viabilidad celular fue evaluada mediante MTT tras las 42 horas de post-incubación.

IX. Evaluación del daño celular

El daño celular fue evaluado mediante el ensayo de marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL). En este ensayo, la presencia de cortes en el ADN es identificada por la terminal deoxinucleotidil transferasa, una enzima que cataliza la adición de dUTPs que son marcados secundariamente con un marcador fluorescente.

En resumen, secciones histológicas previamente desparafinadas fueron lavadas dos veces en PBS y permeabilizadas durante 5 minutos con una solución de PBS-0,3% Triton X-100. Tras un nuevo lavado en PBS, las muestras fueron incubadas en TUNEL reaction mix (1215679291; Roche, Basilea, Suiza) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, las muestras fueron montadas con un cubreobjetos utilizando medio de montaje con DAPI (ab104139, Abcam, Cambridge, Reino Unido).

Todas las muestras fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia DM6000B (Leica).

X. Análisis histológico

Los modelos QobuR-RhCE y QileX-RhE fueron fijados en formalina 10% durante 1 hora. Tras la fijación, la membrana del inserto que soporta el cultivo fue separada del resto del inserto y lavada 3 veces en PBS durante 10 minutos. Seguidamente, las muestras fueron procesadas para su inclusión en parafina. Para ello, se utilizó un procesador de tejidos de carrusel STP 120 (Myr, Tarragona, España) con un ciclo de 1 hora en etanol 70%, 1 hora en etanol 80%, 1 hora en etanol 96% (1), 1 hora en etanol 96% (2), 1 hora en etanol 100% (1), 1 hora en etanol 100% (2), 1,5 horas en xileno (1), 1,5 horas en xileno (2), 2 horas en parafina (1) y 2 horas en parafina (2). Posteriormente, las muestras fueron encastradas en un bloque de parafina utilizando un centro de inclusión de tejidos EC 350 (Myr) y cortadas en

Material y método

secciones de 5 μm con un micrótomo Microm HM 360 (ThermoFisher, Massachusetts, EE. UU.).

Para los estudios histológicos sobre los diferentes modelos, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina para evaluar la estructura general de los epitelios e inmuntinciones contra una batería de marcadores celulares específicos para la caracterización fenotípica de los modelos.

Para la tinción de hematoxilina-eosina, secciones previamente desparafinadas fueron inmersas en una solución de hematoxilina de Mayer (Merck) durante 3 minutos y seguidamente lavadas con agua. A continuación, las secciones fueron inmersas en una solución de eosina (Merck) durante 1 minuto y lavadas con abundante agua. Seguidamente, las muestras fueron deshidratadas mediante inmersiones en una batería de alcoholes de graduación creciente y xileno, y finalmente las secciones fueron montadas con un cubreobjetos.

Para el estudio inmunohistoquímico, las secciones previamente desparafinadas fueron lavadas dos veces en PBS durante 10 minutos y permeabilizadas durante 5 minutos en una solución de PBS-0,3% TritonX100. Tras un nuevo lavado en PBS, las muestras fueron incubadas toda la noche a 4 °C en una solución de PBS conteniendo el anticuerpo primario correspondiente a una dilución 1:100 y 10% de suero de cabra (ab7481, Abcam) como agente bloqueante.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados en PBS y las secciones fueron incubadas en una solución de PBS conteniendo el anticuerpo secundario correspondiente a una dilución 1:500 durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron montadas con un cubreobjetos utilizando medio de montaje con DAPI (ab104139, Abcam).

Todas las muestras fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia DM6000B (Leica).

XI. Análisis estadístico

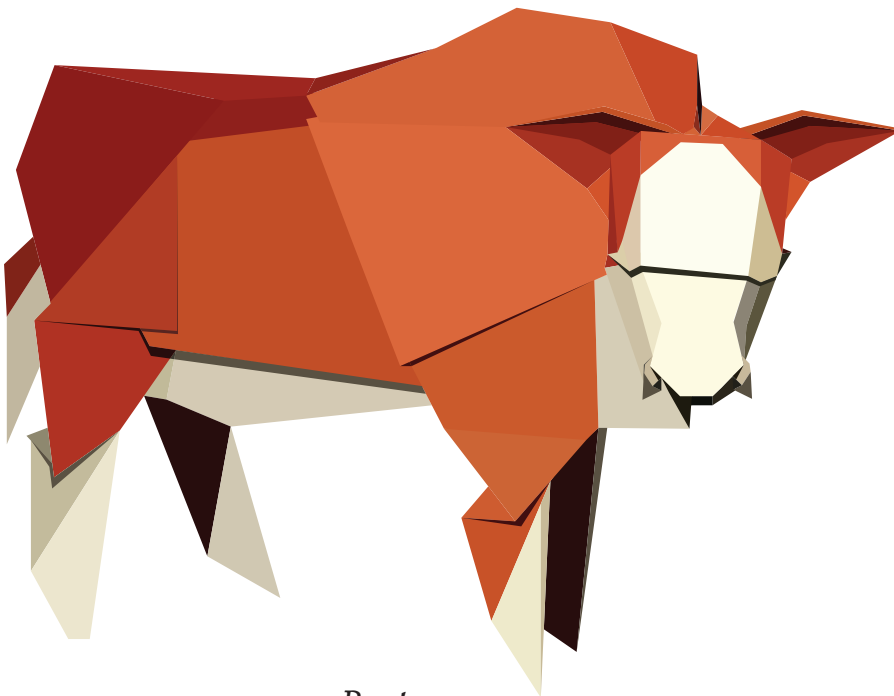
Todos los test estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 9.0 para Windows (GraphPad Software, California, EE. UU.). La media y desviación estándar de los datos históricos de viabilidad celular de los controles

negativos y TEER inicial de todos los modelos producidos fueron utilizados para establecer los criterios de control de calidad de viabilidad y efecto barrera epitelial respectivamente en los modelos QobuR-RhCE y QileX-RhE en base al intervalo de confianza del 95%.

La comparación entre los diferentes grupos durante el estudio de la protección del efecto barrera se analizó mediante un análisis ANOVA de un factor y un contraste *post hoc* de Tukey. El límite de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

Capítulo 1

Desarrollo de un modelo de epitelio corneal reconstruido



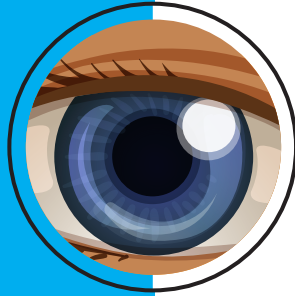
Bos taurus

22.175 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Capítulo 1

Resumen gráfico

QobuR-RhCE



Desarrollo de un modelo de epitelio corneal humano reconstruido a partir de células limbocorneales humanas

Caracterización fenotípica



Análisis de marcadores celulares por inmunofluorescencia

Caracterización del efecto barrera



Evaluación de la TEER durante la diferenciación celular

Control de calidad



Evaluación de la morfología
Evaluación del efecto barrera
Evaluación de la viabilidad

C1.1. Introducción

Para garantizar la seguridad del público en general, todo producto farmacéutico o cosmético debe ser evaluado y clasificado en función de su potencial para dañar la superficie ocular según el Sistema Globalmente Armonizado (GHS) propuesto por las Naciones Unidas[1]. Esta clasificación define cuatro categorías diferentes basadas en los resultados obtenidos en el test *in vivo* de Draize[58]: Categoría 1 (daño irreversible para los ojos); Categoría 2A (irritante ocular); Categoría 2B (ligeramente irritante para los ojos) y Sin Categoría (no irritante). La Unión Europea ha adoptado oficialmente la clasificación del GHS en su legislación, con la única diferencia de combinar las categorías 2A y 2B del GHS en una única Categoría 2 (irritante ocular)[3].

A raíz de la Directiva europea 2010/63/EU sobre la protección de animales utilizados con fines científicos[14], los estudios de toxicidad con modelos animales están siendo sustituidos por ensayos sin animales. Hasta la fecha, varios métodos alternativos han sido validados y aceptados como TG de la OECD como métodos para la predicción de la irritación ocular. Estos métodos alternativos pueden agruparse en 3 categorías:

- 1- Modelos *ex vivo*: Método de ensayo de opacidad y permeabilidad de la córnea bovina (BCOP) (OECD TG 437) y el método de ensayo del ojo de pollo aislado (ICE) (OECD TG 438)
- 2- Modelos de monocapa *in vitro*: Método de ensayo de exposición de corta duración (STE) (OCDE TG 491) y método de ensayo de fuga de fluoresceína (FL) (OECD TG 460)
- 3- Modelos 3D *in vitro*: Epitelio humano reconstruido similar a la córnea (RhCE) (OECD TG 492) y Vitrigel (OECD TG 494)

De estos métodos alternativos, los modelos animales *ex vivo* y los modelos *in vitro* presentan diferencias sustanciales en comparación con la córnea humana nativa. Las diferencias anatómicas entre especies pueden dar lugar a interpretaciones erróneas, mientras que el cultivo celular en monocapa no refleja la microestructura real de un epitelio normal[59]. Los modelos 3D *in vitro* de epitelio corneal representan con mayor presión la arquitectura celular de la superficie ocular humana.

En este capítulo, se describen detalladamente los protocolos para la fabricación extensiva del modelo QobuR-RhCE, un nuevo modelo 3D *in vitro* de epitelio corneal obtenido a partir de células limbocorneales humanas con el objetivo de ser utilizado como metodología alternativa a la experimentación animal para la evaluación de la irritación ocular y el daño ocular severo.

C1.2. Diseño experimental

Desarrollo del modelo QobuR-RhCE

Para el desarrollo de los modelos QobuR-RhCE, se utilizaron células limbares humanas de diferentes donantes (edad promedio: 62 ± 9 años; rango: 45-76 años).

Análisis de la diferenciación celular mediante TEER

El análisis de la diferenciación celular durante el proceso de fabricación de los modelos QobuR-RhCE se realizó en 12 modelos independientes. Para ello, se analizó cada 24 horas las variaciones de la TEER utilizando un multímetro MilliCELL-ERS2 (Merck) durante el curso de 14 días.

Caracterización del modelo QobuR-RhCE

Morfología y caracterización fenotípica

Las muestras de QobuR-RhCE fueron fijadas en formalina e incluidas en parafina. Las secciones histológicas fueron teñidas con hematoxilina-eosina para su evaluación morfológica. Para la evaluación inmunohistoquímica se utilizaron los marcadores p63, citoqueratina 3; zónula ocludens-1; conexina-43 y β -catenina (Tabla 6) siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

Tabla 6: Listado de anticuerpos utilizados para la caracterización fenotípica del modelo QobuR-RhCE

Anticuerpo	Referencia	Especie	Clonalidad	Dilución
Anticuerpos primarios				
p63	Abcam Cat #ab124762; RRID:AB_10971840	Conejo	Monoclonal	1:100
Citoqueratina 3	Abcam Cat# ab68260; RRID:AB_1140695	Ratón	Monoclonal	1:100

Anticuerpo	Referencia	Especie	Clonalidad	Dilución
Zónula occludens-1	Invitrogen Cat #61-7300; RRID:AB_138452	Conejo	Policlonal	1:100
Conexina-43	Sigma-Aldrich Cat# C6219; RRID:AB_476857	Conejo	Policlonal	1:100
β -catenina	Abcam Cat# ab32572; RRID:AB_725966	Conejo	Monoclonal	1:100
Anticuerpos secundarios				
Anti-ratón	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11034; RRID:AB_2576217	Cabra	Policlonal	1:500
Anti-conejo	Thermo Fisher Scientific Cat#A-11032; RRID:AB_2534091	Cabra	Policlonal	1:500

Control de calidad del efecto barrera

La homogeneidad de la integridad del efecto barrera epitelial en los modelos QobuR-RhCE fue evaluado mediante el registro de los datos históricos de la TEER. Para ello, la TEER fue registrada durante los diferentes experimentos y el valor medio y los límites de control para el uso de QobuR-RhCE fueron definidos en base al intervalo de confianza del 95%.

Control de calidad de la viabilidad celular

Los datos históricos obtenidos a lo largo del tiempo fueron recogidos y utilizados para establecer los límites de aceptabilidad de los valores de control negativo y control positivo. Para ello, se utilizó el porcentaje medio de viabilidad relativa del control positivo y la OD del control negativo, estableciendo en este último caso un intervalo de confianza del 95%.

C1.3. Resultados

Análisis de la diferenciación celular mediante TEER

La maduración de los modelos QobuR-RhCE fue monitorizada mediante mediciones de la TEER a intervalos de tiempo definidos. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 6. Al compararse los datos obtenidos en los diferentes tiempos, los valores de TEER aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo hasta alcanzar una meseta en torno al día 9 en valores cercanos a $1500 \Omega\text{cm}^2$.

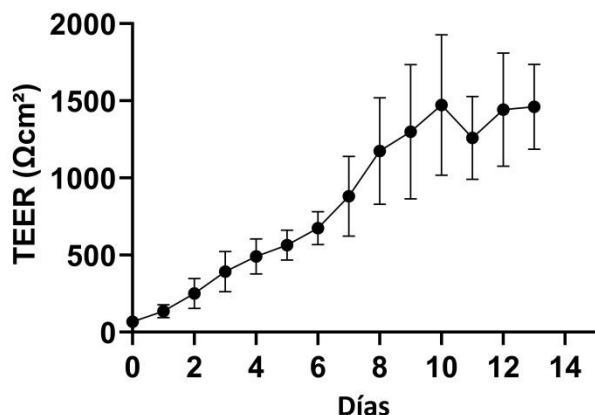


Figura 6: Variaciones en la TEER durante el proceso de diferenciación celular

Caracterización del modelo QobuR-RhCE

Morfología y caracterización fenotípica

Todos los modelos QobuR-RhCE consistieron en un epitelio pluriestratificado de entre 5-7 capas celulares, reflejando un patrón de diferenciación altamente especializado (Figura 7) consistiendo en una capa basal firmemente adherida a la membrana de polyester, seguida de un estrato de células aladas y un estrato de células superficiales.

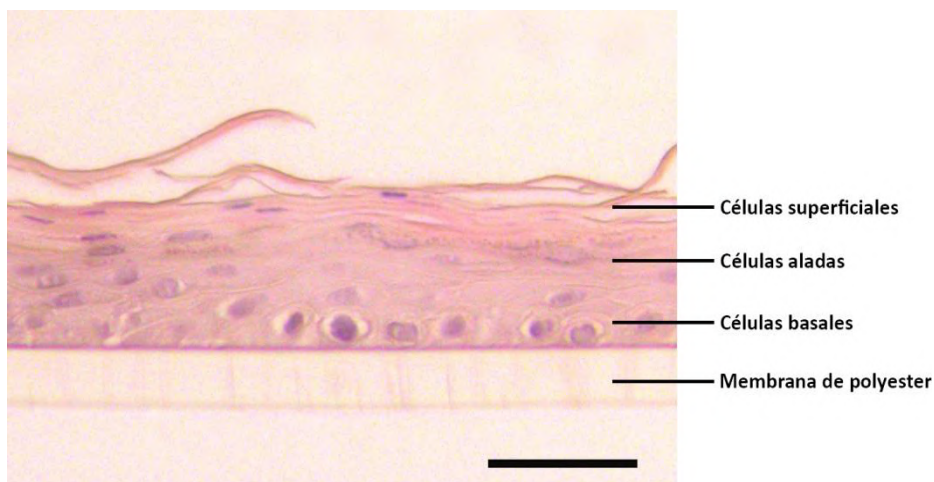


Figura 7: Evaluación histológica representativa del modelo QobuR-RhCE. Barra de escala: 50 μm

La caracterización fenotípica (Figura 8) muestra que la expresión del marcador fenotípico p63 (Figura 8B), un marcador de células progenitoras, puede observarse en la capa basal, mientras que el marcador de diferenciación terminal citoqueratina 3 (Figura 8C) sólo se encontró en la capa más apical de los modelos QobuR-RhCE. Por otro lado, el marcador de uniones estrechas zónula ocludens-1 (Figura 8D) y el marcador de uniones intercelulares conexina-43 (Figura 8E) se observaron en las capas suprabasales, mientras que la β -catenina (Figura 8F) se observó en todas las capas epiteliales.

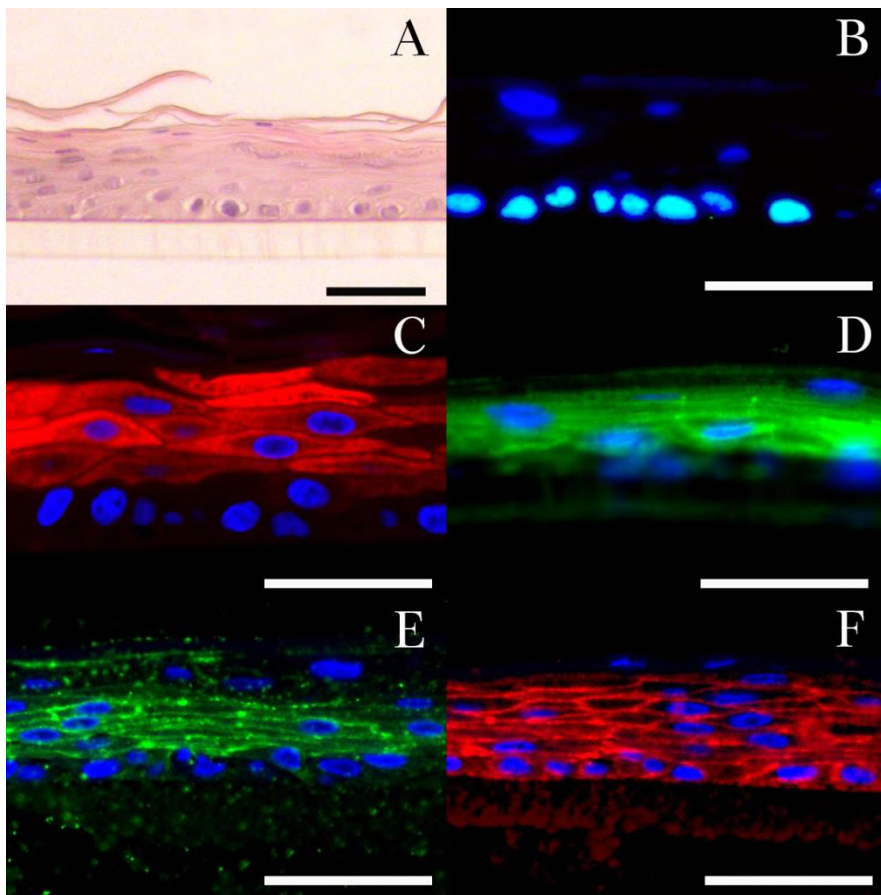


Figura 8: Caracterización fenotípica del modelo QobuR-RhCE. (A): Hematoxilina-eosina; (B): p63; (C): citoqueratina 3; (D): zónula ocludens-1; (E): conexina-43; (F): β -catenina. Barra de escala = 50 μ m.

Control de calidad del efecto barrera

De acuerdo con los análisis estadísticos de los datos históricos de la TEER en los modelos QobuR-RhCE producidos, los límites mínimos y máximos de los valores de TEER se establecieron en ≥ 750 y $\leq 2500 \Omega\text{cm}^2$ respectivamente (Figura 9 y Tabla 7).

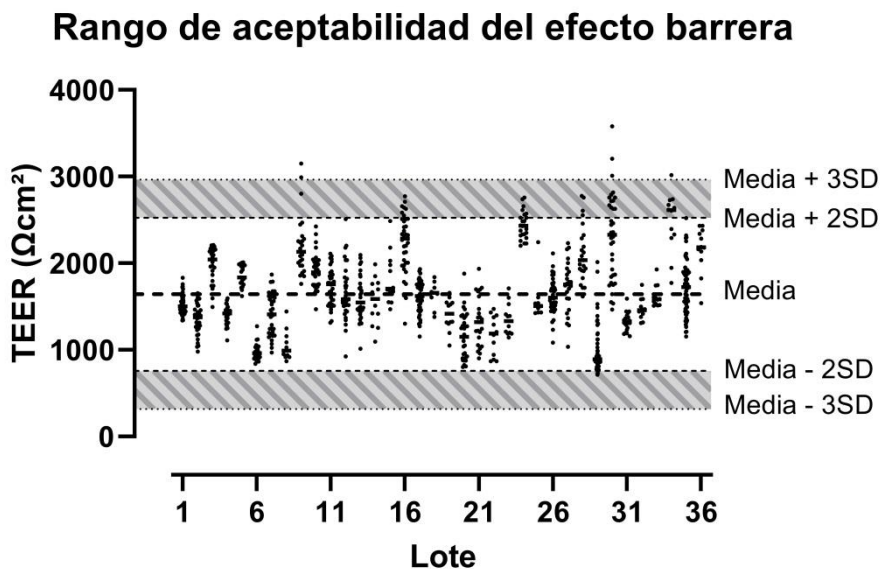


Figura 9: Datos históricos de la TEER de los modelos QobuR-RhCE

Tabla 7: Datos históricos de la TEER de los modelos QobuR-RhCE.

Lote	TEER	SD	CV	N
1	1513,95	106,19	7,01	72
2	1348,88	172,72	12,80	36
3	1980,28	207,93	10,50	24
4	1401,22	104,06	7,43	36
5	1854,37	122,62	6,61	19
6	972,22	100,04	10,29	24
7	1405,80	242,31	17,24	36
8	1054,79	181,48	17,20	10
9	2209,58	354,22	16,03	24
10	1906,33	196,59	10,31	36

Lote	TEER	SD	CV	N
11	1720,61	216,28	12,57	36
12	1659,29	306,42	18,47	36
13	1599,28	248,88	15,56	36
14	1558,52	272,29	17,47	12
15	1824,72	300,59	16,47	12
16	2225,09	347,79	15,63	36
17	1619,38	179,26	11,07	68
18	1633,64	160,99	9,85	8
19	1407,82	183,35	13,02	12
20	1155,69	258,03	22,33	36
21	1330,91	280,46	21,07	24
22	1166,18	231,50	19,85	12
23	1351,90	184,39	13,64	12
24	2438,43	157,96	6,48	24
25	1577,28	257,40	16,32	9
26	1617,58	212,53	13,14	36
27	1724,75	304,97	17,68	24
28	2110,85	327,25	15,50	24
29	1019,36	289,06	28,36	48
30	2304,44	509,75	22,12	36
31	1324,08	104,16	7,87	24
32	1472,17	123,88	8,41	12
33	1618,17	125,61	7,76	12
34	2479,49	352,69	14,22	12
35	1722,49	289,99	16,84	72
36	2160,68	262,98	12,17	12

TEER: Resistencia eléctrica transeptelial; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; N: número de modelos

Así mismo, no se han encontrado diferencias significativas en la producción de los modelos QobuR-RhCE a lo largo de los años (Figura 10 y Tabla 8).

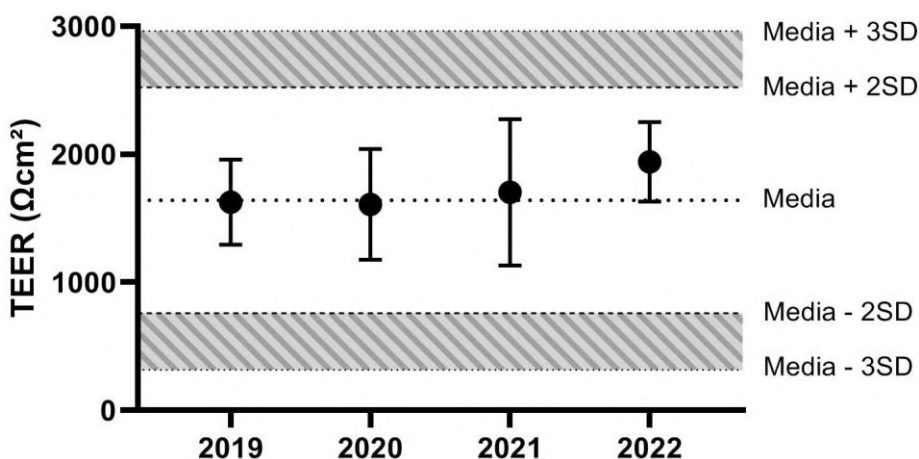


Figura 10: TEER de los modelos QobuR-RhCE a lo largo de los años

Tabla 8: TEER de los modelos QobuR-RhCE a lo largo de los años

	TEER	SD	N
2019	1626,09	333,36	573
2020	1608,18	432,91	201
2021	1702,95	572,03	144
2022	1941,58	309,85	84

TEER: Resistencia eléctrica transepitelial; SD: Desviación estándar; N: número de modelos

Control de calidad de la viabilidad celular

Los límites superiores e inferiores fueron estadísticamente estimados de acuerdo a los datos históricos de la viabilidad celular obtenida mediante MTT (Figura 11). Los límites de valores de OD fueron estimados en $\geq 0,40$ y $\leq 0,65$ respectivamente. Para el control positivo, el límite superior de viabilidad fue establecido en el 60%, valor de corte para la clasificación de irritantes (Figura 11).

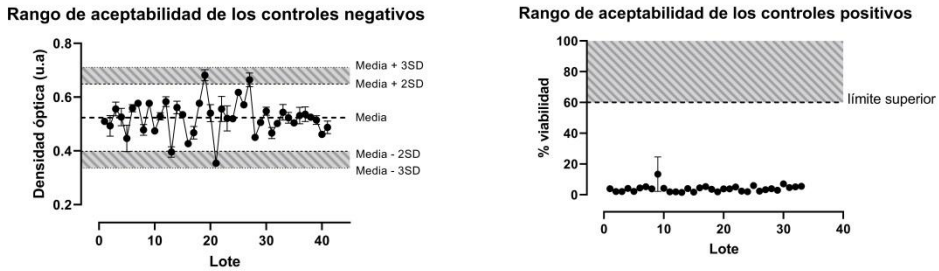


Figura 11: Rangos de aceptabilidad de los valores de control negativo y positivo

C1.4. Discusión

La necesidad de nuevos fármacos oftalmológicos que cubran las diferentes patologías está llevando a una mayor demanda de estudios de irritación y absorción ocular durante las primeras fases del desarrollo de fármacos[60]. En la actualidad, diferentes métodos alternativos *in vitro* que se asemejan a una córnea nativa se encuentran aceptados como TG de la OECD para determinar la toxicidad ocular[22]. Sin embargo, estos métodos solo se centran en el estudio de la viabilidad celular, mientras que generalmente se ignora la integridad del efecto barrera epitelial corneal, el principal factor limitante de la permeabilidad corneal y en consecuencia de la biodisponibilidad de fármacos.

En este capítulo, se ha desarrollado y caracterizado un nuevo modelo de epitelio corneal reconstruido a partir de células epiteliales humanas normales, habiendo demostrado que es posible reconstruir la estructura e integridad de la barrera de un epitelio corneal humano nativo, como se observa a través del estudio de los marcadores fenotípicos y la TEER. La morfología estructural de los modelos QobuR-RhCE se asemeja a un epitelio corneal humano nativo, donde la capa epitelial basal mantiene un fenotipo indiferenciado, mientras que los estratos superiores se encuentran terminalmente diferenciados. Esto se demuestra a través de la expresión de la proteína p63 y la citoqueratina 3 respectivamente, y está en consonancia con los modelos actuales desarrollados con células limbares humanas diferenciadas a córnea[61]. En QobuR-RhCE, se encuentran expresados los marcadores representativos de las tres diferentes familias de proteínas de unión. La β -catenina, una proteína de unión adherente que regula la organización de la activa y proporciona una fuerte adhesión mecánica[62], se encuentra

expresada en todo el epitelio, mientras que la conexina-43, un componente de las uniones gap que permiten la transferencia de componentes citosólicos de célula a célula, solo estaba presente en la capa suprabasal, de acuerdo con otros estudios[63]. Además, la zónula ocludens-1, un componente de las uniones estrechas, se puede localizar especialmente entre las células superficiales, lo que concuerda con los resultados de la TEER, ya que la función barrera depende en gran medida de la distribución de las proteínas de las uniones estrechas[64].

La presencia de uniones intercelulares en un modelo RhCE es esencial para contribuir al desarrollo de una función barrera adecuada[65], la cual debe ser monitorizada de forma rutinaria durante la producción de modelos RhCE, tal y como se describe en los estándares de desempeño[27]. En los métodos de referencia validados, la función barrera se controla mediante el uso de sustancias de referencia y la evaluación del tiempo de exposición (ET_{50}) o la concentración (IC_{50}) necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50%. En el modelo QobuR-RhCE se ha optado por monitorizar la función barrera utilizando la TEER, un método ampliamente aceptado para evaluar la integridad de la función barrera[39] que ya forma parte de los procedimientos de control de calidad en los métodos alternativos aceptados por la OECD para evaluar el daño ocular[21]. La evaluación rutinaria de la TEER durante la producción del modelo QobuR-RhCE ha permitido establecer un rango de aceptabilidad que se utilizó como control de calidad antes del uso de cada modelo. La individualización de la valoración de uso de los modelos permite refinar las evaluaciones de control de calidad, descartando únicamente los modelos QobuR-RhCE específicos que no cumplan con el rango de aceptabilidad, en lugar de descartar un lote entero como ocurre durante la evaluación del ET_{50} o IC_{50} , a la vez que se garantiza una homogeneidad en todos los modelos producidos.

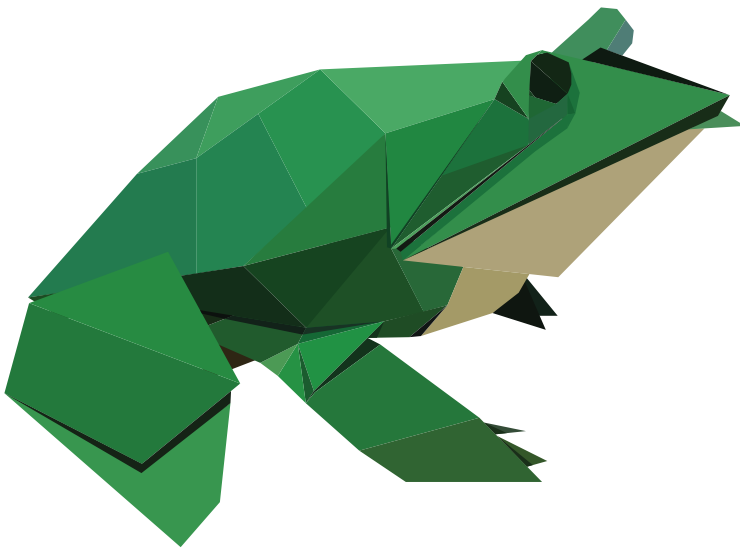
En este caso, la función barrera de los modelos QobuR-RhCE mostraron un incremento progresivo de la TEER durante el proceso de diferenciación en interfase aire-líquido, hasta alcanzar una meseta en torno a los $1500 \Omega\text{cm}^2$. Estos valores de TEER son superiores a otros los mostrados durante la diferenciación de otros modelos epiteliales[66–68], posiblemente debido a que estos modelos utilizan líneas celulares inmortalizadas en lugar de células corneales humanas

normales. Por otro lado, debido a que el epitelio corneal es una estructura que actúa como primera barrera mecánica y química frente a agentes externos, la integridad estructural juega un papel primordial en la regulación de la permeabilidad ocular[69]. De este modo, la integridad del efecto barrera es uno de los principales parámetros para evaluar los flujos de transporte en un modelo celular *in vitro*. Para ello, se ha propuesto que los modelos celulares de epitelio corneal con valores de TEER $> 400 \Omega\text{cm}^2$ son adecuados para el estudio del transporte de fármacos hidrofílicos y lipofílicos[70–72]. A lo largo de los años, diferentes modelos de epitelio corneal reconstruido han sido propuestos para la evaluación del transporte de fármacos: cultivos primarios de células de conejo[73,74], células corneales inmortalizadas de conejo[75,76], cultivos primarios de queratinocitos epidérmicos[77], células corneales humanas inmortalizadas[78–81] o células corneales humanas normales[61]. Sin embargo, solo unas pocas presentan datos confiables debido a que la mayoría presentan valores inadecuados de TEER, lo que conlleva a modelos epiteliales con alta permeabilidad. De acuerdo con Reichl, únicamente los modelos basados en HCE-T (una línea inmortalizada de células epiteliales corneales[82]) son los adecuados para los estudios de absorción transcorneal debido a sus valores de TEER [70]. Sin embargo, se ha demostrado que la línea celular HCE-T está compuesta por poblaciones celulares heterogéneas con alteraciones genómicas[83] y expresión diferencial de proteínas involucradas en el transporte celular[84], lo que lleva a valores de TEER y ratios de permeabilidad variables entre diferentes laboratorios[85,86] o bajo diferentes condiciones de cultivo[79,80]. Por tanto, los resultados utilizando esta línea celular deben ser tomados con mucha cautela en estudios de permeabilidad de fármacos. Por el contrario, el modelo QobuR-RhCE, al utilizar células corneales humanas normales para su producción, ha demostrado una alta reproducibilidad en el efecto barrera a lo largo de 4 años de producción.

Por tanto, con los resultados obtenidos en este capítulo, es posible sugerir que el modelo QobuR-RhCE, puede ser utilizado como método alternativo para la evaluación de la toxicidad ocular, las alteraciones del efecto barrera y la permeabilidad ocular, suponiendo un modelo todo-en-uno que puede resultar de utilidad en las etapas tempranas del desarrollo de nuevos fármacos oculares.

Capítulo 2

Desarrollo de un modelo de epidermis reconstruida



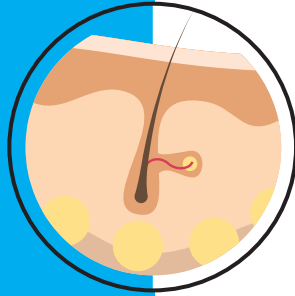
Xenopus laevis

17.806 utilizadas con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Capítulo 2

Resumen gráfico

QileX-RhE



Desarrollo de un modelo de epidermis reconstruida a partir de queratinocitos humanos

Caracterización fenotípica



Análisis de marcadores celulares por inmunofluorescencia

Caracterización del efecto barrera



Evaluación de la TEER durante la diferenciación celular y análisis del contenido lipídico del estrato córneo por HPTLC

Control de calidad



Evaluación de la morfología
Evaluación del efecto barrera
Evaluación de la viabilidad

C2.1. Introducción

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y su función principal es la de ejercer de barrera frente al medio externo. La piel protege al cuerpo humano de estímulos dañinos tales como antígenos, luz UV, toxinas, pequeñas partículas y productos químicos. La exposición a los productos químicos que se encuentran en los productos consumibles puede conllevar efectos adversos indeseados en la piel humana, los cuales pueden ser clasificados en función de su severidad y reversibilidad en irritación y corrosión cutáneas. Por este motivo, los productos de consumo tienen que asegurar su seguridad para la salud humana antes de ser comercializados a nivel generalista a través de rigurosos análisis toxicológicos. Con el objetivo de evaluar la irritación y corrosión cutánea, la OECD ha implementado el uso del test de Draize[58] en la TG 404[7]. En el test de Draize, los productos químicos son aplicados directamente sobre la piel de un animal de experimentación, teniendo el potencial de causar un gran malestar y dolor, lo cual plantea serias preocupaciones tanto éticas como relativas al bienestar animal. Debido a ello, las regulaciones internacionales apoyan el desarrollo y utilización de metodologías alternativas con el objetivo de reducir, refinar y reemplazar la experimentación animal y han llevado a la implementación de las OECD TG 430, 431, 435 y 439 como alternativas al uso de animales para la evaluación de la irritación y corrosión cutánea. El fomento del desarrollo de metodologías alternativas ha sido una decisión revolucionaria impulsada por la Unión Europea a través de la Regulación 1223/2009. La Regulación 1223/2009 implementó una prohibición gradual a la experimentación animal para la evaluación toxicológica de los productos cosméticos y sus ingredientes y una prohibición de la comercialización de productos cosméticos que contengan ingredientes que hubieran sido evaluados en animales, estando esta última vigente desde marzo de 2013[87]. A raíz de esta decisión, diversos países han seguido la estela de la Unión Europea y se han comprometido a una eliminación progresiva de la experimentación animal. Recientemente, la Agencia de Protección Medioambiental de EE.UU. se ha comprometido a la eliminación de la financiación de todos los estudios que contemplen experimentación en mamíferos para el año 2035[88].

Entre las alternativas para la evaluación de la irritación y corrosión cutánea se encuentran las OECD TG 439 y 431, las cuales hacen uso de ensayos *in vitro* basados en modelos RhE que se asemejan de manera histológica, morfológica, bioquímica y fisiológica a la parte superior de la piel humana, la epidermis[29,31]. Las últimas versiones de la OECD TG 431 (2019) y 439 (2021) contemplan el uso de 5 modelos RhE diferentes e independientemente validados para la evaluación de la irritación y corrosión cutánea: EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ RHE, LabCyte EPI-MODEL24 y epiCS® y 2 modelos RhE adicionales para la evaluación de la irritación cutánea: Skin+® y KeraSkin™. De entre estos modelos, se han realizado estudios formales de validación sobre los modelos EpiSkin™[89–91] y EpiDerm™[92–94], siendo referenciados como los métodos validados de referencia, los cuales han sido utilizados para el desarrollo de las TG. La validación del resto de modelos se ha realizado basándose en el análisis de productos químicos de referencia[95–102].

Sin embargo, todos estos modelos RhE están producidos y comercializados únicamente por 6 compañías, lo cual supone un alto grado de dependencia sobre las estrategias comerciales de los fabricantes para cumplir con los requisitos experimentales, dado que la producción de los modelos RhE está parcialmente basada en protocolos confidenciales y legalmente protegidos. A pesar de que la utilización de modelos RhE estandarizados fabricados bajo estrictos controles de calidad a partir de un único proveedor tiene indudables ventajas para el usuario final en cuanto a la reproducibilidad experimental, estas ventajas tienen que contraponerse al coste de adquisición de los modelos RhE y a la posible pérdida de calidad en el tejido debido largos periodos de envío. Por tanto, el desarrollo de nuevos modelos RhE bajo las premisas de la ciencia abierta, donde tanto la fabricación como los procedimientos son abiertamente accesibles sin restricciones legales, puede ayudar a promover la diseminación e implementación de alternativas a la experimentación animal, especialmente en aquellos países donde la importación de tejidos humanos se encuentre restringida.

El movimiento de ciencia abierta está centrado en hacer la investigación científica, incluyendo datos, metodologías, muestras y publicaciones, accesible a

todos los niveles de la sociedad[103]. En el año 2012, la Comisión Europea alentó a todos los estados miembros de la UE a hacer más accesibles al público general los resultados de las investigaciones financiadas públicamente con el objetivo de contribuir una ciencia mejor y más eficiente[104]. Siguiendo las disposiciones de la *Innovation Union*, una de las 7 iniciativas emblemáticas de la estrategia europea 2020, se ha perseguido eliminar los obstáculos a la innovación en los actuales estándares utilizados en la legislación europea con el fin de reforzar la colaboración entre los sectores públicos y privados. En el marco del desarrollo de nuevos métodos alternativos a la experimentación animal, ya se han dado algunos pasos mediante la validación de la evaluación de la irritación cutánea en un modelo abierto de RhE[105,106].

En el presente capítulo, se pretende contribuir al movimiento de la ciencia abierta mediante el desarrollo de un nuevo modelo RhE. Para ello, en este trabajo se describen detalladamente los protocolos para la fabricación extensiva de modelos QileX-RhE con el objetivo de ser utilizados como metodología alternativa a la experimentación animal para la evaluación de la irritación y corrosión cutánea.

C2.2. Diseño experimental

Desarrollo del modelo QileX-RhE

Para el desarrollo de los modelos QileX-RhE, se utilizaron células epidérmicas humanas de diferentes donantes (mujer de 19 años; mujer de 56 años; hombre de 40 años; mujer de 44 años y hombre de 39 años).

Análisis de la diferenciación celular mediante TEER

El análisis de la diferenciación celular durante el proceso de fabricación de los modelos QileX-RhE se realizó en 12 modelos independientes. Para ello, se analizó cada 24 horas las variaciones de la TEER utilizando un multímetro MilliCell-ERS2 (Merck) durante el curso de 20 días.

Caracterización del modelo QileX-RhE

Morfología y caracterización fenotípica

Las muestras de QileX-RhE fueron fijadas en formalina e incluidas en parafina. Las secciones histológicas fueron teñidas con hematoxilina-eosina para su evaluación morfológica. Para la evaluación inmunohistoquímica se utilizaron los marcadores citoqueratina 10, citoqueratina 14, p63, involucrina y loricrina (Tabla 9) siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

Tabla 9: Listado de anticuerpos utilizados para la caracterización fenotípica del modelo QileX-RhE

Anticuerpo	Referencia	Especie	Clonalidad	Dilución
Anticuerpos primarios				
Citoqueratina 10	Abcam Cat# ab76318; RRID:AB_1523465	Conejo	Monoclonal	1:100
Citoqueratina 14	Abcam Cat# ab7800; RRID:AB_306091	Ratón	Monoclonal	1:100
P63	Abcam Cat #ab124762; RRID:AB_10971840	Conejo	Monoclonal	1:100
Involucrina	Sigma-Aldrich Cat# I9018; RRID:AB_477129	Ratón	Monoclonal	1:100
Loricrina	Abcam Cat# ab85679; RRID:AB_2134912	Conejo	Policlonal	1:100
Anticuerpos secundarios				
Anti-ratón	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11034; RRID:AB_2576217	Cabra	Policlonal	1:500
Anti-conejo	Thermo Fisher Scientific Cat#A-11032; RRID:AB_2534091	Cabra	Policlonal	1:500

Caracterización de las clases lipídicas del estrato córneo

El contenido lipídico del modelo QileX-RhE fue analizado mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento por triplicado utilizando un *pool* de dos modelos QileX-RhE para cada uno.

Control de calidad del efecto barrera

La homogeneidad de la integridad del efecto barrera epitelial en los modelos QileX-RhE fue evaluado mediante el registro de los datos históricos de la TEER. Para ello, la TEER fue registrada durante los diferentes experimentos y el

valor medio y los límites de control para el uso de QileX-RhE fueron definidos en base al intervalo de confianza del 95%.

Control de calidad de la viabilidad celular

Los datos históricos obtenidos a lo largo del tiempo fueron recogidos y utilizados para establecer los límites de aceptabilidad de los valores de control negativo y control positivo. Para ello, se utilizó el porcentaje medio de viabilidad relativa del control positivo y la OD del control negativo, estableciendo en este último caso un intervalo de confianza del 95%.

C2.3. Resultados

Análisis de la diferenciación celular mediante TEER

La maduración de los modelos QileX-RhE fue monitorizada mediante mediciones de la TEER a intervalos de tiempo definidos. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 12. Al compararse los datos obtenidos en los diferentes tiempos, los valores de TEER aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo hasta alcanzar una meseta en torno al día 16 en valores cercanos a $2000 \Omega\text{cm}^2$.

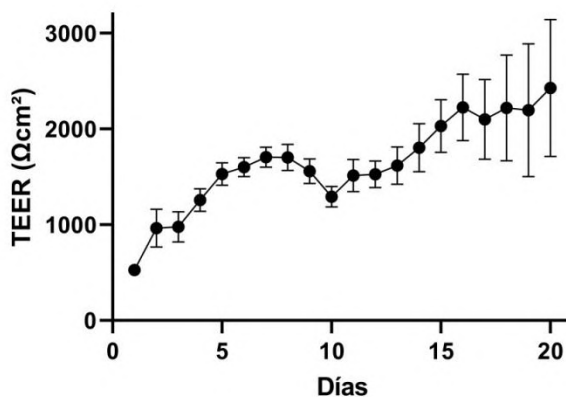


Figura 12: Variaciones en la TEER durante el proceso de diferenciación celular

Caracterización del modelo QileX-RhE

Morfología y caracterización fenotípica

El modelo QileX-RhE consiste en un epitelio pluriestratificado totalmente diferenciado con una morfología y marcadores de diferenciación similar a los encontrados en una epidermis humana normal. La expresión del marcador de diferenciación temprana citoqueratina 10 se puede observar en los estratos suprabasales mientras que el marcador citoqueratina 14 se encuentra localizado exclusivamente en el estrato basal. Además, la expresión del marcador de células progenitoras p63 se localizó preferentemente en los estratos basales, mientras que el marcador involucrina se encuentra expresado en todas las capas epiteliales. Por último, el marcador de diferenciación terminal loricrina se encuentra expresado en los estratos más superficiales (Figura 13).

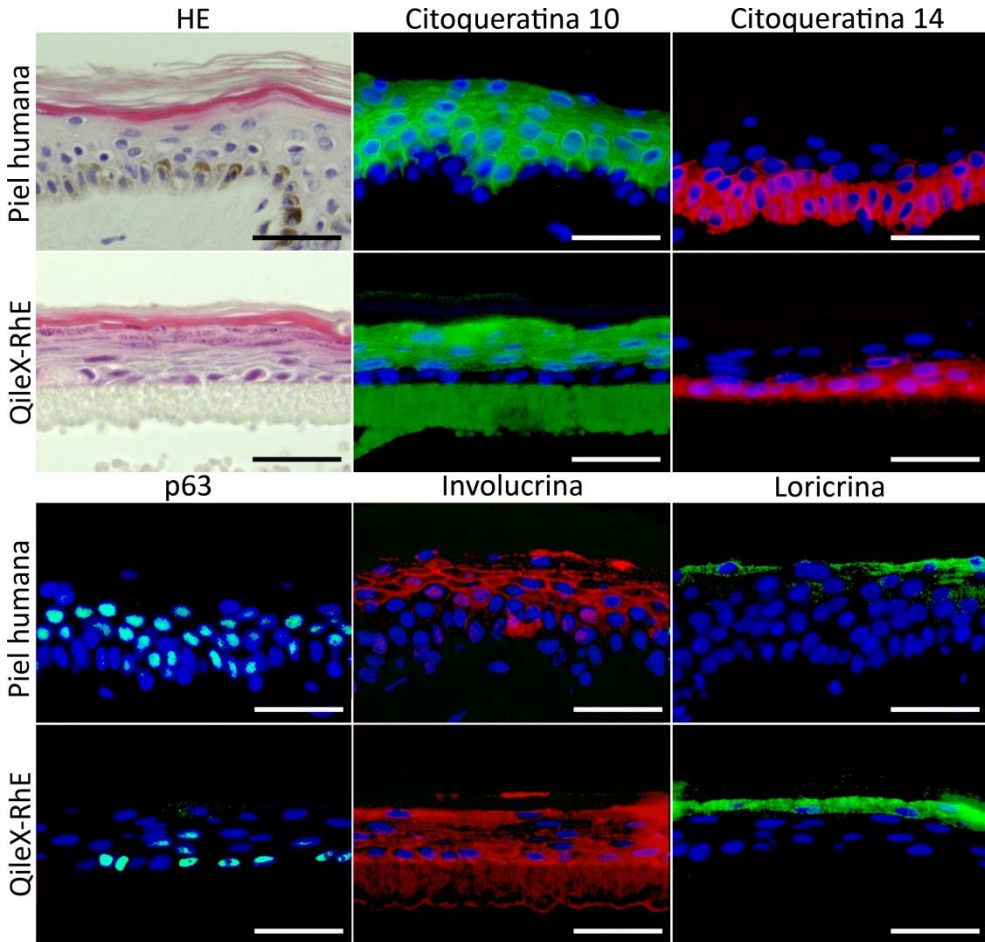


Figura 13: Caracterización fenotípica del modelo QileX-RhE

Caracterización de las clases lipídicas del estrato córneo

El contenido total de lípidos obtenido en los tres lotes analizados fue de $0,34 \pm 0,14$ mg/cm². El perfil lipídico del modelo QileX-RhE, así como su comparación con otros modelos RhE y con la epidermis nativa se muestra a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10: Comparativa del contenido lipídico del modelo QileX-RhE y los modelos SkinEthic RHE y EpiDerm® y la epidermis nativa

Lípidos	QileX-RhE	SkinEthic RHE*	EpiDerm®*	Epidermis*
Fosfolípidos	10,73 ± 1,8	17,0 ± 10,5	36,5 ± 2,7	36,5 ± 4,1
Lipofosfatidilcolina	0,1 ± 0,1	-	-	-
Esfingomielina	1,7 ± 0,3	2,8 ± 1,3	8,2 ± 1,5	8,9 ± 1,6
Fosfatidilcolina	3,0 ± 0,6	6,4 ± 3,8	13,6 ± 2,4	11,2 ± 0,8
Fosfatidilserina	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,7	3,2 ± 0,7	3,9 ± 0,3
Fosfatidilinositol	0,6 ± 0,2	1,8 ± 1,2	4,3 ± 0,8	2,2 ± 0,8
Fosfatidiletanolamina	4,1 ± 0,8	4,9 ± 4,0	7,1 ± 1,6	10,3 ± 0,8
Fosfatidilglicerol	0,6 ± 0,1	-	-	-
Sulfato de colesterol	3,7 ± 0,4	3,8 ± 2,0	5,8 ± 1,2	5,0 ± 1,6
Ceramidas	26,0 ± 0,6	26,5 ± 12,2	18,5 ± 3,5	12,1 ± 1,8
Ácidos grasos libres	5,9 ± 1,7	6,9 ± 3,9	2,6 ± 0,5	7,8 ± 1,2
Colesterol	28,1 ± 0,7	19,5 ± 9,5	14,8 ± 1,3	17,7 ± 3,2
Monoacilglicéridos	2,4 ± 0,4	-	-	-
Di-triglicéridos	16,2 ± 1,6	12,6 ± 8,6	10,5 ± 2,2	8,9 ± 3,7
Esteres de colesterol	6,0 ± 1,8	6,5 ± 4,4	2,7 ± 1,1	7,0 ± 0,4

*Datos extraídos de Ponc et al. 2002[107].

El perfil lipídico reveló que las principales clases lipídicas epidérmicas están presentes en el modelo QileX-RhE, incluyendo fosfolípidos, sulfato de colesterol, ceramidas, ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos y ester de colesterol.

El contenido global de fosfolípidos se determinó en un 10,73% ± 1,80%, un contenido porcentualmente menor que el descrito en la epidermis nativa, pero similar al descrito en el modelo SkinEthic RHE (17,0% ± 10,5%). De la misma manera, las diferentes clases de fosfolípidos se identificaron de nuevo en una proporción muy similar al modelo SkinEthic RHE, con ligeras diferencias en comparación con la epidermis nativa. Asimismo, es de destacar la identificación de lipofosfatidilcolina (0,1% ± 0,1%) y de fosfatidilglicerol (0,6 ± 0,1) en el modelo QileX-RhE, no habiendo sido descritos en otros modelos RhE ni en la epidermis humana.

Por otro lado, el contenido en ceramidas se determinó en un $26,0\% \pm 0,6\%$, un contenido mayor que el descrito en la epidermis humana normal ($12,1\% \pm 1,8\%$), pero de nuevo muy similar al modelo SkinEthic RHE ($26,5\% \pm 12,0\%$).

En cuanto al contenido de colesterol, el modelo QileX-RhE mostró un mayor contenido porcentual ($28,1\% \pm 0,7\%$) que los modelos SkinEthic RHE y EpiDerm® ($19,5\% \pm 9,5\%$ y $14,8\% \pm 1,3\%$ respectivamente) y la epidermis humana nativa ($17,7\% \pm 3,2\%$). Del mismo modo, el contenido en di-triglicéridos del modelo QileX-RhE ($16,24\% \pm 1,56\%$) es ligeramente superior al descrito en los modelos SkinEthic RHE y EpiDerm® ($12,6\% \pm 8,6\%$ y $10,5\% \pm 2,2\%$ respectivamente) y la epidermis humana normal ($8,9\% \pm 3,7\%$).

Por último, el contenido en sulfato de colesterol ($3,7\% \pm 0,4\%$), ácidos grasos libres ($5,9\% \pm 1,7\%$) y esteres de colesterol ($6,0\% \pm 1,8\%$) fue muy similar al descrito en el resto de modelos RhE y en la epidermis humana normal.

Control de calidad del efecto barrera

De acuerdo con los análisis estadísticos de los datos históricos de la TEER en los modelos QileX-RhE producidos, los límites mínimos y máximos de los valores de TEER se establecieron en ≥ 600 y $\leq 2500 \Omega\text{cm}^2$ respectivamente (Figura

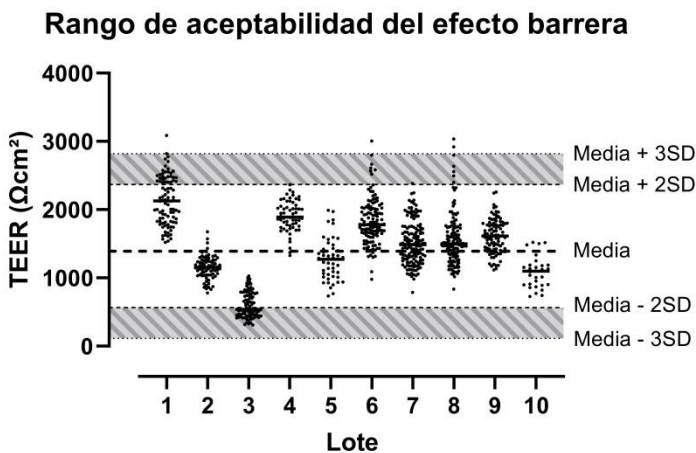


Figura 14: Datos históricos de la TEER de los modelos QileX-RhE

14).

Tabla 11: Datos históricos de la TEER de los modelos QileX-RhE. SD: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación

Lote	TEER	SD	CV
1	2132,85	353,32	16,57
2	1151,71	164,14	14,69
3	603,13	185,66	30,78
4	1905,86	223,15	11,71
5	1271,10	304,16	23,93
6	1826,74	341,69	18,71
7	1513,20	315,94	20,88
8	1572,05	386,79	24,60
9	1612,21	245,69	15,24
10	1081,66	229,03	21,17

TEER: Resistencia eléctrica transepitelial; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

Control de calidad de la viabilidad celular

Los límites superiores e inferiores fueron estadísticamente estimados de acuerdo a los datos históricos de los modelos tratados con control negativo (Figura 15). Los límites de valores de OD fueron estimados en $\geq 0,40$ y $\leq 0,70$ respectivamente. Para el control positivo, el límite superior de viabilidad fue establecido en el 50%, valor de corte para la clasificación de irritantes (Figura 15).

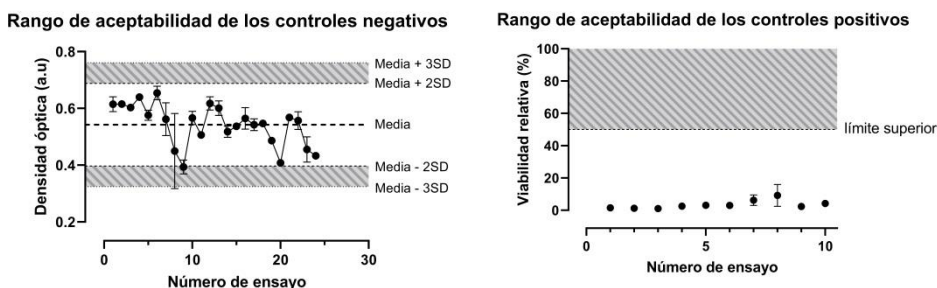


Figura 15: Rangos de aceptabilidad de los controles negativos y positivos

C2.4. Discusión

Debido a la implementación del sistema de clasificación GHS en la Unión Europea, y siguiendo los principios de la Directiva 2010/63/EU relativa a la protección de los animales utilizados con fines científicos, el desarrollo de metodologías alternativas para la evaluación de peligros para la salud humana es hoy en día una prioridad temática en la Unión Europea[108].

Con el objetivo de incrementar la disponibilidad de modelos RhE, en este trabajo se ha desarrollado y caracterizado un modelo RhE divulgando toda la información para permitir una producción extensiva y reproducible de modelos. A pesar de que diversos modelos RhE están comercialmente disponibles en varias compañías, su producción está parcialmente basada en protocolos confidenciales o legalmente protegidos, por lo que la diseminación de alternativas a la experimentación animal está limitada por la disponibilidad e intereses comerciales. Como se ha visto en el pasado con el modelo Skin2 ZK 1350, depender de modelos comerciales para evaluar peligros para la salud humana puede comprometer el trabajo de laboratorio debido al cese en la producción[109]. Por este motivo, en beneficio de laboratorios de pequeño y mediano tamaño que raramente puedan costear la adquisición continua de modelos comerciales, en este trabajo se comparten abiertamente los protocolos para la producción del modelo QileX-RhE, con la intención de ampliar el abanico de métodos alternativos disponibles y permitiendo una mayor independencia de proveedores comerciales, contribuyendo de esta manera al movimiento de ciencia abierta que lidera la investigación europea.

Para la expansión de los queratinocitos, se ha optado por un sistema de doble medio de cultivo. En un primer paso, los queratinocitos fueron cultivados en presencia de células murinas 3T3 utilizando la metodología clásica de expansión descrita por Rheinwald y Green[110]. Esta metodología permite obtener un mayor rendimiento en el cultivo primario de queratinocitos a la vez que mantiene un fenotipo indiferenciado[111]. Seguidamente, los queratinocitos fueron expandidos en un medio comercial definido en ausencia de células *feeder*. En este trabajo, se ha optado por eliminar la expansión sobre células *feeder* en una segunda etapa de cultivo para reducir la posibilidad de contaminaciones cruzadas

con células murinas durante la producción de modelos QileX-RhE. Utilizando esta metodología, se han obtenido 10 viales congelados a partir de una biopsia inicial de piel humana, y de cada vial se han podido producir hasta 200 modelos QileX-RhE mediante la siembra de 50.000 células/cm² en una superficie de 1,12 cm². Esto significa que, con la metodología aquí descrita y siguiendo las recomendaciones para la evaluación de la irritación cutánea, se hace posible evaluar hasta 66 productos químicos por triplicado, incluyendo controles positivos y negativos en cada lote, y por consiguiente un total de 660 productos químicos utilizando una única biopsia de 2-3 cm² de piel humana.

En cuanto a la estructura morfológica, los modelos QileX-RhE reflejan la estructura normal de una epidermis normal, observándose un epitelio escamoso pluriestratificado queratinizado estructurado en estrato basal, espinoso, granular y córneo. En los epitelios pluriestratificados, la expresión de citoqueratinas responde a un patrón complejo que está altamente regulado por los programas de diferenciación celular[112]. Los estratos basales proliferativos expresan citoqueratina 5 y 14, las cuales son progresivamente reemplazadas por citoqueratina 1 y 10 en el caso de la piel humana[113]. Los modelos QileX-RhE muestran este mismo patrón de expresión de citoqueratinas, con la expresión de citoqueratina 14 localizada exclusivamente en el estrato basal y citoqueratina 10 en los estratos suprabasales, demostrando que el modelo desarrollado muestra un patrón de diferenciación altamente especializado. Por otro lado, la expresión de la proteína del factor de transcripción p63, homólogo del p53, se define como un marcador de células madre de queratinocitos que participa en el mantenimiento de una población de células basales y en la diferenciación terminal de los epitelios pluriestratificados[114,115]. En el modelo QileX-RhE, el p63 se encuentra preferencialmente expresado en el estrato basal, sugiriendo un fenotipo indiferenciado en el estrato basal, el cual progresivamente se pierde durante la diferenciación celular. Por último, el modelo QileX-RhE también expresa involucrina y loricrina, las cuales contribuyen a la formación del estrato córneo y al desarrollo del principal mecanismo de protección de la epidermis, el efecto barrera[116,117].

En los modelos RhE, el efecto barrera es un parámetro crítico que debe reflejar las propiedades de la piel humana normal para ser considerados de utilidad para la evaluación de la toxicidad cutánea[118]. Esto se debe a que cualquier compuesto debe ser capaz de atravesar el estrato córneo antes de afectar a la capa de células viables. El estrato córneo es el estrato superior de la epidermis, el cual está compuesto por corneocitos, enriquecidos en proteínas, incrustados en una matriz intercelular enriquecida en lípidos[119]. Para la correcta formación del estrato córneo, es por tanto necesaria la presencia de las principales clases lipídicas (colesterol, ceramidas y ácidos grasos libres). El análisis del contenido lipídico del estrato córneo muestra que las principales clases lipídicas se encuentran presentes en el modelo QileX-RhE, aunque en distinta proporción que en la epidermis humana. Recientes estudios muestran que, en un estrato córneo sano, el colesterol representa el 27% de la composición lipídica total, las ceramidas un 50% y los ácidos grasos libres un 10-15%[120,121], resultados que difieren de lo obtenido por Ponec et al. en su estudio de 2002 al analizar epidermis humana normal[107] y que han sido utilizados como comparativa en este estudio. Estas diferencias en la composición lipídica del estrato córneo pueden ser explicadas debido a que la composición lipídica varía en función de la región anatómica analizada[122]. Los resultados obtenidos tras el análisis del modelo QileX-RhE muestran un contenido de colesterol del 28%, un contenido en ceramidas del 26% y un contenido en ácidos grasos libres del 6%. En base a estos resultados se observa como el contenido en ceramidas es notablemente inferior a lo observado en un estrato córneo sano (50%), sin embargo, muy similar a lo encontrado en el modelo SkinEthic RHE (26,5%) y superior a lo encontrado en el modelo EpiDerm® (18,5%). Las ceramidas son el principal componente lipídico de las lamelas que se encuentran en los espacios intercelulares del estrato córneo, siendo estas las responsables de proporcionar el efecto barrera de la epidermis[123]. De este modo, en base al contenido en ceramidas, es posible que el efecto barrera del modelo QileX-RhE sea inferior al de una piel humana normal; no obstante, sería igual o superior al de otros modelos RhE.

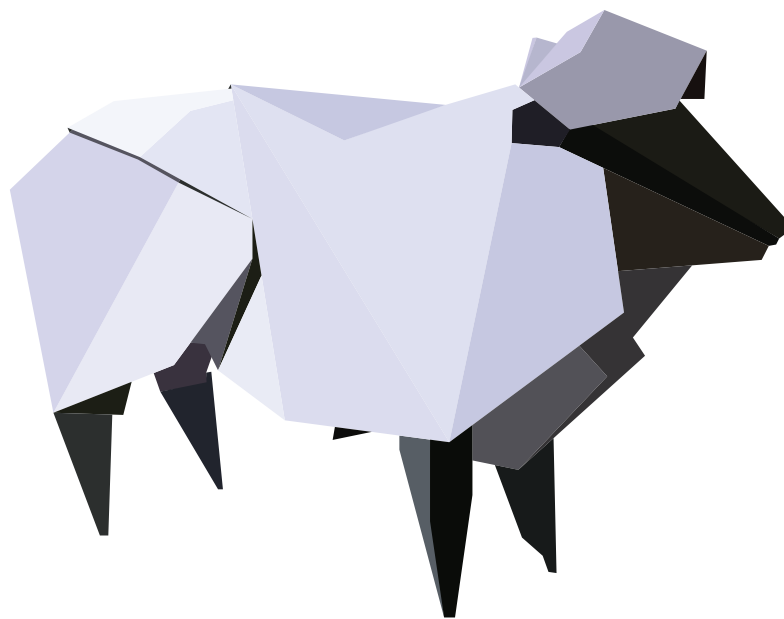
Generalmente, el efecto barrera es evaluado mediante la estimación de la resistencia a la penetración rápida de determinados compuestos citotóxicos como el SLS o el Triton X-100 en una muestra representativa de cada lote[124,125]. En el

caso de los modelos QileX-RhE, se ha optado por la evaluación individualizada del efecto barrera mediante la TEER, una medida ampliamente aceptada para la evaluación de la integridad de las uniones intercelulares que se puede correlacionar con la integridad del efecto barrera[39]. Mediante la evaluación de la TEER en cada modelo QileX-RhE antes de su utilización en posteriores ensayos, en lugar de la convencional estimación del IC_{50} o EC_{50} en una muestra representativa de cada lote, se hace posible la individualización de los controles de calidad para los modelos QileX-RhE. En este trabajo, se han obtenido valores de TEER de $1467 \pm 451 \Omega\text{cm}^2$, lo cual permite establecer un rango de utilización entre 600 y $2500 \Omega\text{cm}^2$. No obstante, estos valores han sido obtenidos únicamente a través del estudio de 10 lotes de QileX-RhE, lo cual hace esperable que, tras aumentar el número de lotes producidos, los actuales límites establecidos puedan verse ligeramente modificados. No obstante, los valores de TEER de los modelos QileX-RhE se encuentran en el mismo rango que los modelos utilizados en los métodos RhE validados para la evaluación de la irritación y corrosión cutánea (EpiDermTM: $510 \pm 120 \Omega\text{cm}^2$; EpiSkinTM: $10.360 \pm 5020 \Omega\text{cm}^2$; SkinEthicTM RHE: $18.530 \pm 3000 \Omega\text{cm}^2$; KeraskinTM: $>500 \Omega\text{cm}^2$)[126,127] y los modelos a los que aún les falta la aprobación regulatoria (DESEs: $> 1000 \Omega\text{cm}^2$)[128], por lo que es esperable que el desempeño del modelo QileX-RhE en la evaluación de la irritación y corrosión cutánea cumpla con los requisitos establecidos por la OECD para ser utilizado como método RhE.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este estudio, es posible considerar al modelo QileX-RhE como un modelo relevante para su utilización como una alternativa a la experimentación con animales en los ensayos de evaluación de la irritación y corrosión cutánea.

Capítulo 3

Pre-validación del
modelo QobuR-RhCE
para la evaluación de
la irritación ocular y el
daño ocular severo



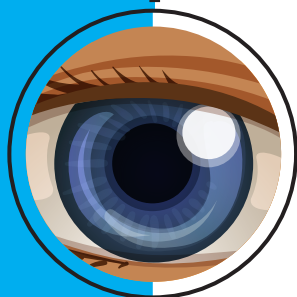
Ovis orientalis

17.489 utilizadas con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Capítulo 3

Resumen gráfico

QobuR-RhCE



Evaluación de la utilidad del modelo de epitelio corneal reconstruido para la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo

Evaluación de la irritación ocular / daño ocular severo



Evaluación de 30 compuestos químicos de referencia por duplicado en tres lotes de tejido

Evaluación de las variaciones en el efecto barrera



Determinación mediante la evaluación de la TEER de compuestos que alteran la barrera epitelial

Método acorde a los requisitos establecidos por la OECD



93,3% de sensibilidad
60% de especificidad
76,6% de precisión

C3.1. Introducción

Los peligros que suponen para la salud ocular el uso y manipulación de cualquier materia prima incluida en productos farmacéuticos, cosméticos y químicos, han de ser debidamente evaluados, identificados y etiquetados. Durante muchos años, el test *in vivo* de irritación ocular de Draize representó el único ensayo aprobado por la OECD para la evaluación del daño ocular. La prueba de irritación ocular de Draize consiste en la aplicación de una dosis única en uno de los ojos de un animal de experimentación y la puntuación de las lesiones irritantes en la conjuntiva, la córnea y el iris a intervalos específicos[129]. Sin embargo, en las últimas décadas, cambios sociales motivados por el bienestar de los animales están contribuyendo a la disminución de los ensayos *in vivo* con animales en favor de métodos de ensayo alternativos. A raíz de la Directiva europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados con fines científicos[14], la Unión Europea ha puesto en vigor el marco normativo para la eliminación progresiva de los ensayos con animales, prohibiendo el uso de animales para ensayos de toxicidad en productos cosméticos[87]. Esto ha llevado al desarrollo de métodos alternativos para sustituir el test de irritación ocular de Draize y a su adopción para distinguir entre productos causantes de irritación ocular/daño ocular severo (Categoría 1 y Categoría 2) y no irritantes (sin categoría) según el sistema GHS[130]. Actualmente, las metodologías alternativas aprobadas por la OECD para la sustitución de los ensayos con animales son la TG 437: Ensayo de opacidad y permeabilidad en córnea bovina[131]; la TG 438: Ensayo de ojo de pollo aislado[132]; la TG 460: Ensayo de fuga de fluoresceína[133]; la TG 491: Ensayo de exposición a corto plazo[134]; la TG 492: Ensayo de RhCE[22] y la TG 494: Ensayo de irritación ocular en vitrigel[21].

Entre ellos, los métodos de ensayo RhCE son una de las recomendaciones para su uso como primer paso dentro de una estrategia *Bottom-Up* en el marco de ensayos escalonados según la metodología IATA[9]. En los modelos RhCE, las células se cultivan sobre insertos en interfase aire-líquido, dando lugar a un epitelio estratificado en 3D que refleja la estructura, la morfología y el metabolismo del epitelio corneal humano. Hasta la fecha, la TG 492 incluye cuatro métodos de ensayo validados que utilizan modelos RhCE: el EpiOcular™ (MatTek, Massachusetts, EE.UU.)[77,135], el SkinEthic HCE (SkinEthic, Lyon, Francia)[136],

el MCTT HCE™ (Keraskin, Seúl, Corea)[137] y el Labcyte CORNEA-MODEL (J-TEC, Miyakitadori, Japón)[138].

El objetivo principal de este capítulo es establecer un nuevo método de ensayo *in vitro* utilizando el modelo QobuR-RhCE. El modelo QobuR-RhCE es un modelo de RhCE desarrollado en el marco de esta tesis doctoral que consiste en células epiteliales corneales humanas normales cultivadas en interfase aire-líquido, formando un epitelio escamoso estratificado que se asemeja a un epitelio corneal humano nativo en su microestructura morfológica, expresión de biomarcadores y propiedades de efecto barrera[57]. En este capítulo se presentan los componentes esenciales del método de ensayo y se evalúa el desempeño del modelo QobuR-RhCE como método alternativo para la evaluación de los peligros para la salud ocular en base a los estándares de desempeño para la evaluación de nuevas propuestas de ensayo *in vitro* basadas en RhCE[27]. Adicionalmente, en este capítulo se introduce el uso de la TEER como medida de control de calidad y como punto final secundario para complementar la evaluación de la irritación y evaluar las alteraciones en la integridad del efecto barrera.

En definitiva, el trabajo de este capítulo resume el estudio de pre-validación del modelo QobuR-RhCE para la identificación de productos químicos que no requieren clasificación ni etiquetado para la irritación ocular o el daño ocular severo.

C3.2. Diseño experimental

Componentes esenciales del método de ensayo

Morfología

Muestras aleatorias de QobuR-RhCE obtenidas de diferentes lotes de tejido fueron evaluadas histológicamente. En todos los casos, se evaluó el número de capas celulares y la ausencia de una superficie queratinizada de acuerdo con las recomendaciones de la OECD.

Control de calidad del efecto barrera

Los datos de la TEER de los modelos producidos fueron recogidos durante los diferentes experimentos y contrastados con los datos históricos de producción. Solamente los modelos cuyos valores se encontraron dentro de los límites establecidos fueron utilizados en los subsiguientes ensayos de evaluación de la irritación.

Control de calidad de la viabilidad celular

La OD del control negativo y el porcentaje medio de viabilidad del control positivo fue evaluado y contrastado con los datos históricos de producción. Solo los experimentos cuyos valores se encontraron dentro de los límites establecidos fueron calificados para su inclusión en la evaluación del desempeño.

Ensayo de irritación ocular e integridad epitelial

Productos químicos

Todos los productos químicos (Tabla 12) fueron seleccionados de la lista mínima de productos químicos de referencia recomendados para la evaluación de los estándares de desempeño para propuestas similares o modificadas de RhCE. Adicionalmente, agua destilada filtrada y *methyl acetate* (CASRN: 79-20-9) fueron incluidos en cada ensayo como control negativo y control positivo respectivamente.

Tabla 12: Productos químicos de referencia utilizados para la evaluación del modelo QobuR-RhCE.

Nº	Producto químico	CASRN	In vivo GHS	Estado
1	<i>(Ethylenediamine-propyl)-trimethoxysilane</i>	1760-24-3	CAT 1	Líquido
2	<i>Methylthioglycolate</i>	2365-48-2	CAT 1	Líquido
3	<i>Hydroxyethyl acrylate</i>	818-61-1	CAT 1	Líquido
4	<i>1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one</i>	2634-33-5	CAT 1	Sólido
5	<i>2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol</i>	110-03-2	CAT 1	Sólido
6	<i>Disodium 2,2'-([1,1'-biphenyl]-4,4'-diyldivinylene)bis-(benzenesulphonate)</i>	27344-41-8	CAT 1	Sólido
7	<i>Sodium oxalate</i>	62-76-0	CAT 1	Sólido
8	<i>2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide, N,N''-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-,di-D-gluconate (20%</i>	18472-51-0	CAT 2A	Líquido

Capítulo 3

Nº	Producto químico	CASRN	In vivo GHS	Estado
	<i>aqueous</i>)			
9	<i>gamma-Butyrolactone</i>	96-48-0	CAT 2A	Líquido
10	<i>2-Amino-3-hidroxypyridine</i>	16867-03-1	CAT 2A	Sólido
11	<i>Sodium benzoate</i>	532-32-1	CAT 2A	Sólido
12	<i>2-Methyl-1-pentanol</i>	105-30-6	CAT 2B	Líquido
13	<i>Diethyl toluamide</i>	134-62-3	CAT 2B	Líquido
14	<i>1,4-Dibutoxy benzene</i>	104-36-9	CAT 2B	Sólido
15	<i>2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2.2.1]heptane</i>	79-92-5	CAT 2B	Sólido
16	<i>1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate</i>	342573-75-5	NC	Líquido
17	<i>2-Ethoxyethyl methacrylate</i>	2370-63-0	NC	Líquido
18	<i>3-Phenoxybenzyl alcohol</i>	13826-35-2	NC	Líquido
19	<i>4-(Methylthio)-benzaldehyde</i>	3446-89-7	NC	Líquido
20	<i>Dipropyl disulphide</i>	629-19-6	NC	Líquido
21	<i>Ethyl thioglicolate</i>	623-51-8	NC	Líquido
22	<i>Piperonyl butoxide</i>	51-03-6	NC	Líquido
23	<i>Polyethylene glycol (PEG-40) hydrogenated castor oil</i>	61788-85-0	NC	Viscoso
24	<i>1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea</i>	101-20-2	NC	Sólido
25	<i>2,2'-[[3-Methyl-4-[(4-nitrophenyl)azo]-phenyl]imino]bis-ethanol</i>	3179-89-3	NC	Sólido
26	<i>2,2'-Methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol</i>	103597-45-1	NC	Sólido
27	<i>4,4'-Methylene bis-(2,6-di-tert-butylphenol)</i>	118-82-1	NC	Sólido
28	<i>Cellulose,2-(2-hydroxy-3-(trimethylammonium)propoxy)ethyl ether chloride (91%)</i>	68610-92-4	NC	Sólido
29	<i>Potassium tetrafluoroborate</i>	14075-53-7	NC	Sólido
30	<i>Trisodium mono-(5-(1,2-dihydroxyethyl)-4-oxido-2-oxo-2,5-dihydro-furan-3-yl)phosphate</i>	66170-10-3	NC	Sólido

CAT 1: Categoría 1; CAT 2: Categoría 2; NC: Sin Categoría; CASRN: Chemical Abstracts Service Registry Number; GHS: Globally Harmonized System.

Todos los compuestos químicos fueron evaluados antes de su uso para comprobar la reducción directa del MTT o la interferencia del color. En los casos que procedieron, los valores finales de viabilidad se corrigieron adecuadamente utilizando controles de tejido vivo y muerto por congelación, de acuerdo con los protocolos descritos en la OECD TG 492.

Evaluación de la fiabilidad y precisión

La viabilidad relativa se calculó para cada uno de los duplicados para cada uno de los productos químicos evaluados como el porcentaje de viabilidad en relación al control negativo (100% de viabilidad). Las alteraciones de la integridad epitelial se calcularon como un porcentaje relativo al valor inicial de la TEER de cada modelo.

Para predecir la irritación ocular y las alteraciones de la barrera a partir de los datos de viabilidad y TEER, se utilizó un umbral del 60%. Si la viabilidad media tras el ensayo era superior al 60%, la sustancia se consideró no irritante o “sin categoría” según el sistema GHS. Del mismo modo, si los valores de TEER eran superiores al 60%, la sustancia se consideró como no disruptiva de la integridad epitelial. Por el contrario, si los valores de viabilidad o de TEER eran iguales o inferiores al 60%, la sustancia se consideró irritante o disruptiva de la integridad epitelial respectivamente.

La precisión, la especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad intra-laboratorio se calcularon de acuerdo a los estándares de desempeño de la OECD para la evaluación de nuevos métodos de ensayo basados en RhCE para la evaluación del daño ocular[27]. La reproducibilidad intra-laboratorio se evaluó analizando la concordancia entre los resultados de los diferentes ensayos. Los resultados se consideraron concordantes si la viabilidad relativa o la TEER estaban bien por encima o por debajo del límite del 60% en los 3 ensayos calificados. La decisión final para los 30 productos químicos se basó en el promedio de la viabilidad relativa y la TEER.

Las variaciones entre los protocolos de los métodos validados de referencia y QobuR-RhCE se encuentran resumidas en la Tabla 13.

Tabla 13: Comparación de las metodologías de los métodos validados de referencia y QobuR-RhCE

Protocolo	EpiOcular™ EIT		SkinEthic™ HCE EIT		LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT		QobuR-RhCE	
	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos
Superficie del modelo	0,6 cm ²		0,5 cm ²		0,3 cm ²		0,6 cm ²		1,12 cm ²	
Exposición										
Pre-tratamiento	20 µL PBS durante 30 min									
Dosis	50µL (83,3 µg/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²)	10 µL PBS + 30 µL (60µg/cm ²)	30 µL PBS + 30 mg (60 mg/mL)	50 µL (167 µg/cm ²)	10 mg (33 mg/cm ²)	40µL (67 µg/cm ²)	40 µL PBS + 40 mg (67 mg/cm ²)	90 µL (80,4 µg/cm ²)	50 µL PBS + 90 mg (80 mg/cm ²)
Tiempo de exposición	30 min a 37 °C	6 h a 37 °C	30 min a 37 °C	4 h a 37 °C	1 min a RT	24 h a 37 °C	10 min a 37 °C	3 h a 37 °C	30 min a RT	4 h a RT
Lavado	3 veces en 100 mL PBS		20 ml PBS	25 mL PBS	10 veces en PBS		4 veces en PBS	4 veces en 10 mL PBS	6 veces en 60 mL PBS	
Post-exposición										
Post-exposición (inmersión)	12 min a RT	25 min a RT	30 min a 37 °C	30 min a RT					12 min a RT	
Post-exposición (incubación)	2 h a 37 °C	18 h a 37 °C		18 h a 37 °C	24 h a 37 °C		16 h a 37 °C		2 h a 37 °C	18 h a 37 °C
Controles										
Control -	50 µL H ₂ O		30 µL PBS	30 µL PBS	50 µL PBS	Sin tratar	40 µL PBS		90 µL H ₂ O	
Control +	50 µL Methyl acetate		50 µL Methyl acetate	50 µL Methyl acetate	50 µL Ethanol	10 mg Lauric acid	40 µL Methyl acetate		90 µL Methyl acetate	
Evaluación de la viabilidad										
Sal retrazolio	300 µL MTT 1 mg/mL		300 µL MTT 1 mg/mL	300 µL MTT 1 mg/mL	300 µL WST-8		300 µL WST-1		1 mL MTT 0,5 mg/mL	
Tiempo de incubación	3 h		3 h	3 h	4 h		3 h		3 h	

Protocolo	EpiOcular™ EIT		SkinEthic™ HCE EIT		LabCyte CORNEA-MODELz4 EIT		MCTT HCE™ EIT		QobuR-RhCE	
	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos
Solvente de extracción	2 mL isopropanol		1,5 mL isopropanol						1 mL DMSO	
Tiempo de extracción	2-3 h a RT		4 h a RT	Al menos 2 h a RT					15 min a RT	
Criterio de aceptación										
Tejido	100 µL 0,3% Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min		30 min SDS (50 µL) 1 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/mL		60 min SDS (25 µL) 1 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4 mg/mL		50 µ 0,3% Triton X-100 17,6 min ≤ ET ₅₀ ≤ 41,0 min		750 Ωcm ² ≤ QobuR-RhCE ≤ 2500 Ωcm ²	TEER
Criterios de aceptación										
OD media de los replicados tratados con C-	> 0,8 y < 2,8		> 1 y ≤ 2,5		≥ 0,5 y ≤ 1,3		≥ 1,6 y ≤ 3,0		≥ 0,4 y ≤ 0,65	
Viabilidad media de los replicados tratados con C+ expresados como % del C-	< 50%		≤ 30%		≤ 40%		≤ 35%		≤ 60%	
Replicados	Diferencia entre viabilidad entre duplicados < 20%		Diferencia entre viabilidad entre duplicados < 20%		SD entre triplicados ≤ 18		Diferencia entre viabilidad entre duplicados < 20%		Diferencia entre viabilidad entre duplicados < 20%	

PBS: Tampón fosfato salino; RT: Temperatura ambiente; C-: Control negativo; C+: Control positivo; OD: Densidad óptica; SD: Desviación estándar. Tabla modificada a partir de la TG 492 de la OECD.

Criterios de calidad y aceptación

En caso de no cumplir el criterio de aceptación descrito en la Tabla 13, los modelos QobuR-RhCE fueron directamente descartados. En caso de no cumplir alguno de los criterios de calidad descritos en la tras la finalización del ensayo, los resultados se consideraron no aceptables y se requirió un nuevo ensayo.

La decisión final de irritante/disruptor epitelial se consideró en base a los valores medios de viabilidad y TEER de tres ensayos independientes que cumplieron los criterios de calidad y aceptación. Si algún ensayo particular reflejaba una decisión no concordante con la clasificación generada por el resto de ensayos del mismo compuesto, se realizó un ensayo adicional en el caso de que la decisión final divergiera de la clasificación mayoritaria. Si la decisión final en las series no concordantes estaba de acuerdo con la clasificación mayoritaria, no se consideró necesario realizar un ensayo adicional.

C3.3. Resultados

Criterios de aceptación

La calidad y reproducibilidad de los modelos QobuR-RhCE fue sistemáticamente controlada antes de la liberación de un lote mediante la monitorización de la histología, integridad epitelial siguiendo las recomendaciones de los estándares de desempeño. Adicionalmente, la viabilidad de los controles positivos y negativos incluidos en cada ensayo, fue monitorizada y evaluado su ajuste al rango determinado en base a los datos históricos.

Integridad epitelial (TEER)

Los datos de integridad epitelial de cada modelo QobuR-RhCE utilizados en cada ensayo de pre-validación se muestra en la Figura 16.

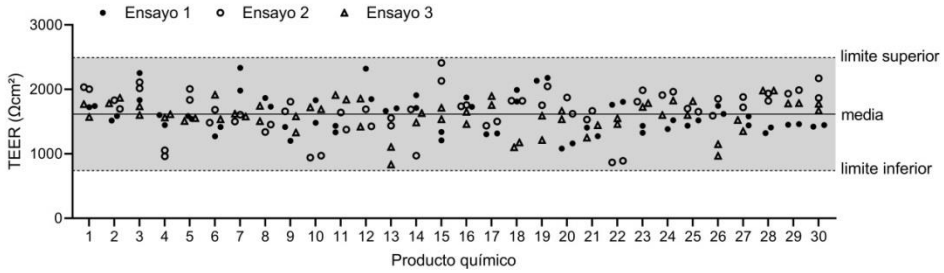


Figura 16: Valores de TEER de cada modelo QobuR-RhCE utilizado en los ensayos de pre-validación

Viabilidad celular

Los valores de control negativo y positivo de los ensayos incluidos en el estudio de pre-validación se muestran en la Figura 17. En este estudio, el ensayo número 7 no cumplió con los criterios de aceptación para los valores de control negativo y por consiguiente fue considerado como un ensayo no calificado siendo sus resultados no tenidos en cuenta.

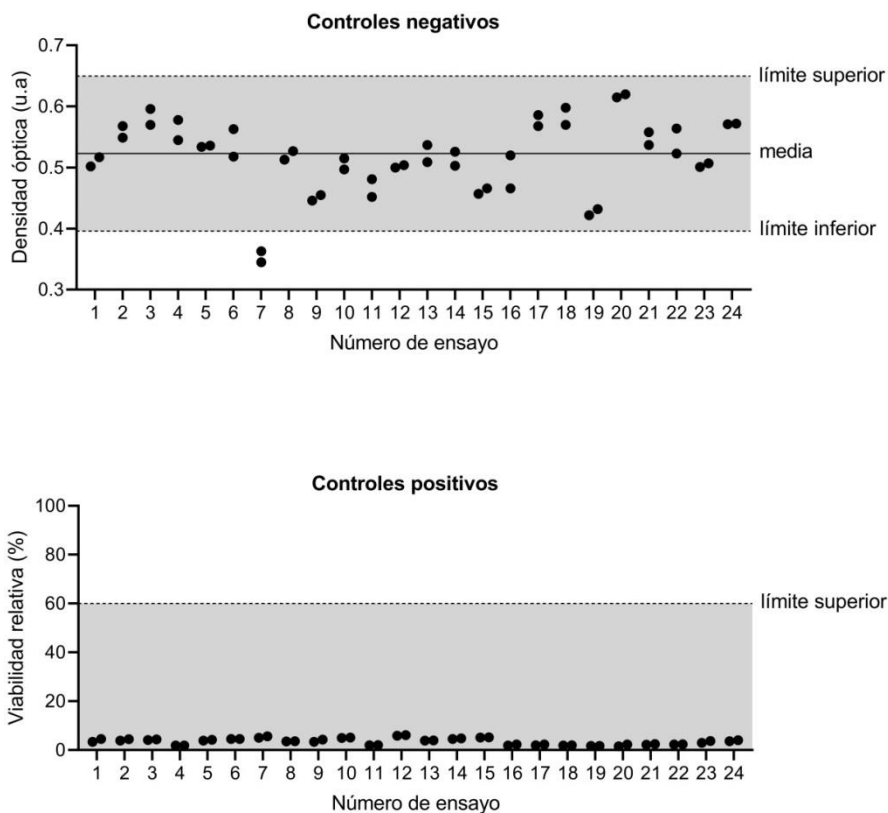


Figura 17: Valores de control negativo y positivo de cada modelo QobuR-RhCE utilizados en los ensayos de pre-validación

Evaluación de la irritación ocular e integridad epitelial

Los resultados de la viabilidad relativa y la TEER se presentan a continuación en la Figura 18 y en la Tabla 14.

Tabla 14: Resultados de viabilidad y TEER del modelo QobuR-RhCE tras el ensayo de irritación ocular e integridad epitelial. Las celdas coloreadas indican una decisión de irritante/disruptor epitelial.

Nº		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Concordancia	Media	Decisión
1	Viabilidad	26,04 ± 2,41	32,24 ± 0,70	33,23 ± 3,14	Si	30,54 ± 3,92	I
	TEER	34,44 ± 6,12	31,97 ± 2,32	54,28 ± 14,71	Si	40,23 ± 12,23	DE
2	Viabilidad	23,75 ± 12,21	32,54 ± 12,99	38,87 ± 5,09	Si	31,72 ± 7,59	I
	TEER	5,49 ± 0,93	11,00 ± 1,15	4,78 ± 0,68	Si	7,09 ± 3,41	DE
3	Viabilidad	1,64 ± 0,11	52,18 ± 4,68	1,60 ± 0,07	Si	18,48 ± 29,19	I
	TEER	1,07 ± 1,04	20,19 ± 3,41	13,27 ± 0,19	Si	11,51 ± 9,68	DE
4	Viabilidad	2,31 ± 0,21	1,83 ± 0,36	3,82 ± 0,21	Si	2,65 ± 1,04	I
	TEER	12,93 ± 2,65	24,20 ± 2,37	23,28 ± 1,45	Si	20,14 ± 6,26	DE
5	Viabilidad	2,73 ± 0,17	2,26 ± 0,30	2,06 ± 0,11	Si	2,35 ± 0,34	I
	TEER	15,14 ± 0,36	11,10 ± 0,19	16,65 ± 0,62	Si	14,30 ± 2,84	DE
6	Viabilidad	10,25 ± 8,64	37,28 ± 2,68	3,26 ± 1,08	Si	16,93 ± 17,97	I
	TEER	9,46 ± 0,01	13,94 ± 1,57	17,82 ± 3,29	Si	13,74 ± 4,18	DE
7	Viabilidad	3,07 ± 0,13	2,96 ± 0,71	1,90 ± 0,03	Si	2,64 ± 0,65	I
	TEER	14,81 ± 1,29	10,26 ± 0,49	17,24 ± 0,24	Si	14,10 ± 3,54	DE
8	Viabilidad	2,76 ± 0,07	1,65 ± 0,06	3,60 ± 0,02	Si	2,67 ± 0,98	I
	TEER	0,53 ± 1,05	13,32 ± 0,73	15,61 ± 0,56	Si	9,82 ± 8,13	DE
9	Viabilidad	3,42 ± 0,27	53,65 ± 0,32	9,25 ± 6,67	Si	22,11 ± 27,47	I
	TEER	0,23 ± 0,65	14,82 ± 0,29	3,26 ± 0,16	Si	6,10 ± 7,70	DE
10	Viabilidad	36,53 ± 0,68	14,40 ± 2,12	55,90 ± 5,27	Si	35,61 ± 20,77	I
	TEER	17,59 ± 3,11	24,36 ± 0,28	25,86 ± 4,27	Si	22,61 ± 4,41	DE
11	Viabilidad	1,48 ± 0,06	1,39 ± 0,05	1,29 ± 0,04	Si	1,38 ± 0,10	I
	TEER	12,44 ± 1,69	10,75 ± 0,36	15,13 ± 0,70	Si	12,77 ± 2,21	DE
12	Viabilidad	3,40 ± 0,19	4,22 ± 0,10	3,74 ± 0,17	Si	3,79 ± 0,41	I
	TEER	1,16 ± 0,86	10,23 ± 0,17	15,82 ± 2,97	Si	9,07 ± 7,40	DE
13	Viabilidad	5,93 ± 0,71	4,10 ± 0,06	4,43 ± 0,20	Si	4,82 ± 0,97	I
	TEER	11,69 ± 1,47	14,84 ± 1,15	20,30 ± 3,95	Si	15,61 ± 4,36	DE
14	Viabilidad	112,09 ± 9,63	121,57 ± 9,43	128,54 ± 0,71	Si	120,73 ± 8,26	NI
	TEER	62,94 ± 9,54	67,26 ± 16,16	87,67 ± 4,47	Si	72,62 ± 13,21	NDE
15	Viabilidad	4,42 ± 2,53	11,55 ± 4,79	31,40 ± 13,33	Si	15,79 ± 13,98	I
	TEER	16,98 ± 1,47	12,76 ± 0,65	11,23 ± 1,10	Si	13,66 ± 2,98	DE
16	Viabilidad	74,58 ± 8,47	67,20 ± 12,19	48,19 ± 6,13	No	63,32 ± 13,62	NI

Capítulo 3

N°		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Concordancia	Media	Decisión
	TEER	17,34 ± 5,82	15,27 ± 1,29	26,52 ± 1,12	Si	19,71 ± 5,99	DE
17	Viabilidad	33,68 ± 1,18	19,90 ± 3,16	18,64 ± 3,49	Si	24,07 ± 8,34	I
	TEER	16,15 ± 0,85	23,19 ± 1,28	24,83 ± 0,06	Si	21,39 ± 4,61	DE
18	Viabilidad	17,06 ± 0,38	17,72 ± 1,34	21,25 ± 3,06	Si	18,68 ± 2,25	I
	TEER	1,96 ± 0,11	13,86 ± 1,49	23,08 ± 3,40	Si	12,97 ± 10,59	DE
19	Viabilidad	120,69 ± 2,45	108,06 ± 5,82	110,80 ± 11,52	Si	113,18 ± 6,65	NI
	TEER	75,20 ± 8,36	89,12 ± 4,13	53,88 ± 3,27	No	72,74 ± 17,75	NDE
20	Viabilidad	17,03 ± 8,01	48,91 ± 0,90	13,04 ± 0,24	Si	26,33 ± 19,66	I
	TEER	17,50 ± 0,36	40,01 ± 1,01	36,87 ± 2,01	Si	31,46 ± 12,19	DE
21	Viabilidad	37,75 ± 8,66	25,18 ± 0,94	9,29 ± 12,42	Si	24,07 ± 14,26	I
	TEER	4,24 ± 0,27	5,28 ± 2,57	4,28 ± 0,97	Si	4,60 ± 0,59	DE
22	Viabilidad	138,23 ± 1,13	140,51 ± 0,94	116,79 ± 2,22	Si	131,84 ± 13,09	NI
	TEER	99,88 ± 7,19	100,18 ± 3,09	81,12 ± 2,59	Si	93,73 ± 10,92	NDE
23	Viabilidad	94,67 ± 1,60	98,82 ± 3,66	87,88 ± 10,63	Si	93,79 ± 5,52	NI
	TEER	95,19 ± 3,19	100,13 ± 0,92	66,16 ± 24,88	Si	87,16 ± 18,36	NDE
24	Viabilidad	110,61 ± 0,89	106,91 ± 1,73	127,01 ± 0,67	Si	114,85 ± 10,70	NI
	TEER	103,58 ± 5,54	67,34 ± 12,40	80,43 ± 16,79	Si	83,78 ± 18,35	NDE
25	Viabilidad	6,06 ± 4,23	2,74 ± 8,85	10,99 ± 2,41	Si	6,59 ± 4,15	I
	TEER	77,16 ± 7,87	85,84 ± 0,88	68,19 ± 8,83	Si	77,06 ± 8,82	NDE
26	Viabilidad	92,12 ± 2,59	91,95 ± 2,95	96,98 ± 0,03	Si	93,68 ± 2,85	NI
	TEER	112,98 ± 4,16	135,57 ± 6,79	104,27 ± 9,63	Si	117,60 ± 16,15	NDE
27	Viabilidad	102,37 ± 4,60	103,73 ± 4,17	98,40 ± 1,71	Si	101,50 ± 2,77	NI
	TEER	118,24 ± 1,81	143,63 ± 26,85	109,36 ± 5,85	Si	123,74 ± 17,79	NDE
28	Viabilidad	61,62 ± 6,48	98,59 ± 5,39	71,96 ± 0,81	Si	77,39 ± 19,07	NI
	TEER	61,73 ± 21,67	46,07 ± 1,09	37,01 ± 23,77	No	48,27 ± 12,50	DE
29	Viabilidad	93,22 ± 4,10	88,15 ± 6,22	82,95 ± 5,76	Si	88,11 ± 5,13	NI
	TEER	127,58 ± 11,12	121,16 ± 14,55	93,03 ± 1,43	Si	113,93 ± 18,38	NDE
30	Viabilidad	2,96 ± 0,75	57,24 ± 2,04	48,99 ± 6,39	Si	36,40 ± 29,25	I
	TEER	0,37 ± 0,19	20,38 ± 4,24	16,87 ± 1,45	Si	12,54 ± 10,69	DE

I: Irritante; NI: No irritante; DE: Disruptor epitelial; NDE: No disruptor epitelial.

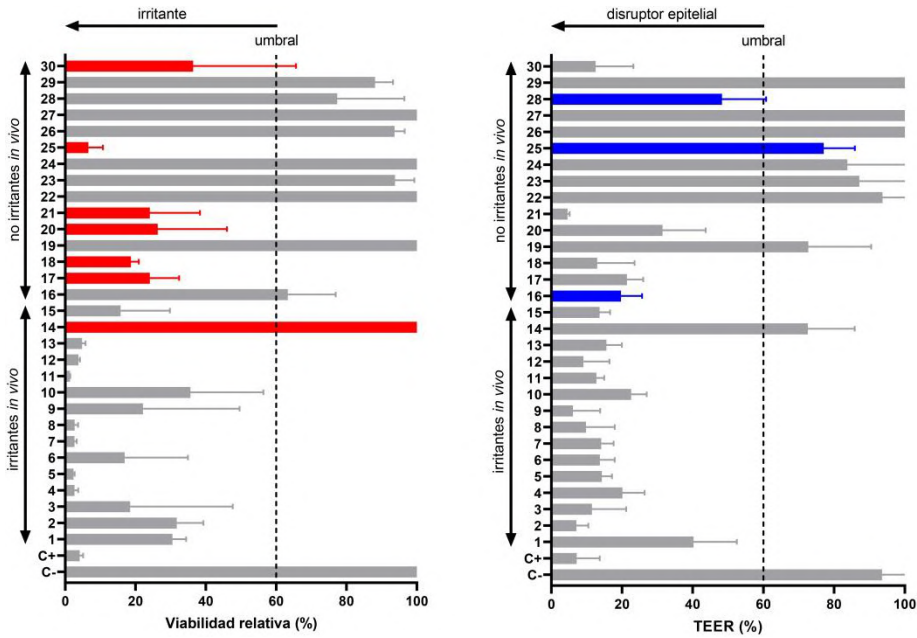


Figura 18: Resultados de viabilidad relativa y TEER tras la aplicación de los productos químicos sobre QobuR-RhCE en tres lotes por duplicado. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. La línea de puntos indica el umbral para la determinación de compuestos que causan irritación/daño ocular severo en base a la viabilidad celular y disrupciones en la integridad epitelial en base a la TEER. El color rojo indica una falsa predicción en base a la viabilidad. El color azul indica una clasificación discordante entre los datos de viabilidad y TEER.

Los resultados muestran la clasificación inequívoca de 20 productos químicos como irritantes y 10 productos químicos como no irritantes, con un producto químico, el *1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate* (N° 16), produciendo resultados no concordantes. En estos resultados se observa como un producto químico, el *1,4-Dibutoxy benzene* (N° 14), clasificado como irritante *in vivo*, se predijo como no irritante, lo que indica una tasa de falsos negativos del 6,7%. Además, 6 sustancias químicas no irritantes *in vivo* (N° 17, N° 18, N° 20, N° 21, N° 25 y N° 30) se predijeron como irritantes, lo que indica una tasa de falsos positivos del 40%. Por lo tanto, la sensibilidad, la especificidad, la precisión y la variabilidad intra-laboratorio fue del 93,3%, 60%, 76,7% y 96,7% respectivamente.

Adicionalmente, se predijeron 21 sustancias químicas como disruptivas de la integridad epitelial según la TEER, con 2 sustancias químicas (N° 19 y N° 28)

produciendo resultados no concordantes, lo que llevó a una reproducibilidad intra-laboratorio del 93,3%.

C3.4. Discusión

Las nuevas propuestas de métodos de ensayo utilizando RhCE basados en los mismos principios científicos y que predicen el mismo efecto biológico son considerados metodologías *me-too* y deben cumplir con los estándares de desempeño descritos en la OECD TG 492 para evaluar su relevancia como herramienta de cribado. Dado que el modelo QobuR-RhCE se basa en los mismos principios y basa sus predicciones en el mismo efecto biológico, en este estudio evaluamos su desempeño como herramienta de cribado para el daño ocular.

La evaluación de la fiabilidad y la capacidad de predicción del modelo QobuR-RhCE se realizó utilizando las 30 sustancias químicas de referencia detalladas en los estándares de desempeño[27]. El método de ensayo QobuR-RhCE demostró una sensibilidad del 93,3%, una especificidad del 60% y una precisión del 76,7%, cumpliendo así los criterios de sensibilidad $\geq 90\%$, especificidad $\geq 60\%$ y precisión $\geq 75\%$ establecidos en los estándares de desempeño[27]. Además del análisis de viabilidad celular para la predicción de la irritabilidad, se ha incluido el análisis de la TEER para la identificación de disrupciones en el efecto barrera epitelial, ya que es una metodología que no interfiere con la evaluación de la viabilidad y puede proporcionar información adicional para la evaluación de la seguridad de nuevos productos. En este estudio, se observa que el *1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate* (N° 16) y el *Cellulose,2-(2-hydroxy-3-(trimethylammonium)propoxy)ethyl ether chloride (91%)* (N° 28) fueron identificados como disruptores epiteliales a pesar de haber sido identificados como no-irritantes con el ensayo de viabilidad y de ser considerados no-irritantes a través de ensayos *in vivo*. Sin embargo, el producto químico N° 16 produjo una falsa positividad durante el tercer ensayo de viabilidad y también ha inducido falsas positividades durante los ensayos de validación de diferentes RhCE validados[137,139]. Lo mismo puede decirse del producto químico N° 28, el cual indujo disrupciones en el efecto barrera epitelial en los ensayos 2 y 3, con resultados limítrofes en el ensayo 1. Aunque en este caso no se observó ninguna falsa positividad para este producto químico, el informe de validación del modelo

RhCE LabCyte Corneal-Model24 mostró a este producto como irritante en todos sus ensayos realizados en tres laboratorios diferentes[139] y está considerado como un resultado limítrofe en el modelo RhCE EpiOcular EIT ($62,6 \pm 3,1$) con resultados discordantes obtenidos en uno de los laboratorios que participaron en el estudio[27]. Esto sugiere que estos productos químicos tienen un impacto directo sobre la integridad epitelial y podrían conducir en algunos casos a la irritación ocular.

Curiosamente, el 2,2'-[[3-Methyl-4-[(4-nitrophenyl)azo]-phenyl]imino]bis-ethanol (N° 25), un compuesto no-irritante de acuerdo a los ensayos *in vivo*[140], mostró los resultados opuestos; se predijo como irritante en todas los ensayos de viabilidad celular sin que se observaran disrupciones en el efecto barrera epitelial en ninguno de los ensayos. Este producto químico también se predijo como irritante en el modelo corneal LabCyte24[139] y el EpiOcular EIT[27] con resultados discordantes en el MCTT HCE[137]. Esto podría atribuirse al hecho de que el producto químico N° 25 es un compuesto coloreado que interfiere absorbiendo la luz en el mismo rango que el formazán del MTT y a su vez es un reductor directo del MTT, por lo que durante la evaluación del producto deben incluirse tanto controles de tejido vivo como de tejido muerto congelado para obtener adecuadamente un valor de viabilidad corregido. Esto podría haber conducido a predicciones erróneas de la viabilidad celular y, por consiguiente, a la clasificación errónea de su potencial irritante. Sin embargo, a través de la evaluación de la integridad del efecto barrera mediante la TEER, al no haberse observado alteraciones en la estructura corneal, puede ser sugerido que el producto químico N° 25 es un verdadero falso negativo en los ensayos de viabilidad.

De este modo, la TEER dentro de las metodologías de ensayo actuales sugiere un potencial beneficio con su implementación. Si bien es posible que su utilización no resulte en una mejora directa en la precisión general de la predicción de la irritación, es posible que su uso pueda ser de utilidad para detectar sustancias químicas que deban ser verificadas utilizando una metodología de ensayo diferente con el objetivo de predecir adecuadamente los daños oculares en el caso de que los resultados entre la TEER y la viabilidad celular sean no concordantes en los métodos de ensayo basados en RhCE.

Al igual que los métodos de ensayo RhCE validados, la principal limitación del modelo QobuR-RhCE es que no es capaz de distinguir entre efectos oculares reversibles (GHS Categoría 2) e irreversibles (GHS Categoría 1). Sin embargo, se están desarrollando una serie de nuevos métodos de ensayo, basados en el uso de RhCE, con el fin de predecir con precisión las diferentes respuestas irritantes[18,20]. Estos métodos basan su predicción en la evaluación del tiempo requerido para provocar una respuesta tóxica en el RhCE o en la determinación de la expresión de diferentes biomarcadores, metodologías que podrían ser fácilmente transferidas al método QobuR-RhCE o a cualquier otro método basado en RhCE.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este estudio, es posible considerar al modelo QobuR-RhCE como apto para un estudio de validación multilaboratorio utilizando un mayor número de productos químicos, con el objetivo de validar formalmente el método de ensayo como una alternativa a la experimentación con animales.

Capítulo 4

Pre-validación del modelo QileX-RhE para la evaluación de la irritación cutánea



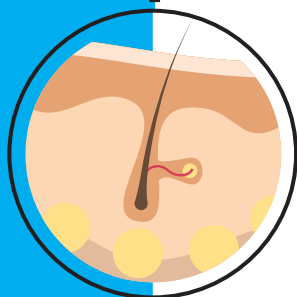
Mesocricetus auratus

17.355 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Capítulo 4

Resumen gráfico

QileX-RhE



Evaluación de la utilidad del modelo de epidermis reconstruida para la evaluación de la irritación cutánea

Evaluación de la irritación cutánea



Evaluación de 20 compuestos químicos de referencia por triplicado en tres lotes de tejido

Evaluación de las variaciones en el efecto barrera



Determinación mediante la evaluación de la TEER de compuestos que alteran la barrera epitelial

Método acorde a los requisitos establecidos por la OECD



90% de sensibilidad
70% de especificidad
80% de precisión

C4.1. Introducción

La prohibición en la EU de la experimentación animal para la evaluación de los productos cosméticos y sus ingredientes en el año 2013 ha supuesto un incremento en la utilización de métodos alternativos para la evaluación de los procesos de irritación cutánea. En el año 2010, la OECD adoptó los métodos basados en RhE para la evaluación de la irritación cutánea dentro de la TG 439[29], fomentando el desarrollo de nuevos modelos RhE desde entonces. Para facilitar su validación e implementación, se han descrito los estándares de desempeño que han de cumplir cualquier nuevo método basado en modelos RhE en el Documento de guía N° 220[30]. En este documento, se describen y detallan los parámetros funcionales (morfología, efecto barrera, viabilidad, reproducibilidad y criterios de calidad), los parámetros procedurales, los productos químicos de referencia y la evaluación del desempeño (capacidad predictiva y confiabilidad) que deben cumplir los nuevos modelos RhE para su utilización como método predictivo de la irritación cutánea. Hasta la fecha, siete modelos RhE se encuentran incluidos en la TG 439 de la OECD como métodos validados de referencia para la evaluación de la irritación cutánea: EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ SIT (EPI 200), SkinEthic RHE™, LabCyte EPI-MODEL24 SIT, epiCS®, Skin+® y KeraSkin™ SIT[29].

El objetivo principal de este capítulo es establecer un nuevo método de ensayo *in vitro* utilizando el modelo QileX-RhE. QileX-RhE es un nuevo modelo de RhE, desarrollado en el marco de la presente tesis doctoral, generado a partir de la expansión y diferenciación de queratinocitos humanos normales obtenidos a partir de muestras de piel humana. QileX-RhE se compone de un epitelio pluriestratificado queratinizado altamente diferenciado y organizado en estratos basal, espinoso, granuloso y córneo, presentando una adecuada función barrera evaluada a través de la TEER[141]. En este capítulo se presentan los componentes esenciales del método de ensayo y se evalúa el desempeño del modelo QileX-RhE como método alternativo para la evaluación de los peligros relativos a la irritación cutánea en base a los estándares de desempeño para la evaluación de nuevas propuestas de ensayo *in vitro* basadas en RhE[30]. De forma adicional, al igual que en el modelo QobuR-RhCE, en este capítulo se hace uso de la TEER como medida de control de calidad y como criterio de punto final secundario, y complementario

a la evaluación de la irritación, para la evaluación de las alteraciones en la integridad del efecto barrera.

En definitiva, el trabajo de este capítulo resume el estudio de pre-validación del modelo QileX-RhE para la identificación de productos químicos causantes de procesos de irritación cutánea.

C4.2. Diseño experimental

Ensayo de irritación cutánea e integridad epitelial

Productos químicos

Todos los productos químicos (Tabla 15) fueron seleccionados de la lista mínima de productos químicos de referencia recomendados para la evaluación de los estándares de desempeño para propuestas similares o modificadas de RhE[30]. Adicionalmente, PBS y SLS 5% fueron incluidos en cada ensayo como control negativo y control positivo respectivamente.

Tabla 15: Productos químicos de referencia utilizados para la evaluación de la irritación cutánea en el modelo QileX-RhE.

Nº	Producto químico	CASRN	In vivo GHS	Estado
1	<i>1-Bromo-4-chlorobutane</i>	6940-78-9	NC	Líquido
2	<i>Diethyl phthalate</i>	84-66-2	NC	Líquido
3	<i>Naphthalene acetic acid</i>	86-87-3	NC	Sólido
4	<i>Allylphenoxy-acetate</i>	7493-74-5	NC	Líquido
5	<i>Isopropanol</i>	67-63-0	NC	Líquido
6	<i>4-Methyl-thio-benzaldehyde</i>	3446-89-7	NC	Líquido
7	<i>Methyl stearate</i>	112-61-8	NC	Sólido
8	<i>Heptyl butyrate</i>	5870-93-9	NC	Líquido
9	<i>Heptyl salicylate</i>	6259-76-3	NC	Líquido
10	<i>Cinnamaldehyde</i>	104-55-2	NC	Líquido
11	<i>1-Decanol</i>	112-30-1	CAT 2	Líquido
12	<i>Cyclamen aldehyde</i>	103-95-7	CAT 2	Líquido
13	<i>1-Bromohexane</i>	111-25-1	CAT 2	Líquido
14	<i>2-Chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine</i> HCl	86604-75-3	CAT 2	Sólido
15	<i>Di-n-propyl disulphide</i>	629-19-6	CAT 2	Líquido

N°	Producto químico	CASRN	In vivo GHS	Estado
16	<i>Potassium hydroxide (5% aq.)</i>	1310-58-3	CAT 2	Líquido
17	<i>Benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl</i>	7340-90-1	CAT 2	Líquido
18	<i>1-Methyl-3-phenyl-1-piperazine</i>	5271-27-2	CAT 2	Sólido
19	<i>Heptanal</i>	111-71-7	CAT 2	Líquido
20	<i>Tetrachloroethylene</i>	127-18-4	CAT 2	Líquido

CASRN: Chemical Abstract Service Registry Number; GHS: Globally Harmonized System; NC: Sin categoría; CAT 2: Categoría 2.

Todos los compuestos fueron evaluados por triplicado en tres réplicas experimentales. Cuando fue requerido, se realizaron correcciones sobre los valores de viabilidad celular utilizando controles de tejido vivo y controles de tejido muerto congelado según correspondiera de acuerdo con los protocolos descritos en la OECD TG 439.

Evaluación de la fiabilidad y precisión

La viabilidad relativa se calculó, para cada uno de los triplicados en cada uno de los productos químicos evaluados, como el porcentaje de viabilidad en relación al control negativo (100% de viabilidad). Las alteraciones de la integridad epitelial se calcularon como un porcentaje relativo al valor inicial de la TEER de cada modelo.

Para predecir la irritación cutánea y las alteraciones de la barrera a partir de los datos de viabilidad y TEER, se utilizó un umbral del 50%. Si la viabilidad media tras el ensayo era superior al 50%, la sustancia se consideró no irritante o “Sin Categoría” según el sistema GHS. Del mismo modo, si los valores de TEER eran superiores al 50%, la sustancia se consideró como no disruptiva de la integridad epitelial. Por el contrario, si los valores de viabilidad eran iguales o inferiores al 50%, la sustancia se consideró irritante o “Categoría 2” según el sistema GHS. Asimismo, si los valores de TEER eran iguales o inferiores al 50%, la sustancia se consideró como disruptiva de la integridad epitelial.

La precisión, la especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad intra-laboratorio se calcularon de acuerdo a los estándares de desempeño de la OECD para la evaluación de nuevos métodos de ensayo basados en RhE para la evaluación de la irritación cutánea[30]. La reproducibilidad intra-laboratorio se evaluó analizando la concordancia entre los resultados de los diferentes ensayos.

Capítulo 4

Los resultados se consideraron concordantes si la viabilidad relativa o la TEER estaban bien por encima o por debajo del límite del 50% en los 3 ensayos calificados. La decisión final para los 20 productos químicos se basó en el promedio de la viabilidad relativa y la TEER.

Las variaciones entre los protocolos de los métodos validados de referencia y QileX-RhE se encuentran resumidas en la Tabla 16.

Tabla 16: Comparación de las metodologías de los métodos validados de referencia y QileX-RhE

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthnic RHE™	LabCyte EPI- MODEL24 SIT	epiCS®	Skin+®	KeraSkin™ SIT	QileX-RhE
Pre-incubación								
Tiempo de incubación	18-24 h	18-24 h	≥ 2 h	15-30 h	4 h u overnight	2 h u overnight	20-24 h	2 h
Volumen de medio	2 mL	0,9 mL	0,3-1 mL	0,5 mL	1 mL	1 mL	0,9 mL	1 mL
Aplicación de productos químicos								
Líquidos	10 µL (26 µL/cm ²)	30 µL (47 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)	25 µL (83 µL/cm ²)	30 µL (50 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)	40 µL (67 µL/cm ²)	50 µL (45 µL/cm ²)
Sólidos	10 mg (26 mg/cm ²) + H ₂ O (5 µL)	25 mg (39 mg/cm ²) + PBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm ²) + H ₂ O (10 µL)	25 mg (83 mg/cm ²) + H ₂ O (25 µL)	30 mg (50 mg/cm ²) + PBS (50 µL)	16 mg (32 mg/cm ²) + H ₂ O (10 µL)	40 mg (67 mg/cm ²) + PBS (40 µL)	50 mg (45 mg/cm ²) + PBS (50 µL)
Uso de maya de nylon	No	Solo si es necesario	Si	No	Si	Si	No	No
Tiempo de aplicación	15 minutos	60 minutos	42 minutos	15 minutos	20 minutos	42 minutos	30 minutos	15 minutos
Temperatura de aplicación	RT	RT 25 minutos y 37 °C 35 minutos	RT	RT	RT	RT	37 °C	RT
Post-incubación								
Volumen de medio	2 mL	0,9 mL x 2	2 mL	1 mL	1 mL	2 mL	0,9 mL	1 mL x 2
Solución MTT	2 mL 0,3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	500 µL 0,5 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 0,5 mg/mL	300 µL 0,4 mg/mL	1 mL 0,5 mg/mL

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI- MODEL24 SIT	epiCS®	Skin+®	KeraSkin™ SIT	QileX-RhE
Criterios de aceptación								
OD media de las réplicas tratadas con C-	$\geq 0,6$ y $\leq 1,5$	$\geq 0,8$ y $\leq 2,8$	$\geq 0,8$ y ≤ 3	$\geq 0,7$ y $\leq 2,5$	$\geq 0,8$ y $\leq 2,8$	$\geq 0,8$ y $\leq 2,5$	$\geq 0,7$ y $\leq 1,6$	$\geq 0,4$ y $\leq 0,7$
Viabilidad media de las réplicas tratadas con C+, expresado como % del C-	$< 40\%$	$< 20\%$	$< 40\%$	$< 40\%$	$< 20\%$	$< 40\%$	$< 40\%$	$< 50\%$
SD entre replicados	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18

RT: Temperatura ambiente; PBS: Tampón fosfato salino; OD: Densidad óptica; C-: Control negativo; C+: Control positivo. Tabla modificada de la TG 439 de la OECD

Criterios de aceptación

Un ensayo fue considerado como válido cuando se cumplieron simultáneamente los criterios descritos en la Tabla 16. En caso de no cumplir alguno de los criterios tras la finalización del ensayo, los resultados se consideraron no aceptables y se requirió un nuevo ensayo.

La decisión final de irritante/disruptor epitelial se consideró en base a los valores medios de viabilidad y TEER de tres ensayos independientes que cumplieron los criterios de aceptación. Si algún ensayo particular reflejaba una decisión no concordante con la clasificación generada por el resto de ensayos del mismo compuesto, se realizó un ensayo adicional en el caso de que la decisión final divergiera de la clasificación mayoritaria. Si la decisión final en las series no concordantes estaba de acuerdo con la clasificación mayoritaria, no se consideró necesario realizar un ensayo adicional.

C4.3. Resultados

Criterios de aceptación

La calidad y reproducibilidad de los modelos QileX-RhE fue sistemáticamente controlada antes de la liberación de un lote mediante la monitorización de la integridad epitelial siguiendo las recomendaciones de los estándares de desempeño. De la misma forma, la viabilidad de los controles positivos y negativos incluidos en cada ensayo fue monitorizada y evaluado su ajuste al rango determinado en base a los datos históricos.

Integridad epitelial (TEER)

Los datos de integridad epitelial de cada modelo QileX-RhE utilizados en cada ensayo de pre-validación se muestra en la Figura 19.

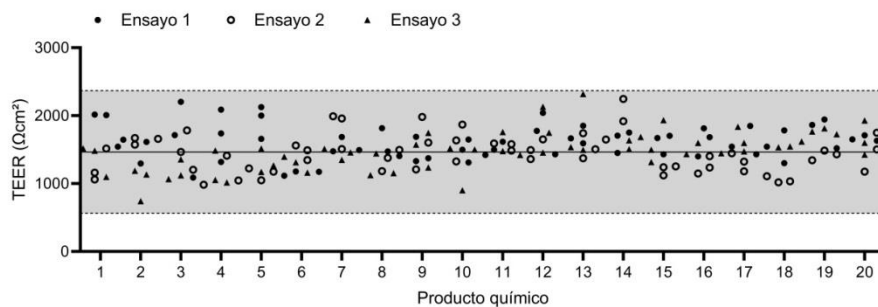


Figura 19: Valores de TEER de cada modelo QileX-RhE utilizado en los ensayos de pre-validación

Viabilidad celular

Los valores de control negativo y positivo de los ensayos incluidos en este estudio de pre-validación se muestran en la Figura 20.

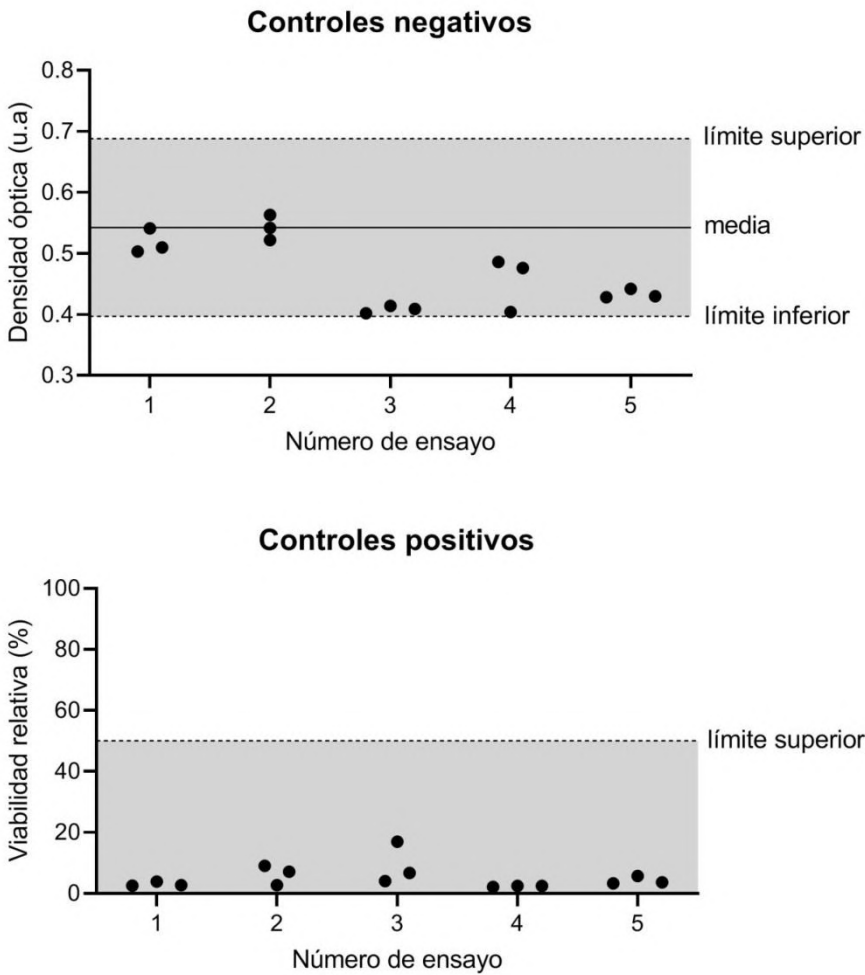


Figura 20: Valores de control negativo y positivo de cada modelo QileX-RhE utilizados en los ensayos de pre-validación

Evaluación de la irritación cutánea e integridad epitelial

Los resultados de la viabilidad relativa y la TEER se presentan a continuación en la Tabla 17 y la Figura 21.

Tabla 17: Resultados de viabilidad y TEER del modelo QileX-RhE tras el ensayo de irritación cutánea e integridad epitelial. Las celdas coloreadas indican una decisión de irritante/disruptor epitelial.

Nº		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Concordancia	Media	Decisión
Sustancias no clasificadas (GHS Sin Categoría)							
1	Viabilidad	4,69 ± 1,58	2,80 ± 0,16	3,95 ± 0,31	Sí	3,81 ± 0,95	I
	TEER	11,85 ± 2,14	13,89 ± 1,02	15,39 ± 0,29	Sí	13,71 ± 1,78	DE
2	Viabilidad	88,3 ± 4,31	93,37 ± 5,86	79,34 ± 6,90	Sí	87,01 ± 7,10	NI
	TEER	25,80 ± 6,57	36,88 ± 20,06	29,17 ± 2,88	Sí	30,62 ± 5,68	DE
3	Viabilidad	81,28 ± 14,66	91,08 ± 3,94	110,34 ± 4,30	Sí	94,23 ± 14,79	NI
	TEER	36,61 ± 13,30	58,49 ± 31,59	148,03 ± 10,08	No	81,04 ± 59,04	NDE
4	Viabilidad	17,45 ± 6,08	78,51 ± 4,10	97,27 ± 4,88	No	64,41 ± 41,74	NI
	TEER	14,37 ± 2,22	40,46 ± 7,87	49,90 ± 10,08	Sí	34,91 ± 18,40	DE
5	Viabilidad	79,61 ± 6,79	85,32 ± 6,10	95,86 ± 6,73	Sí	86,93 ± 8,24	NI
	TEER	12,85 ± 0,95	22,03 ± 4,73	29,80 ± 12,06	Sí	21,56 ± 8,48	DE
6	Viabilidad	23,14 ± 28,28	39,81 ± 48,88	43,15 ± 42,39	Si	35,36 ± 10,72	I
	TEER	12,59 ± 2,19	28,99 ± 18,21	27,24 ± 9,79	Sí	22,94 ± 9,01	DE
7	Viabilidad	101,16 ± 2,01	105,07 ± 4,42	110,82 ± 9,78	Sí	105,68 ± 4,86	NI
	TEER	122,18 ± 15,64	85,62 ± 12,88	98,76 ± 8,75	Sí	102,18 ± 18,52	NDE
8	Viabilidad	102,50 ± 7,11	96,50 ± 4,94	109,59 ± 13,10	Sí	102,86 ± 6,55	NI
	TEER	86,40 ± 8,40	80,39 ± 17,17	107,13 ± 4,40	Sí	91,31 ± 14,03	NDE
9	Viabilidad	105,21 ± 0,92	94,83 ± 5,14	91,83 ± 8,84	Sí	97,29 ± 7,02	NI
	TEER	90,39 ± 2,82	70,53 ± 15,24	78,66 ± 11,00	Sí	79,86 ± 9,98	NDE
10	Viabilidad	4,59 ± 0,09	4,31 ± 0,36	5,51 ± 0,94	Sí	4,80 ± 0,63	I
	TEER	25,64 ± 2,89	15,10 ± 12,78	11,14 ± 0,63	Sí	17,29 ± 7,49	DE
Sustancias clasificadas (GHS Categoría 2)							
11	Viabilidad	4,14 ± 0,09	3,40 ± 0,24	4,66 ± 0,18	Sí	4,06 ± 0,64	I
	TEER	4,54 ± 0,80	3,40 ± 0,93	3,74 ± 1,51	Sí	3,89 ± 0,59	DE
12	Viabilidad	5,03 ± 0,31	4,04 ± 0,08	5,36 ± 0,47	Sí	4,81 ± 0,69	I
	TEER	5,23 ± 1,48	5,58 ± 1,32	5,61 ± 1,50	Sí	5,47 ± 0,21	DE
13	Viabilidad	3,43 ± 0,51	2,44 ± 0,11	3,54 ± 0,22	Sí	3,14 ± 0,61	I
	TEER	9,56 ± 3,26	7,66 ± 1,01	8,97 ± 1,12	Sí	8,73 ± 0,97	DE
14	Viabilidad	2,36 ± 0,06	2,18 ± 0,08	3,19 ± 0,05	Sí	2,58 ± 0,54	I
	TEER	7,50 ± 0,70	5,50 ± 2,26	4,57 ± 1,35	Sí	5,86 ± 1,50	DE
15	Viabilidad	5,08 ± 0,34	4,31 ± 0,65	5,96 ± 0,85	Sí	5,12 ± 0,83	I

Nº		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Concordancia	Media	Decisión
	TEER	14,18 ± 0,12	10,45 ± 1,80	12,10 ± 1,48	Sí	12,24 ± 1,87	DE
16	Viabilidad	10,41 ± 1,77	8,67 ± 1,17	10,98 ± 1,21	Sí	10,02 ± 1,20	I
	TEER	3,22 ± 0,48	7,52 ± 1,91	9,40 ± 1,72	Sí	6,71 ± 3,16	DE
17	Viabilidad	107,36 ± 60,25	83,47 ± 11,18	89,95 ± 22,75	Sí	93,59 ± 12,36	NI
	TEER	8,01 ± 2,17	8,73 ± 2,65	9,17 ± 1,88	Sí	8,64 ± 0,59	DE
18	Viabilidad	12,99 ± 0,82	9,18 ± 1,68	9,77 ± 0,78	Sí	10,65 ± 2,05	I
	TEER	9,30 ± 1,72	7,53 ± 3,17	10,90 ± 3,32	Sí	9,24 ± 1,69	DE
19	Viabilidad	4,56 ± 0,06	3,54 ± 0,14	5,36 ± 0,32	Sí	4,49 ± 0,91	I
	TEER	8,55 ± 0,50	4,21 ± 0,71	3,69 ± 0,33	Sí	5,48 ± 2,67	DE
20	Viabilidad	2,87 ± 0,27	2,37 ± 0,15	3,33 ± 0,21	Sí	2,86 ± 0,48	I
	TEER	7,15 ± 3,21	5,69 ± 1,61	6,96 ± 0,52	Sí	6,60 ± 0,79	DE

I: Irritante; NI: No irritante; DE: Disruptor epitelial; NDE: No disruptor epitelial.

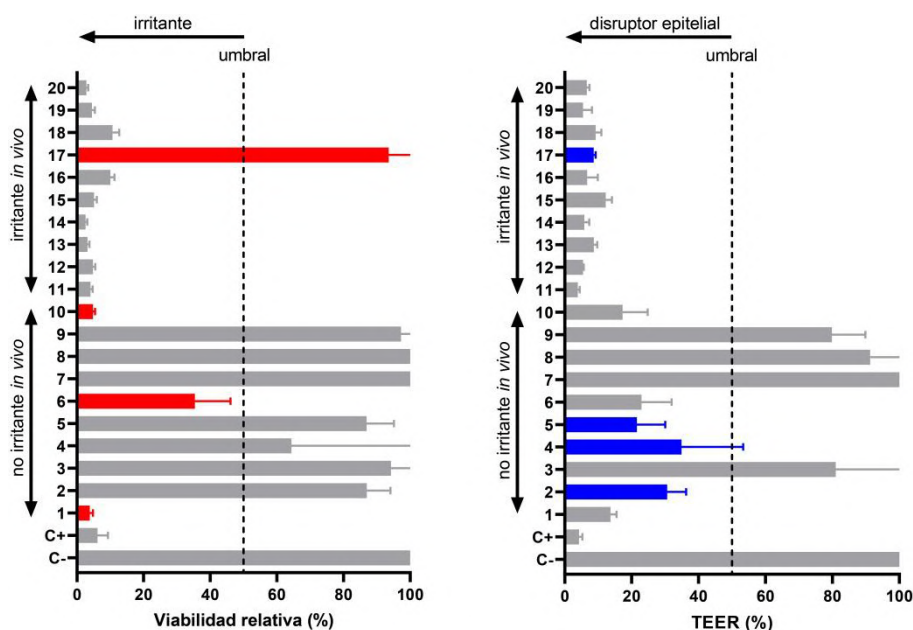


Figura 21: Resultados de viabilidad/TEER relativa tras la aplicación de los productos químicos sobre QileX-RhE en tres lotes por triplicado. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. La línea de puntos indica el umbral para la determinación de compuestos que causan irritación cutánea en base a la viabilidad celular y disrupciones en la integridad epitelial en base a la TEER. El color rojo indica una falsa predicción en base a la viabilidad. El color azul indica una clasificación discordante entre los datos de viabilidad y TEER.

Los resultados muestran la clasificación inequívoca de 12 productos químicos como irritantes y 8 productos químicos como no irritantes, con un producto químico, el *Allylphenoxy-acetate* (N° 4), produciendo resultados no concordantes. En estos resultados se observa como un producto químico, el *Benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl* (N° 17), clasificado como irritante *in vivo*, se predijo como no irritante, lo que indica una tasa de falsos positivos del 10%. Además, 3 sustancias químicas no irritantes *in vivo* (N° 1, N° 6 y N° 10) se predijeron como irritantes, lo que indica una tasa de falsos positivos del 30%. Por tanto, la sensibilidad, la especificidad, la precisión y la reproducibilidad intra-laboratorio fue del 90%, 70%, 80% y 95% respectivamente.

Adicionalmente, se predijeron 16 sustancias químicas como disruptivas de la integridad epitelial según la TEER, con 1 sustancia química, el *Naphthalene acetic*

acid (No. 3), produciendo resultados no concordantes, lo que resulta en una reproducibilidad intra-laboratorio del 95%.

C4.4. Discusión

Hasta la fecha, siete metodologías basadas en el uso de modelos RhE se han validado e incluido en la TG 439 de la OECD[29]. Con el objetivo de evaluar si QileX-RhE cumple con los requisitos establecidos en la TG 439 de la OECD, se ha evaluado la fiabilidad y la capacidad de predicción utilizando los 20 productos químicos de referencia detallados en los estándares de desempeño para la evaluación de la irritación cutánea en nuevos métodos basados en RhE[30]. La metodología de ensayo de QileX-RhE para la evaluación de la irritación cutánea es similar a los métodos validados de referencia descritos en la TG 439 de la OECD[29], habiendo demostrado una sensibilidad del 90%, una especificidad del 70% y una precisión del 80% para la identificación de compuestos irritantes, cumpliendo así los criterios de sensibilidad $\geq 80\%$, especificidad $\geq 70\%$ y precisión $\geq 75\%$ establecidos en los estándares de desempeño[30].

En el modelo QileX-RhE, se ha identificado únicamente al *Benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl* (N° 17) como falso negativo. Entre los métodos validados de referencia, ninguno de ellos identifica al compuesto N° 17 como falso negativo; sin embargo, si lo hacen con el *Di-n-propyl disulphide* (N° 15) en el caso de los métodos EpiDerm y LabCyte EPIMODEL24, el *1-Decanol* en el caso del método SkinEthic RHE y el *1-Bromohexane* en el método KeraSkin[29], siendo adecuadamente identificados en el modelo QileX-RhE. Es posible que estas diferencias en la identificación de irritantes se puedan deber al diferente origen etnológico de las muestras de piel utilizadas en la generación de los modelos RhE, pudiendo existir diferentes susceptibilidades en función de la población[142]. Por otro lado, al igual que en los métodos validados de referencia, se ha identificado al *1-Bromo-4-chlorobutane* (N° 1), al *4-Methyl-thio-benzaldehyde* (N° 6) y al *Cinnamaldehyde* (N° 10) como falsos positivos. Algunos estudios sugieren que la aparición de falsos positivos se debe a la influencia de las fracciones volátiles de los compuestos irritantes al ser evaluados en paralelo con compuestos no irritantes al mismo tiempo en la misma placa[143]. Se sugiere, por tanto, que a pesar de que la presión de vapor de los productos irritantes sea muy pequeña bajo

las condiciones experimentales, pequeñas cantidades de las sustancias se pueden evaporar de la superficie de los tejidos y alcanzar los tejidos de los pocillos adyacentes de la misma placa por difusión de aire[143].

Además del análisis de la viabilidad celular para la predicción de la irritación, se ha incluido el análisis de la TEER para la identificación de interrupciones en el efecto barrera epitelial, al igual que durante la evaluación de la irritación ocular en el modelo QobuR-RhCE. En este estudio, se observa que el *Diethyl phthalate* (Nº 2), *Allylphenoxy-acetate* (Nº 4) e *Isopropanol* (Nº 5) fueron identificados como disruptores epiteliales a pesar de haber sido identificados como no-irritantes con el ensayo de viabilidad celular y de ser considerados como no-irritantes a través de ensayos *in vivo*. A este efecto, el producto químico Nº 2 ha mostrado niveles bajos de toxicidad, con aparición de ligeros enrojecimientos en la piel tras su aplicación dérmica tanto en humanos como en animales en casos esporádicos[144]; el producto químico Nº 4 puede provocar reacciones alérgicas en la piel (H317) y el producto Nº 5 causa irritación ocular (H319). Es decir, a pesar de que ninguno se considere bajo los actuales estándares como irritantes cutáneos ni se hayan clasificado como tal en base a los ensayos sobre QileX-RhE, todos ellos provocan, de un modo u otro, alteraciones sobre el tejido epitelial. Además, es interesante destacar que el producto Nº 17, identificado como no irritante a través del estudio de viabilidad, se ha identificado como disruptor del efecto barrera epitelial, lo cual sugiere que el estudio de la TEER, es una técnica de utilidad en la detección de posibles efectos adversos que puede complementar los estudios en base a la viabilidad celular.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este estudio, es posible considerar al modelo QileX-RhE como apto para un estudio de validación multilaboratorio utilizando un mayor número de productos químicos, con el objetivo de validar formalmente el método de ensayo como una alternativa a la experimentación con animales.

Capítulo 5

Uso de la capacitancia para la evaluación de la irritación ocular y daño ocular severo



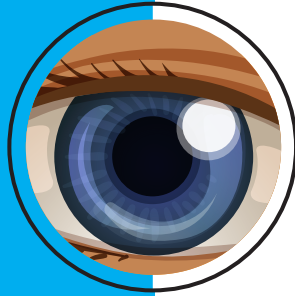
Canis familiaris

8.716 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Capítulo 5

Resumen gráfico

QobuR-RhCE



Evaluación de la utilidad del modelo de epitelio corneal reconstruido para la evaluación de la irritación ocular / daño ocular severo

Evaluación de la irritación ocular / daño ocular severo



Evaluación de 30 compuestos químicos de referencia por duplicado en dos lotes de tejido

Análisis de las variaciones en la capacitancia



Evaluación de la capacitancia antes y después de la aplicación de los compuestos químicos

Método acorde a los requisitos establecidos por la OECD



100% de sensibilidad
66% de especificidad
83% de precisión

C5.1. Introducción

La córnea es una estructura transparente y avascular formada por 5 capas: el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio corneal[145]. A diferencia de la piel humana, el epitelio corneal no está queratinizado, y por tanto, es más propenso a sufrir lesiones mecánicas y químicas. Debido a la importancia de la visión, los productos comerciales deben garantizar ser seguros para la salud humana antes de su comercialización a través de rigurosos ensayos toxicológicos. Con el objetivo específico de determinar la seguridad para el sistema visual, se han desarrollado diversos protocolos estandarizados para la evaluación de la irritación ocular. El primer test estandarizado fue desarrollado en 1944 por John Draize y consiste en la aplicación del producto en uno de los ojos de un conejo albino y el análisis de los efectos adversos durante un periodo de 21 días[58]. Sin embargo, las crecientes presiones acerca del uso de animales con fines experimentales han llevado a la legislación internacional, como la Directiva Europea 2010/63/EU, a fomentar el uso de métodos alternativos a la experimentación animal siempre que sea científicamente posible[14]. De este modo, diversas metodologías alternativas incluyendo métodos *in silico*[146], *ex vivo*[147,148] e *in vitro*[135–138] han sido desarrolladas, siendo algunas de ellas aprobadas como TG de la OECD para reemplazar el ensayo *in vivo* de irritación ocular de Draize[22,131,132]. Entre estas alternativas, la OECD TG 492 engloba el uso de modelos RhCE para la identificación de productos químicos que no requieran clasificación ni etiquetado para la irritación ocular y cuyo mecanismo de predicción está generalmente basado en la evaluación de la citotoxicidad a través del ensayo MTT, un ensayo destructivo de tiempo final basado en la reducción enzimática de un compuesto amarillento de tetrazolio a una sal morada de formazán por células con metabolismo activo que resulta en la inutilización del modelo para cualquier otro ensayo[149]. Sin embargo, está generalmente aceptado que la experimentación animal no podrá ser eficazmente reemplazada por un único resultado *in vitro* de viabilidad celular; por tanto, la validación de nuevos métodos de ensayo que permitan una evaluación multiparamétrica deberían ser considerados como una prioridad.

La EIS es una técnica simple, rápida, no invasiva y no destructiva que puede ser utilizada en modelos celulares para monitorizar el desarrollo y la integridad de las uniones intercelulares durante la maduración y durante la experimentación. La impedancia es una magnitud vectorial bidimensional compuesta por dos fenómenos unidimensionales ortogonales entre sí: la resistencia, el componente real, y la reactancia, el componente imaginario. La metodología más ampliamente utilizada para evaluar la impedancia está basada en la evaluación de la TEER utilizando un par de electrodos conectados a un multímetro. La TEER evalúa la resistencia, la magnitud vectorial relacionada con la disipación del flujo de corriente y que está estrechamente relacionada con las uniones estrechas intercelulares[39]. Por tanto, la TEER representa una medida directa de la permeabilidad de los epitelios y generalmente es utilizada para la evaluación de la integridad del efecto barrera epitelial y la permeabilidad[39]. Por otro lado, la generalmente descartada reactancia mide la oposición al flujo de corriente debido a elementos capacitivos e inductivos. Los condensadores son elementos capaces de almacenar energía eléctrica en forma de campo eléctrico, tales como las membranas celulares, debido a las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica[150]. Por tanto, la evaluación de la capacitancia representa una medida directa de la integridad de las membranas celulares y puede ser utilizada para detectar procesos de muerte celular[151].

En este capítulo, se hace uso del modelo QobuR-RhCE, un modelo *in vitro* de RhCE consistente en células epiteliales corneales diferenciadas en 3D[57], para la evaluación de la aplicabilidad del análisis de la impedancia para la predicción de la irritación ocular en modelos RhCE mediante la monitorización de los cambios en la capacitancia durante la maduración y pre y post exposición a diferentes productos químicos.

En definitiva, el trabajo de este capítulo presenta la utilidad de la espectroscopía de impedancia como una herramienta complementaria para estudiar los daños oculares en modelos RhCE, haciendo posible la identificación de productos causantes de irritación/daño ocular severo de una manera no invasiva y allanando el camino para la implementación de la espectroscopía de

impedancia como una nueva herramienta a utilizar en ensayos regulados enfocados al reemplazo de la experimentación animal.

C5.2. Diseño experimental

QobuR-RhCE

Para este estudio, se utilizaron modelos QobuR-RhCE con valores de TEER $\geq 750 \Omega\text{cm}^2$ y $\leq 2500 \Omega\text{cm}^2$.

Análisis de la diferenciación celular mediante capacitancia y TEER

El análisis de la diferenciación celular durante el proceso de fabricación de los modelos QobuR-RhCE se realizó en 12 modelos independientes por cada lote, con un total de 3 lotes evaluados. Para ello, se analizó cada 24 horas las variaciones de TEER utilizando un multímetro MilliCell-ERS2 (Merck) y las variaciones de capacitancia utilizando un analizador de impedancia U2817A (Euco) durante el curso de 7-13 días.

En todos los casos, los electrodos fueron colocados sobre un microposicionador de 3 ejes (X, Y, Z) para garantizar un posicionamiento consistente de los electrodos durante las evaluaciones de TEER y capacitancia.

Evaluación del daño celular

Con el objetivo de determinar si el análisis de la impedancia es capaz de detectar daños celulares, se aplicaron concentraciones crecientes de SLS (de 0 a 6 mg/mL) durante 30 minutos por duplicado. Inmediatamente después, los modelos QobuR-RhCE fueron lavados abundantemente en PBS y se evaluó la capacitancia y la TEER. Seguidamente, se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Finalmente, modelos QobuR-RhCE adicionales fueron fijados en 10% formalina, embebidos en parafina y utilizados para la evaluación de los daños en el ADN mediante el ensayo TUNEL. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada y normalizada mediante Image J utilizando tres micrografías a x400 aumentos obtenidas de campos aleatorios para cada concentración de SLS.

Ensayo de evaluación del daño ocular

Con el objetivo de evaluar si la capacitancia puede utilizarse como sistema predictivo para la evaluación del potencial daño ocular de productos químicos en el modelo QobuR-RhCE, la capacitancia fue evaluada antes y después de la aplicación de los productos químicos y la viabilidad celular fue evaluada de acuerdo en los protocolos descritos en la OECD TG 492 para la identificación de productos químicos que no requieren clasificación ni etiquetado para la irritación ocular o daño ocular severo.

Productos químicos

Se han evaluado los 30 productos químicos de referencia detallados en la lista mínima de productos químicos de referencia recomendados para la evaluación de los estándares de desempeño para propuestas similares o modificadas de RhCE (Tabla 12).

Todos los compuestos fueron evaluados por duplicado en dos réplicas experimentales. Cuando fue requerido, se realizaron correcciones sobre los valores de viabilidad celular utilizando controles de tejido vivo y controles de tejido muerto congelado según correspondiera de acuerdo con los protocolos descritos en la OECD TG 492.

Análisis de datos y modelos de predicción

Con el objetivo de predecir el daño ocular, los datos de capacitancia obtenidos antes y después de los tratamientos con los productos químicos fueron normalizados para cada frecuencia evaluada como C/C_0 , siendo C_0 el valor inicial de capacitancia obtenido antes de la aplicación de los productos químicos y C el valor de capacitancia obtenido después del tratamiento.

La sensibilidad, especificidad y precisión fue calculada para cada frecuencia y MTT utilizando diferentes umbrales. El mejor umbral fue seleccionado en base al valor que ofreció una mejor precisión para la distinción entre compuestos que causan irritación/daño ocular severo y no irritantes.

Por último, se calcularon curvas ROC para los valores de capacitancia normalizada y MTT para evaluar la precisión global y los valores de AUC para comparar la relativa eficacia de cada método predictivo.

C5.3. Resultados

Análisis de la diferenciación celular mediante capacitancia y TEER

La maduración de los modelos QobuR-RhCE fue monitorizada mediante mediciones a intervalos de tiempo definidos de la TEER y la capacitancia a diferentes frecuencias. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 22. Al compararse los datos obtenidos en los diferentes tiempos, tanto la TEER como la capacitancia mostraron una progresión específica a lo largo del tiempo. La capacitancia mostró una rápida caída en los valores a día 1 y seguidamente un progresivo descenso con el tiempo, con mayores diferencias observadas a frecuencias > 1 kHz. Por otro lado, los valores de TEER aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo hasta alcanzar una meseta en torno al día 9 en valores cercanos a $1500 \Omega\text{cm}^2$.

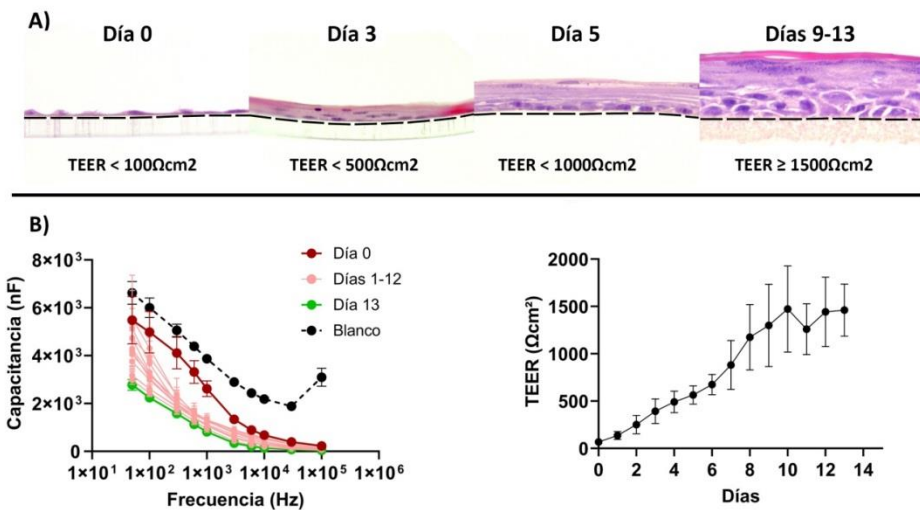


Figura 22: A) Secciones histológicas representativas de modelos QobuR-RhCE cultivados en interfase aire-líquido durante 0, 3, 5 y 9-13 días. B) Valores de TEER y capacitancia a diferentes frecuencias. Blanco representa los valores de capacitancia de un inserto sin células cultivadas.

Evaluación del daño celular

Los efectos de la exposición de concentraciones crecientes de SLS en los modelos QobuR-RhCE fue evaluada mediante capacitancia, MTT y TUNEL. La Figura 23 muestra las curvas de capacitancia a diferentes frecuencias tras la aplicación de SLS. Se puede observar cómo los valores de capacitancia aumentan según la concentración de SLS aumentando siguiendo un patrón estándar de dosis-respuesta. Por el contrario, la TEER se vio sustancialmente afectada tras la aplicación de bajas concentraciones de SLS. Sorprendentemente, dependiendo de la concentración, los valores de viabilidad relativa obtenidos con el ensayo MTT fueron más elevados que el control sin SLS (100% viabilidad) y solamente en las concentraciones mayores de 3 mg/mL se pudo apreciar un descenso en la viabilidad relativa. La muerte celular relativa obtenida mediante la detección de fragmentos libres de ADN mediante el ensayo TUNEL indica que los daños al ADN fueron gradualmente inducidos a cada concentración de SLS, con únicamente la capa más externa afectada cuando se utilizó concentraciones bajas de SLS (Figura 24).

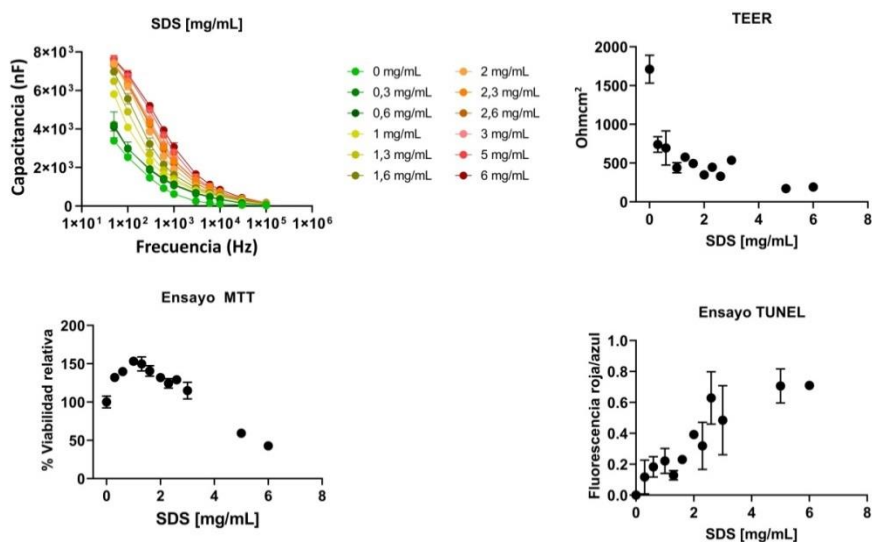


Figura 23: Capacitancia, TEER, viabilidad relativa y mortalidad relativa tras la aplicación de SDS

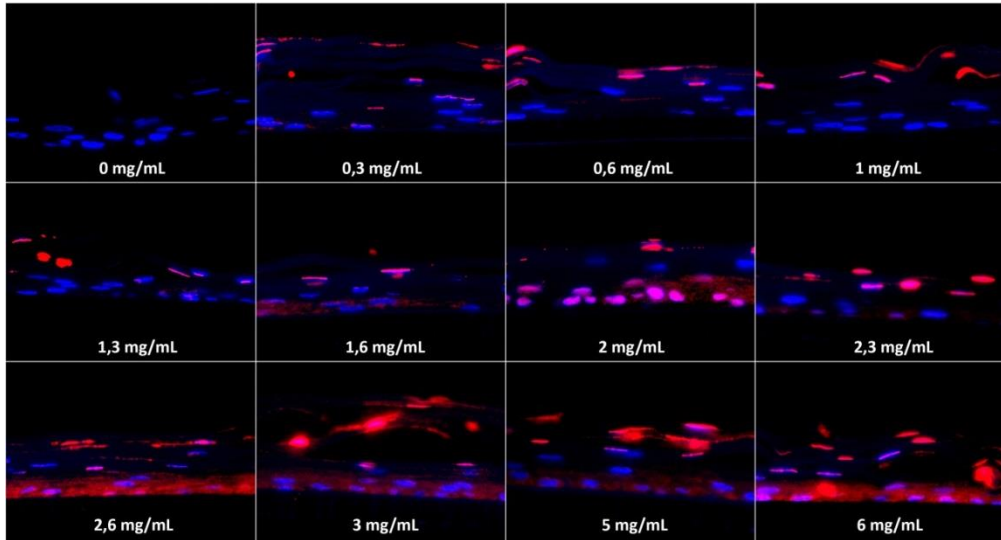


Figura 24: Evaluación histológica de la fragmentación apoptótica del ADN (rojo) tras la aplicación de SDS. Núcleos en azul (teñidos con DAPI)

Evaluación de la irritación ocular

El efecto en la capacitancia de los modelos QobuR-RhCE se evaluó utilizando 30 productos químicos de referencia (Figura 25, Figura 26 y Tabla 18). Con el objetivo de establecer tanto la frecuencia óptima como el umbral para la identificación de irritantes; la sensibilidad, especificidad y precisión fue calculada para cada frecuencia y comparada con la obtenida con los valores de viabilidad relativa (Tabla 19).

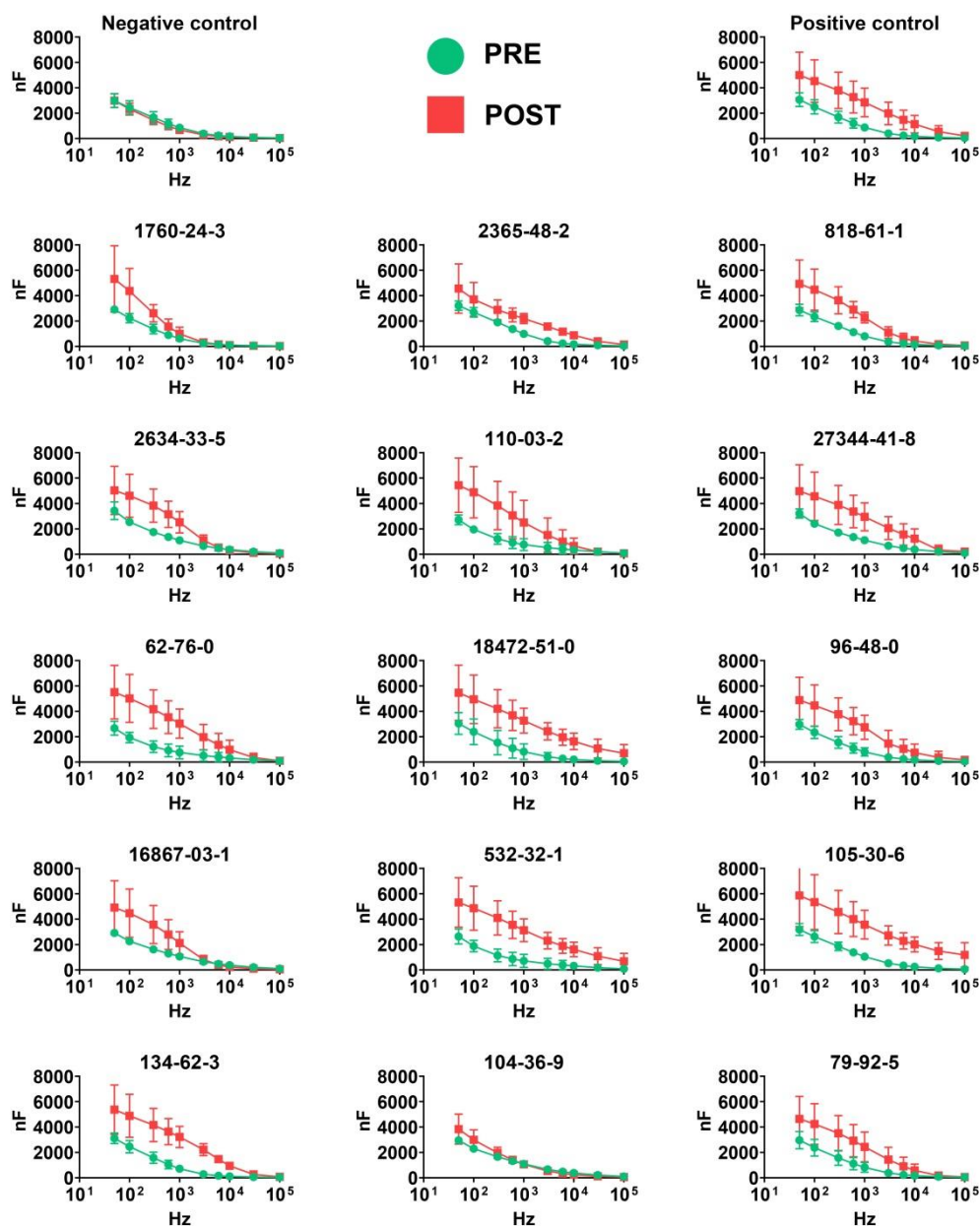


Figura 25: Capacitancia pre y post tratamiento para los 15 productos químicos de referencia irritantes *in vivo*

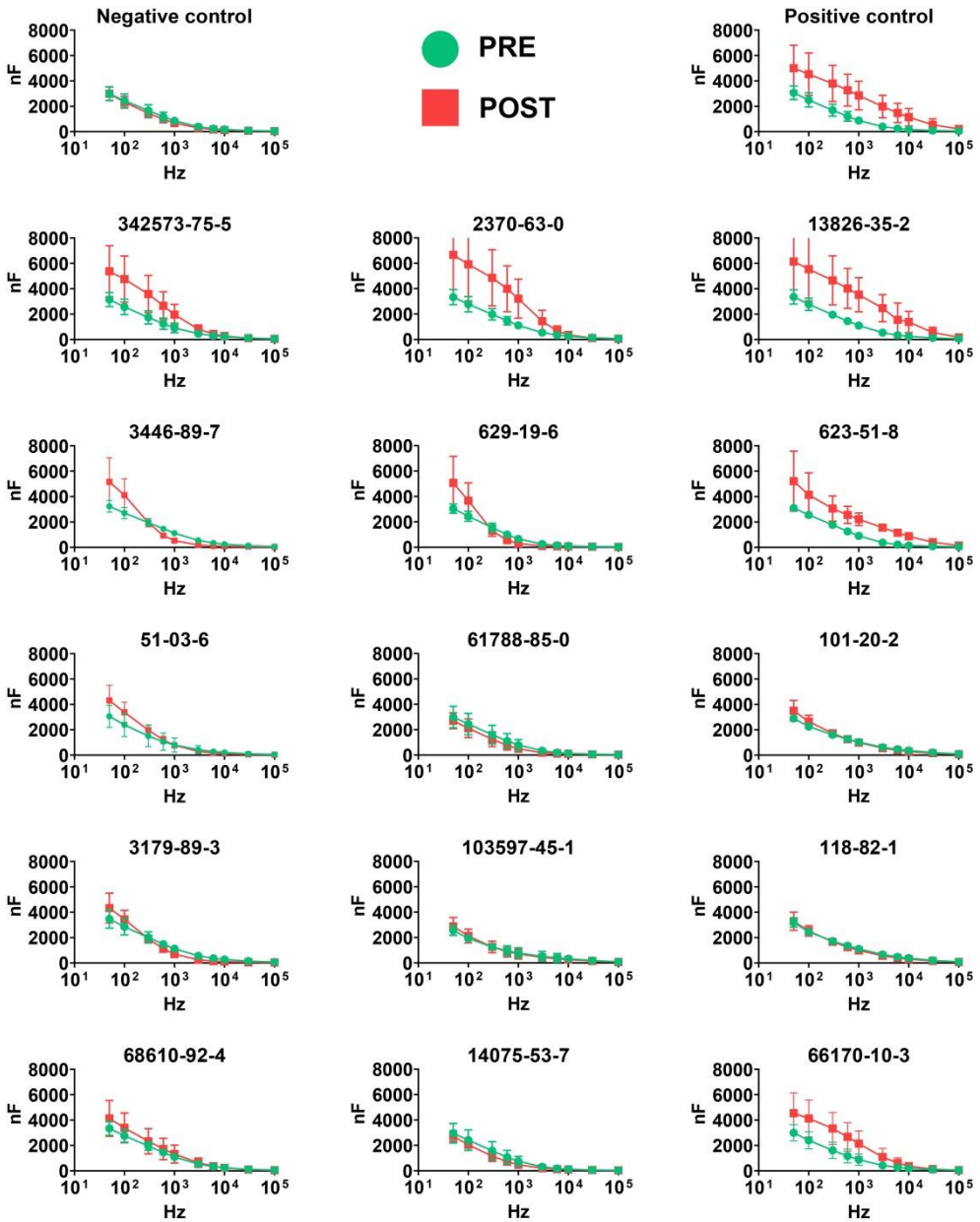


Figura 26: Capacitancia pre y post tratamiento para los 15 productos químicos de referencia no irritantes *in vivo*

Tabla 18: Valores de capacitancia normalizada y viabilidad relativa por MTT tras la aplicación de los productos químicos de referencia en los modelos QobuR-RhCE (media ± SD).

Capacitancia normalizada (C/C ₀)											
CASRN	50 Hz	100 Hz	300 Hz	600 Hz	1 kHz	3 kHz	6 kHz	10 kHz	30 kHz	100 kHz	MTT
1760-24-3	1,78 ± 0,8	1,90 ± 0,5	1,91 ± 0,1	1,72 ± 0,4	1,56 ± 0,6	1,23 ± 0,7	1,08 ± 0,5	0,99 ± 0,4	0,86 ± 0,2	0,80 ± 0,2	58,5 ± 17,5
2365-48-2	1,38 ± 0,5	1,34 ± 0,4	1,49 ± 0,3	1,80 ± 0,3	2,21 ± 0,4	3,80 ± 0,4	4,86 ± 0,2	5,24 ± 0,9	4,48 ± 2,0	2,86 ± 1,2	28,1 ± 6,2
818-61-1	1,68 ± 0,4	1,86 ± 0,4	2,23 ± 0,4	2,57 ± 0,3	2,82 ± 0,2	2,94 ± 0,4	2,68 ± 0,6	2,43 ± 0,6	1,93 ± 0,5	1,61 ± 0,2	47,1 ± 22,8
2634-33-5	1,43 ± 0,3	1,78 ± 0,6	2,16 ± 0,7	2,27 ± 0,6	2,24 ± 0,4	1,76 ± 0,3	1,30 ± 0,5	1,04 ± 0,5	0,77 ± 0,5	0,74 ± 0,4	2,1 ± 0,1
110-03-2	1,95 ± 0,6	2,42 ± 0,8	3,03 ± 0,6	3,19 ± 0,5	3,13 ± 0,4	2,64 ± 0,6	2,19 ± 0,5	1,82 ± 0,2	1,20 ± 0,2	0,95 ± 0,3	46,2 ± 61,5
27344-41-8	1,51 ± 0,6	1,87 ± 0,9	2,27 ± 1,1	2,45 ± 1,0	2,60 ± 0,8	3,05 ± 0,1	3,25 ± 0,1	3,25 ± 0,0	2,88 ± 0,3	2,21 ± 0,1	13,6 ± 17,6
62-76-0	2,01 ± 0,5	2,52 ± 0,9	3,44 ± 1,1	4,19 ± 1,0	4,80 ± 0,8	5,46 ± 0,1	4,67 ± 0,1	3,71 ± 0,0	2,01 ± 0,3	1,18 ± 0,1	11,6 ± 17,6
18472-51-0	1,75 ± 0,3	2,10 ± 0,1	3,23 ± 1,3	4,49 ± 2,6	5,76 ± 3,8	9,23 ± 7,1	11,09 ± 8,2	11,61 ± 7,5	10,10 ± 0,7	9,86 ± 7,8	5,2 ± 2,3
96-48-0	1,61 ± 0,4	1,86 ± 0,3	2,46 ± 0,5	3,05 ± 0,8	3,59 ± 1,0	3,89 ± 1,9	4,21 ± 0,8	3,78 ± 1,0	3,00 ± 1,5	2,59 ± 1,7	49,2 ± 29,4
16867-03-1	1,69 ± 0,9	2,01 ± 1,2	2,24 ± 1,3	2,14 ± 1,1	1,94 ± 0,8	1,28 ± 0,0	0,94 ± 0,3	0,78 ± 0,4	0,63 ± 0,4	0,62 ± 0,3	26,0 ± 5,3
532-32-1	1,98 ± 0,4	2,53 ± 0,4	3,74 ± 0,5	4,91 ± 2,1	6,04 ± 3,8	8,99 ± 8,0	10,6 ± 10,1	11,0 ± 10,4	9,03 ± 5,7	6,96 ± 1,9	1,8 ± 0,3
105-30-6	1,79 ± 0,6	1,97 ± 0,6	2,39 ± 0,6	2,84 ± 0,6	3,36 ± 0,5	5,29 ± 0,5	7,14 ± 1,4	8,61 ± 1,8	11,35 ± 0,6	15,8 ± 12,0	4,3 ± 0,8
134-62-3	1,69 ± 0,5	1,94 ± 0,4	2,62 ± 0,1	3,54 ± 0,2	4,67 ± 0,6	8,32 ± 1,8	9,45 ± 2,3	8,48 ± 2,1	4,37 ± 0,8	2,18 ± 0,4	8,4 ± 2,2
104-36-9	1,30 ± 0,5	1,31 ± 0,5	1,20 ± 0,4	1,07 ± 0,2	0,97 ± 0,1	0,83 ± 0,1	0,77 ± 0,2	0,74 ± 0,3	0,70 ± 0,3	0,72 ± 0,3	12,2,9 ± 8,0
79-92-5	1,54 ± 0,3	1,77 ± 0,3	2,34 ± 0,8	2,89 ± 1,3	3,37 ± 1,8	4,15 ± 2,4	3,96 ± 2,2	3,39 ± 1,8	1,94 ± 0,8	1,21 ± 0,3	34,9 ± 25,3
342573-75-5	1,66 ± 0,4	1,81 ± 0,3	2,00 ± 0,3	2,11 ± 0,2	2,15 ± 0,0	1,97 ± 0,5	1,66 ± 0,6	1,42 ± 0,6	1,06 ± 0,4	0,93 ± 0,3	64,1 ± 22,5
2370-63-0	1,91 ± 0,8	2,04 ± 0,7	2,35 ± 0,7	2,62 ± 0,8	2,79 ± 0,9	2,50 ± 0,8	1,83 ± 0,5	1,38 ± 0,2	0,87 ± 0,2	0,74 ± 0,3	17,5 ± 1,6
13826-35-2	1,76 ± 0,7	1,92 ± 0,7	2,31 ± 0,8	2,70 ± 0,9	3,12 ± 0,9	4,40 ± 1,0	3,96 ± 2,9	5,11 ± 1,9	4,01 ± 2,3	2,50 ± 1,3	21,9 ± 1,0
3446-89-7	1,55 ± 0,4	1,49 ± 0,3	0,99 ± 0,0	0,64 ± 0,1	0,48 ± 0,1	0,37 ± 0,2	0,39 ± 0,2	0,41 ± 0,2	0,50 ± 0,2	0,61 ± 0,2	114,4 ± 8,9
629-19-6	1,63 ± 0,6	1,47 ± 0,4	0,83 ± 0,1	0,55 ± 0,1	0,45 ± 0,0	0,46 ± 0,0	0,54 ± 0,1	0,60 ± 0,1	0,71 ± 0,1	0,80 ± 0,1	73,7 ± 11,0
623-51-8	1,66 ± 0,8	1,60 ± 0,6	1,74 ± 0,6	2,10 ± 0,7	2,59 ± 1,0	4,44 ± 1,7	5,59 ± 1,5	5,93 ± 0,8	4,92 ± 0,8	3,09 ± 0,7	12,1 ± 36,2
51-03-6	1,41 ± 0,0	1,49 ± 0,3	1,58 ± 0,8	1,50 ± 0,9	1,36 ± 0,9	1,01 ± 0,7	0,87 ± 0,5	0,80 ± 0,5	0,75 ± 0,4	0,75 ± 0,3	119,7 ± 4,1
61788-85-0	1,01 ± 0,6	1,03 ± 0,8	1,07 ± 1,0	1,03 ± 1,1	0,95 ± 1,0	0,78 ± 0,7	0,73 ± 0,5	0,74 ± 0,4	0,80 ± 0,2	0,87 ± 0,0	98,5 ± 1,1
101-20-2	1,21 ± 0,3	1,19 ± 0,3	1,08 ± 0,2	1,00 ± 0,1	0,96 ± 0,0	0,93 ± 0,2	0,91 ± 0,2	0,88 ± 0,2	0,84 ± 0,3	0,82 ± 0,2	119,3 ± 18,4
3179-89-3	1,29 ± 0,2	1,26 ± 0,0	1,01 ± 0,2	0,80 ± 0,3	0,68 ± 0,3	0,55 ± 0,4	0,53 ± 0,4	0,52 ± 0,4	0,56 ± 0,4	0,65 ± 0,3	-6,9 ± 5,8
103597-45-1	1,11 ± 0,2	1,09 ± 0,2	0,98 ± 0,1	0,92 ± 0,1	0,89 ± 0,0	0,86 ± 0,0	0,85 ± 0,1	0,84 ± 0,1	0,83 ± 0,1	0,82 ± 0,0	94,0 ± 1,2
118-82-1	1,02 ± 0,1	1,03 ± 0,1	0,97 ± 0,1	0,92 ± 0,0	0,89 ± 0,0	0,87 ± 0,1	0,85 ± 0,1	0,85 ± 0,1	0,84 ± 0,2	0,85 ± 0,1	100,9 ± 1,0
68610-92-4	1,21 ± 0,3	1,20 ± 0,2	1,16 ± 0,2	1,16 ± 0,3	1,18 ± 0,3	1,20 ± 0,1	1,13 ± 0,1	1,05 ± 0,2	0,89 ± 0,2	0,82 ± 0,2	79,9 ± 11,2
14075-53-7	0,94 ± 0,1	0,88 ± 0,1	0,76 ± 0,1	0,70 ± 0,1	0,68 ± 0,1	0,70 ± 0,1	0,75 ± 0,1	0,80 ± 0,1	0,87 ± 0,0	0,90 ± 0,1	92,91 ± 8,4
66170-10-3	1,50 ± 0,3	1,73 ± 0,4	2,24 ± 0,9	2,63 ± 1,3	2,87 ± 1,6	2,91 ± 1,5	2,51 ± 1,2	2,12 ± 0,8	1,44 ± 0,4	1,11 ± 0,2	73,7 ± 22,8

Tabla 19: Capacidad predictiva para los 30 productos químicos de referencia en cada frecuencia

Umbral	50 Hz			100 Hz			300 Hz		
	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Precisión
0	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,2	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,4	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,6	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,8	0	1	0,5	0	1	0,5	0,067	1	0,533
1	0,067	1	0,533	0,067	1	0,533	0,333	1	0,667
1,2	0,267	1	0,633	0,4	1	0,7	0,667	1	0,833
1,4	0,467	0,867	0,667	0,467	0,867	0,7	0,6	0,933	0,767
1,6	0,667	0,733	0,7	0,733	0,867	0,8	0,6	0,867	0,767
1,8	0,933	0,2	0,567	0,8	0,733	0,767	0,733	0,867	0,8
2	1	0,067	0,533	0,933	0,333	0,767	0,733	0,8	0,767
2,2	1	0	0,5	1	0,2	0,6	0,8	0,733	0,767
2,4	1	0	0,5	1	0,2	0,6	1	0,4	0,7
2,6	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0,333	0,667
2,8	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0,267	0,663
3	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0,267	0,663
3,2	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0,2	0,6
3,4	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0,133	0,567
3,6	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0,067	0,533
3,8	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5
4	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5

Umbral	600 Hz			1 kHz			3 kHz		
	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Precisión
0	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,2	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,4	0	1	0,5	0	1	0,5	0,067	1	0,533
0,6	0,067	1	0,533	0,133	1	0,567	0,2	1	0,6
0,8	0,2	1	0,6	0,267	1	0,633	0,4	1	0,7
1	0,467	1	0,733	0,533	0,933	0,733	0,533	0,933	0,733
1,2	0,6	0,933	0,767	0,6	0,933	0,767	0,667	0,933	0,8
1,4	0,6	0,933	0,767	0,667	0,933	0,8	0,667	0,867	0,767
1,6	0,667	0,933	0,8	0,667	0,867	0,767	0,667	0,867	0,767
1,8	0,667	0,8	0,733	0,667	0,867	0,767	0,667	0,8	0,733
2	0,667	0,8	0,733	0,667	0,8	0,733	0,733	0,8	0,767
2,2	0,8	0,733	0,767	0,733	0,8	0,767	0,733	0,8	0,767
2,4	0,8	0,667	0,733	0,733	0,667	0,7	0,733	0,8	0,767
2,6	0,8	0,6	0,7	0,8	0,667	0,733	0,8	0,8	0,8
2,8	1	0,533	0,767	0,867	0,533	0,7	0,8	0,667	0,733
3	1	0,4	0,7	0,933	0,533	0,733	0,867	0,667	0,767
3,2	1	0,267	0,633	1	0,467	0,733	0,867	0,6	0,733
3,4	1	0,267	0,633	1	0,333	0,667	0,867	0,6	0,733
3,6	1	0,2	0,6	1	0,267	0,633	0,867	0,6	0,733
3,8	1	0,2	0,6	1	0,267	0,633	0,867	0,533	0,7
4	1	0,2	0,6	1	0,267	0,633	0,867	0,467	0,667

Umbral	6 kHz			10 kHz			30 kHz		
	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Precisión
0	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,2	0	1	0,5	0	1	0,5	0	1	0,5
0,4	0,067	1	0,533	0	1	0,5	0	1	0,5
0,6	0,2	1	0,6	0,2	1	0,6	0,133	1	0,567
0,8	0,33	0,933	0,633	0,333	0,867	0,6	0,333	0,8	0,567
1	0,6	0,867	0,733	0,6	0,8	0,7	0,733	0,733	0,733
1,2	0,667	0,8	0,733	0,667	0,733	0,7	0,8	0,733	0,767
1,4	0,667	0,733	0,7	0,733	0,733	0,733	0,8	0,667	0,733
1,6	0,667	0,733	0,7	0,8	0,733	0,767	0,867	0,667	0,767
1,8	0,733	0,733	0,733	0,8	0,733	0,767	0,867	0,6	0,733
2	0,8	0,733	0,767	0,8	0,667	0,733	0,867	0,533	0,7
2,2	0,8	0,667	0,733	0,867	0,6	0,733	0,867	0,467	0,667
2,4	0,8	0,6	0,7	0,867	0,6	0,733	0,867	0,467	0,667
2,6	0,867	0,6	0,733	0,867	0,6	0,733	0,867	0,467	0,667
2,8	0,867	0,6	0,733	0,867	0,6	0,733	0,867	0,467	0,667
3	0,867	0,6	0,733	0,867	0,6	0,733	0,867	0,333	0,6
3,2	0,867	0,6	0,733	0,867	0,6	0,733	0,867	0,333	0,6
3,4	0,867	0,533	0,7	0,867	0,467	0,667	0,867	0,333	0,6
3,6	0,867	0,533	0,7	0,867	0,467	0,667	0,867	0,333	0,6
3,8	0,867	0,533	0,7	0,867	0,333	0,6	0,867	0,333	0,6
4	0,933	0,467	0,7	0,867	0,333	0,6	0,867	0,333	0,6

Umbral	100 kHz			MTT		
	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Precisión
0	0	1	0,5	0,933	0	0,467
0,2	0	1	0,5	0,933	0,2	0,567
0,4	0	1	0,5	0,933	0,333	0,633
0,6	0	1	0,5	0,867	0,467	0,667
0,8	0,33	0,8	0,567	0,8	0,467	0,633
1	0,8	0,733	0,767	0,733	0,467	0,6
1,2	0,867	0,667	0,767	0,733	0,6	0,633
1,4	0,867	0,6	0,733	0,733	0,667	0,667
1,6	0,867	0,533	0,7	0,733	0,667	0,667
1,8	0,867	0,533	0,7	0,733	0,667	0,667
2	0,867	0,533	0,7	0,733	0,867	0,8
2,2	0,867	0,467	0,667	0,733	0,867	0,8
2,4	0,867	0,4	0,633	0,733	0,933	0,833
2,6	0,933	0,333	0,633	0,667	0,933	0,8
2,8	0,933	0,333	0,633	0,667	0,933	0,8
3	0,933	0,267	0,6	0,533	0,933	0,733
3,2	1	0,267	0,633	0,467	0,933	0,7
3,4	1	0,267	0,633	0,467	0,933	0,7
3,6	1	0,267	0,633	0,467	0,933	0,7
3,8	1	0,267	0,633	0,333	0,933	0,633
4	1	0,267	0,633	0,067	0,933	0,6

Seguidamente, se calcularon las curvas ROC para la clasificación por MTT y las frecuencias de capacitancia. A continuación, la AUC de cada curva ROC se calculó y comparó. Utilizando el ensayo clásico de MTT, se obtuvo un AUC de 0,7715. Los datos de capacitancia mostraron una mejor predicción a una frecuencia de 300 Hz con un AUC de 0,8556 (Figura 27).

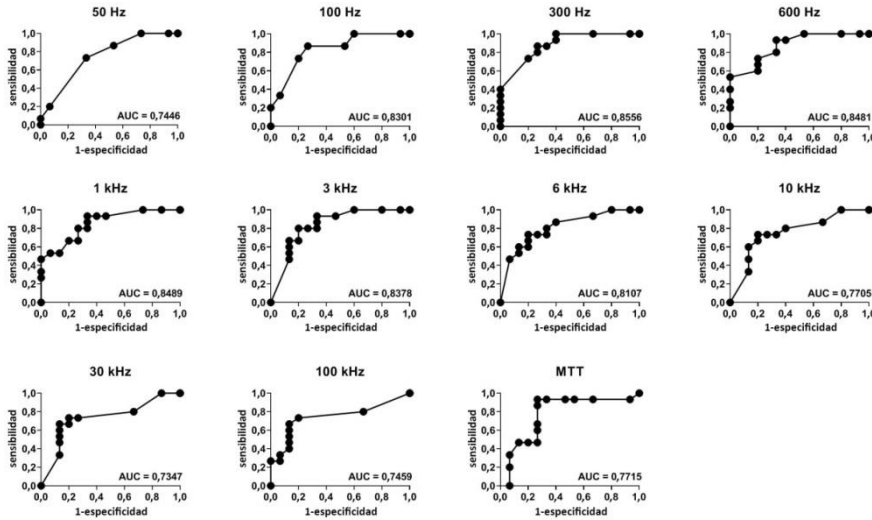


Figura 27: Curvas ROC y AUC para cada frecuencia de capacitancia y MTT

C5.4. Discusión

A pesar de las ventajas de la evaluación de la impedancia, como su capacidad de ser integrada en los actuales protocolos estandarizados, la evaluación de la capacitancia no se ha establecido aún como una metodología estandarizada para la caracterización de modelos de tejido *in vitro* 3D a pesar de haber demostrado su utilidad en la evaluación del crecimiento celular[152] o durante la evaluación del daño celular en modelos 2D[153] y 3D[154]. Por el contrario, la TEER ha sido recientemente aceptada como una metodología estandarizada para la predicción de la irritación ocular por la OECD[21]; no obstante, se emplea una metodología distinta a la utilizada en este estudio que limita ampliamente el dominio de aplicación de los compuestos químicos a aquellos con $\text{pH} > 5$ sin incluir los compuestos sólidos. En este caso, la TEER también se ha establecido como un estándar para establecer un control de calidad antes del uso de los modelos celulares en los ensayos de irritación, lo cual

previamente implicaba un análisis destructivo de la resiliencia contra detergentes como el Triton-X o el SLS[22]. En este estudio, también se ha optado por utilizar la TEER como criterio de control de calidad para la producción de QobuR-RhCE dado que permite la evaluación individualizada de los modelos RhCE, garantizando de este modo un desempeño similar en todos ellos. En este estudio, se muestra que además de la TEER, la capacitancia puede ser utilizada para monitorizar los cambios producidos por el aumento de número de capas celulares durante la maduración epitelial debido a la correlación entre la capacitancia y el tamaño de los condensadores. De este modo, la capacitancia puede ser utilizada en combinación con la TEER para una mejor caracterización tisular que incluya una consistencia en los valores de cantidad de membranas celulares y efecto barrera.

Al evaluar la aplicabilidad de la capacitancia como ensayo complementario durante la evaluación del daño ocular, se evaluó inicialmente sobre los modelos QobuR-RhCE los efectos de daños incrementales tras la aplicación de concentraciones crecientes de SLS. Se puede observar cómo los valores de capacitancia varían siguiendo un patrón dosis-respuesta, pudiendo caracterizar apropiadamente los diferentes grados de daño celular, siendo mayores las diferencias a frecuencias menores a 1 kHz. Sin embargo, a pesar de que los resultados indican que los daños celulares fueron efectivamente inducidos a todas las concentraciones evaluadas de SLS, como se observa en el ensayo TUNEL, estos resultados no se correlacionan con los datos obtenidos de viabilidad celular con el ensayo MTT, donde se observan viabilidades porcentuales > 100% en aquellos modelos tratados con concentraciones bajas de SLS, ni con los valores obtenidos de TEER, donde se observa un rápido descenso tras la aplicación de la menor concentración de SLS. La idea general tras el ensayo MTT es que la conversión de tetrazolio a formazán por acción de las reductasas mitocondriales es dependiente del número de células viables, sin embargo, también se encuentra la posibilidad de que el tratamiento resulte en un incremento de la actividad enzimática, enmascarando los datos relativos a la viabilidad celular. En este estudio, los pequeños daños inducidos por las bajas concentraciones de SLS pueden haber desencadenado la activación de los mecanismos de reparación celular e incrementado con ello el metabolismo y la acción enzimática de las células viables,

llevando a un falso incremento en la viabilidad relativa en comparación a un control sin daño. Es por este motivo por el cual durante los ensayos de predicción de la irritación ocular utilizando los protocolos estandarizados, la viabilidad celular no se evalúa de forma inmediata tras la exposición, como es el caso en la evaluación del daño con SLS, sino tras un periodo de post-exposición que permita recuperar el estado basal tras la aplicación de agentes citotóxicos leves o la aparición de efectos citotóxicos claros [22]. Por otro lado, la TEER se vio altamente afectada tras la aplicación de bajas concentraciones de SLS, mientras que el ensayo TUNEL solamente reveló pequeños daños en las capas epiteliales más superficiales. Debido a que durante la evaluación de la TEER, la impedancia se evalúa a través de la vía paracelular, pequeñas disrupciones en las capas superficiales del epitelio pueden conllevar una pérdida total del efecto barrera debido a la pérdida en la continuidad del epitelio[155]. Con todo ello, este estudio muestra como la evaluación de los daños celulares pueden ser adecuadamente monitorizados mediante la evaluación transcelular de la impedancia utilizando la capacitancia en contraposición a los protocolos actuales basados en el metabolismo celular o en la impedancia por la vía paracelular, ofreciendo, por tanto, una alternativa para la evaluación de las respuestas celulares.

No obstante, para los ensayos de predicción de la irritación ocular, se ha cumplido con las disposiciones desarrolladas por los estándares de desempeño para la evaluación de nuevos modelos RhCE *in vitro* para la evaluación del daño ocular. Con el objetivo de evaluar la idoneidad de la capacitancia para distinguir un resultado binario, irritante o no irritante, se realizó un análisis de las curvas ROC evaluándose el AUC. Las curvas ROC y el análisis del AUC son una metodología ampliamente utilizada que permite cuantificar el desempeño para la clasificación de decisiones binarias a diferentes umbrales[156]. El AUC revela la eficiencia del modelo predictivo para distinguir entre irritantes y no irritantes. En este estudio, se ha utilizado el AUC como método para identificar la frecuencia a la cual la capacitancia permite una predicción más precisa. La clasificación obtenida con el ensayo estándar de MTT en el modelo QobuR-RhCE revela un AUC de 0,7715. A pesar de que este valor representa un desempeño predictivo adecuado, y es comparable al obtenido con las metodologías aceptadas por la OECD para ensayos *in vitro* basados en RhCE[137]; los resultados obtenidos en este

estudio sugieren que la capacitancia obtenida a una frecuencia de 300 Hz puede representar una metodología más eficiente para predecir la irritación ocular en modelos *in vitro* RhCE, debido a que la metodología basada en capacitancia mostró un valor de AUC mayor, y, por tanto, representa un menor grado de solapamiento en los grupos de irritantes y no irritantes. En una curva ROC, dado que cada punto corresponde a un umbral específico y está asociado a una sensibilidad y una especificidad concreta, la selección del umbral de corte requiere un compromiso entre la sensibilidad y la especificidad. En el caso de la evaluación de los daños oculares, la OECD TG 492 exige una especificidad $\geq 60\%$ y una sensibilidad $\geq 90\%$ para cualquier método de ensayo basado en RhCE. En este caso, solamente cuando se utilizaron los umbrales de corte de 1,2 o 1,4 se alcanzó la especificidad y la sensibilidad requeridas en el rango de 300 Hz a 3 kHz, siendo 300 Hz la frecuencia con mayor precisión. Sin embargo, estandarizar una frecuencia específica para predecir la irritación ocular debería ser estudiada en profundidad en posteriores estudios que incluyan un mayor número de productos químicos con el objetivo de validar la capacitancia como una metodología alternativa para la evaluación de la irritación ocular.

Utilizando el ensayo convencional de MTT, se ha obtenido un 73% de especificidad, 93% de sensibilidad y 83% de precisión, mientras que con la evaluación de capacitancia a 300 Hz se ha obtenido un 66% de especificidad, 100% de sensibilidad y 83% de precisión. En este caso, todos los productos químicos de Categoría 1 y Categoría 2 fueron correctamente identificados como irritantes utilizando la capacitancia, mientras que el MTT tuvo la excepción del compuesto *1,4-Dibutoxy benzene* (Categoría 2), un compuesto ya identificado como falso negativo en las metodologías validadas de referencia[22]. Además, también se han identificado pequeñas diferencias en la clasificación de compuestos químicos sin categoría. Por un lado, el *2-Ethoxyethyl methacrylate*, el *3-Phenoxybenzyl alcohol* y el *Ethyl thioglycolate* fueron erróneamente clasificados utilizando tanto el MTT como la capacitancia, mientras que el *2,2'-[[3-Methyl-4-[(4-nitrophenyl)azo]-phenyl]imino]bis-ethanol* fue exclusivamente clasificado erróneamente utilizando el ensayo MTT y el *1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate* y el *Trisodium mono-(5-(1,2-dihydroxyethyl)-4-oxido-2-oxo-2,5-dihydro-furan-3-yl)phosphate* fueron exclusivamente clasificados erróneamente utilizando la capacitancia. Sin

embargo, todos los falsos positivos identificados como falsos positivos independientemente de la técnica utilizada han sido previamente identificados como falsos positivos en algún punto de la validación de los métodos de referencia[22,137,139], y las diferencias específicas entre los métodos pueden ser atribuibles al hecho de que el *Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate* se encuentra en el umbral de clasificación como irritante por MTT ($64,0 \pm 22,5\%$), y que el *2,2'-[[3-Methyl-4-[(4-nitrophenyl)azo]-phenyl]imino]bis-ethanol* y el *Trisodium mono-(5-(1,2-dihydroxyethyl)-4-oxido-2-oxo-2,5-dihydro-furan-3-yl)phosphate* son compuestos que interfieren químicamente con el MTT, a pesar de que se utilizaron los controles adecuados en cada caso para obtener las correcciones pertinentes.

Es importante destacar que solamente los ensayos de viabilidad basados en tetrazolio se encuentran dentro del dominio de aplicación de los protocolos estandarizados que se han seguido en este trabajo y cuyos límites de capacidad predictiva se han establecido en base al desempeño predictivo de los métodos validados de referencia EpiOcular EIT[157] y SkinEthic HCE EIT[136] que utilizaron el ensayo MTT. A pesar de que la clasificación por MTT en métodos basados en RhCE ha demostrado ser de gran utilidad para la identificación de irritantes y no irritantes, la actual clasificación de irritantes ocular también requiere de la evaluación de la reversibilidad de los efectos tras la aplicación. En el test *in vivo* de Draize, la reversibilidad de los efectos se evalúa durante un periodo de 21 días; sin embargo, el ensayo MTT no es el más adecuado para evaluar los efectos reversibles dado que carece del potencial de evaluación repetitiva en la misma muestra a diferentes tiempos. El uso de la capacitancia como metodología complementaria puede refinar los actuales protocolos de predicción de la irritación ocular en métodos basados en RhCE y puede suponer un reemplazo para los ensayos *in vivo* debido a su capacidad de ser utilizada dentro de un ensayo no invasivo y no destructivo. En este sentido, la evaluación repetida a lo largo del tiempo de la TEER a una frecuencia de 1 kHz ya ha demostrado ser capaz de identificar efectos reversibles e irreversibles en modelos de epidermis reconstruida, permitiendo la clasificación de sustancias irritantes reversibles utilizando un limitado grupo de productos químicos[158]. A pesar de que en este estudio no se ha evaluado la reversibilidad de los efectos producidos tras la exposición a los productos químicos, se ha demostrado que los análisis de

impedancia basados en la evaluación de la capacitancia son adecuados para predecir los procesos de irritación ocular siguiendo los actuales procedimientos y, dado que fue posible la monitorización de forma repetida sobre los modelos QobuR-RhCE para detectar los cambios producidos durante la maduración y pre y post tratamiento con los productos químicos, este estudio representa la prueba de concepto para el desarrollo de nuevos protocolos que pueden determinar los efectos reversibles sobre modelos RhCE o incluso determinar pequeños daños celulares que puedan conllevar a efectos adversos tras una aplicación sostenida en el tiempo, como es el caso de la exacerbación *in vivo* del síndrome de ojo seco tras la aplicación de soluciones oftálmicas conteniendo cloruro de benzalkonio.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este estudio, es posible la incorporación de la capacitancia dentro de las estrategias actuales de evaluación en modelos RhCE, bien como un proceso interno de control de calidad para evaluar el estado de maduración epitelial, como nuevo criterio para la determinación de compuestos irritantes y no irritantes complementando los actuales ensayos basados en la viabilidad celular.

Capítulo 6

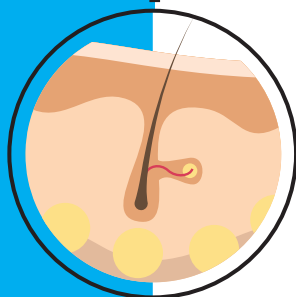
Uso de la capacitancia para la evaluación de la irritación cutánea



Equus ferus

3.831 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

QileX-RhE



Evaluación de la utilidad del modelo de epidermis reconstruida para la evaluación de la irritación cutánea

Evaluación de la irritación cutánea



Evaluación de 20 compuestos químicos de referencia por triplicado en tres lotes de tejido

Análisis de las variaciones en la impedancia



Evaluación de los diferentes componentes de la impedancia antes y después de la aplicación de los compuestos químicos

Método acorde a los requisitos establecidos por la OECD



100% de sensibilidad
100% de especificidad
100% de precisión

C6.1. Introducción

En respuesta a la prioridad europea de reemplazar y minimizar la experimentación animal, se han desarrollado diferentes modelos RhE como alternativa para la evaluación de la irritación cutánea, habiendo sido algunos de ellos validados e incluidos en la OECD TG 439[29]. Todos los métodos basados en RhE para la identificación de compuestos irritantes basan su predicción en el estudio de la actividad metabólica celular a través del ensayo MTT tras la aplicación de los productos de estudio. Una reducción en la actividad metabólica de los modelos RhE se asocia de esta manera a un menor número de células viables, relacionando la muerte celular con los procesos de irritación cutánea[29].

No obstante, la evaluación de la capacitancia a través de la EIS es una técnica de gran utilidad para estudiar el estado y las variaciones de modelos RhE tras la aplicación de diferentes compuestos, y que ya ha mostrado su utilidad en la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo en modelos RhCE[159]. Esto es debido a que los modelos RhE son sistemas compuestos por elementos conductores y elementos dieléctricos. En un modelo RhE, el medio intracelular y extracelular se comporta como un electrolito, mientras que las membranas celulares forman un aislante eléctrico[160]. El estudio de la EIS permite además diferenciar los efectos provocados por los elementos mayoritariamente capacitivos (membranas celulares) y los elementos mayoritariamente resistivos (uniones intercelulares). Esto resulta, por tanto, en la posibilidad de realizar un análisis independiente de la afectación sobre los modelos RhE, tanto a nivel celular como a nivel estructural.

La evaluación de la afectación a nivel estructural ya ha sido investigada de forma individualizada en el capítulo anterior utilizando la TEER, la cual está ligada a la resistencia de las uniones intercelulares, reflejando una medida cuantitativa del efecto barrera epitelial[39]. En este capítulo, se hace uso del modelo QileX-RhE, un modelo *in vitro* de RhE consistente en células epiteliales diferenciadas en 3D, sobre el que se realiza un análisis para la identificación de compuestos irritantes en base a las variaciones sobre la capacitancia antes y después de la aplicación de diferentes productos químicos de referencia.

En definitiva, el trabajo de este capítulo presenta la utilidad de la EIS como una herramienta independiente, o complementaria, para estudiar la irritación cutánea en modelos RhE, haciendo posible la identificación de compuestos irritantes de una manera no invasiva y allanando el camino para la implementación de la EIS como una nueva herramienta a utilizar en ensayos regulados enfocados al reemplazo de la experimentación animal.

C6.2. Diseño experimental

QileX-RhE

Para este estudio, se utilizaron modelos QileX-RhE con valores de TEER $\geq 600 \Omega\text{cm}^2$ y $\leq 2500 \Omega\text{cm}^2$.

Evaluación de la irritación cutánea

Con el objetivo de evaluar si la EIS puede utilizarse para la identificación de compuestos causantes de procesos de irritación cutánea en el modelo QileX-RhE, la capacitancia fue evaluada antes y después de 2 horas, 24 horas y 42 horas de la aplicación de los productos químicos de acuerdo con la metodología descrita en la OECD TG 439 para la identificación de compuestos que causan irritación cutánea. La evaluación de la capacitancia se realizó de manera complementaria durante el estudio de pre-validación descrito en el capítulo anterior, utilizándose los datos de viabilidad a modo comparativo en este capítulo.

Productos químicos

Se han evaluado los 20 compuestos químicos de referencia detallados en la lista mínima de productos químicos de referencia recomendados para la evaluación de los estándares de desempeño para propuestas similares o modificadas de RhE (Tabla 15).

Todos los compuestos fueron evaluados por triplicado en tres réplicas experimentales.

Análisis de datos

Con el objetivo de predecir la irritación cutánea, los datos de capacitancia (C) obtenidos antes y después de los tratamientos con los productos químicos fueron normalizados para cada frecuencia y tiempo evaluados como C/C_0 , siendo C_0 el valor inicial de capacitancia obtenido antes de la aplicación de los productos químicos y C el valor de capacitancia tras 2 h, 24 h o 42 h.

La frecuencia óptima de evaluación se determinó mediante un análisis espectral dependiente de frecuencia. La frecuencia en la que la capacitancia mostró una mayor respuesta fue seleccionada para la predicción de la irritación cutánea.

El tiempo óptimo de evaluación se determinó mediante curvas ROC y el análisis del AUC. De forma similar, el mejor umbral para la clasificación fue seleccionado en base al valor que mostró una mejor precisión en la discriminación de compuestos irritantes y no irritantes.

C6.3. Resultados

Evaluación de la irritación cutánea

El análisis de los modelos QileX-RhE fue realizado antes y después de la aplicación de las sustancias químicas en tres tiempos diferentes (2, 24 y 42 horas) en un rango de frecuencias de [1 Hz – 1 MHz].

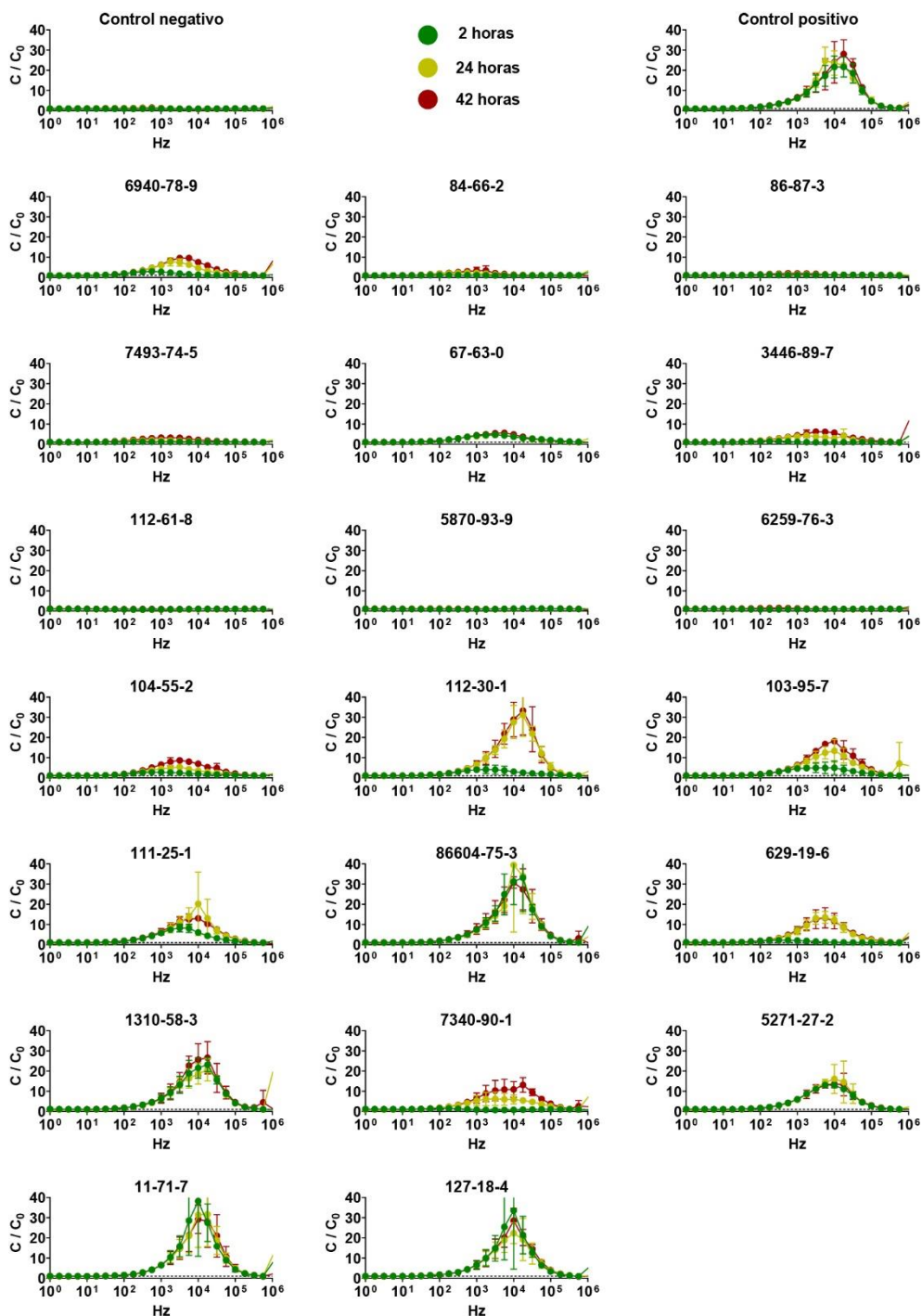


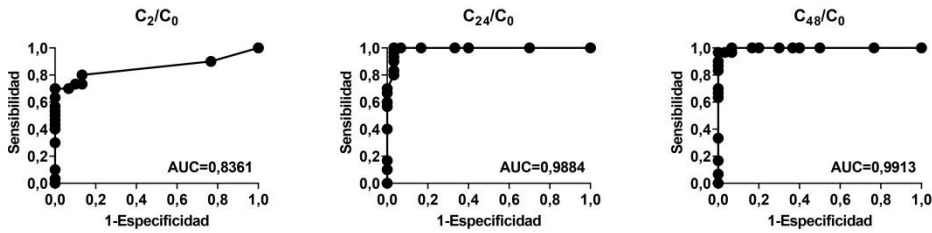
Figura 28: Determinación de la frecuencia óptima mediante análisis espectral dependiente de frecuencia. Los datos se muestran como capacitancia normalizada (eje Y) frente a la frecuencia (eje X) evaluado a 2, 24 y 42 horas. Los datos se muestran como media \pm SD; n=3

Tal y como se muestra en la Figura 28 el análisis del espectro de las variaciones de la capacitancia muestra una respuesta máxima tras la aplicación del control positivo, así como en otros productos químicos, cuando la capacitancia es evaluada a 17 kHz. De este modo, se ha seleccionado la frecuencia de 17 kHz para el análisis de los efectos causados tras la aplicación de los diferentes productos en los modelos QileX-RhE (Tabla 20).

Tabla 20: Datos de capacitancia normalizada evaluada a 17 kHz tras la exposición

Producto químico	Capacitancia normalizada [17 kHz]		
	2 horas	24 horas	42 horas
Control negativo	0,96 ± 0,02	0,87 ± 0,10	0,81 ± 0,07
Control positivo	21,66 ± 4,94	22,50 ± 1,24	28,04 ± 7,04
No irritantes <i>in vivo</i> (GHS Sin Categoría)			
6940-78-9	1,17 ± 0,22	3,17 ± 0,48	5,88 ± 1,15
84-66-2	0,97 ± 0,15	1,07 ± 0,10	1,19 ± 0,17
86-87-3	1,26 ± 0,09	1,24 ± 0,23	1,30 ± 0,34
7493-74-5	1,08 ± 0,14	1,17 ± 0,23	1,74 ± 0,38
67-63-0	3,13 ± 0,22	2,89 ± 0,20	3,65 ± 0,74
3446-89-7	1,05 ± 0,06	4,10 ± 3,49	4,20 ± 0,55
112-61-8	1,04 ± 0,08	0,88 ± 0,09	0,95 ± 0,27
5870-93-9	1,17 ± 0,14	1,07 ± 0,18	1,11 ± 0,18
6259-76-3	1,00 ± 0,15	0,96 ± 0,13	0,92 ± 0,25
104-55-2	1,74 ± 0,65	2,83 ± 0,27	5,28 ± 1,28
Irritantes <i>in vivo</i> (GHS Categoría 2)			
112-30-1	2,55 ± 1,00	31,22 ± 10,71	33,29 ± 12,00
103-95-7	4,01 ± 2,27	10,94 ± 3,70	13,88 ± 4,53
111-25-1	4,41 ± 2,27	13,01 ± 9,56	10,30 ± 0,10
86604-75-3	33,16 ± 16,72	34,00 ± 18,61	27,41 ± 10,15
629-19-6	1,12 ± 0,35	8,31 ± 2,24	8,56 ± 2,44
1310-58-3	23,17 ± 3,50	20,58 ± 5,44	26,61 ± 7,99
7340-90-1	0,89 ± 0,17	5,45 ± 1,19	13,10 ± 3,63
5271-27-2	11,10 ± 1,54	14,60 ± 10,37	13,36 ± 5,62
111-71-7	27,52 ± 9,31	31,72 ± 15,98	28,20 ± 12,85
127-18-4	21,42 ± 9,29	19,26 ± 10,44	20,21 ± 4,03

Seguidamente, con el objetivo de determinar el tiempo de evaluación que ofrecía una mejor predicción, se realizó un análisis de curvas ROC. El análisis de curvas ROC se realizó con los datos de capacitancia normalizada a 17 kHz de los 20 compuestos químicos de referencia evaluados tras 2, 24 y 42 horas tras la exposición. Como se observa en la Figura 29, el análisis de la capacitancia normalizada mostró un desempeño predictivo acorde a los requerimientos establecidos en la OECD TG 439 en todos los casos (sensibilidad $\geq 80\%$; especificidad ≥ 70 y precisión $\geq 75\%$). En resumen, el valor del umbral óptimo para la clasificación se determinó en 1,5 para los datos de capacitancia evaluados tras 2 horas de aplicación, obteniendo un AUC de 0,8361; 4 para los datos de capacitancia evaluados tras 24 horas de aplicación, obteniendo un AUC de 0,9884; y un rango entre 7,5 y 8,5 para los datos de capacitancia obtenidos tras 42 horas de aplicación, obteniendo un AUC de 0,9913.



2 h				24 h				48 h			
Umbral	Sensibilidad	Especificidad	Precisión	Umbral	Sensibilidad	Especificidad	Precisión	Umbral	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
0	1,00	0,00	0,50	0	1,00	0,00	0,50	0	1,00	0,00	0,50
0,5	1,00	0,00	0,50	0,5	1,00	0,00	0,50	0,5	1,00	0,00	0,50
1	0,90	0,23	0,57	1	1,00	0,30	0,65	1	1,00	0,23	0,62
1,5	0,80	0,87	0,83	1,5	1,00	0,60	0,80	1,5	1,00	0,50	0,75
2	0,73	0,87	0,80	2	1,00	0,60	0,80	2	1,00	0,60	0,80
2,5	0,73	0,90	0,82	2,5	1,00	0,67	0,83	2,5	1,00	0,60	0,80
3	0,70	0,93	0,82	3	1,00	0,83	0,92	3	1,00	0,63	0,82
3,5	0,70	1,00	0,85	3,5	1,00	0,93	0,97	3,5	1,00	0,63	0,82
4	0,63	1,00	0,82	4	1,00	0,97	0,98	4	1,00	0,70	0,85
4,5	0,57	1,00	0,78	4,5	0,97	0,97	0,97	4,5	1,00	0,80	0,90
5	0,53	1,00	0,77	5	0,97	0,97	0,97	5	1,00	0,83	0,92
5,5	0,53	1,00	0,77	5,5	0,97	0,97	0,97	5,5	1,00	0,93	0,97
6	0,53	1,00	0,77	6	0,93	0,97	0,95	6	0,97	0,93	0,95
6,5	0,50	1,00	0,75	6,5	0,90	0,97	0,93	6,5	0,97	0,93	0,95
7	0,50	1,00	0,75	7	0,83	0,97	0,90	7	0,97	0,97	0,97
7,5	0,50	1,00	0,75	7,5	0,80	0,97	0,88	7,5	0,97	1,00	0,98
8	0,50	1,00	0,75	8	0,80	0,97	0,88	8	0,97	1,00	0,98
8,5	0,50	1,00	0,75	8,5	0,70	1,00	0,85	8,5	0,97	1,00	0,98
9	0,50	1,00	0,75	9	0,67	1,00	0,83	9	0,90	1,00	0,95
9,5	0,47	1,00	0,73	9,5	0,60	1,00	0,80	9,5	0,87	1,00	0,93
10	0,47	1,00	0,73	10	0,60	1,00	0,80	10	0,83	1,00	0,92
10,5	0,47	1,00	0,73	10,5	0,60	1,00	0,80	10,5	0,70	1,00	0,85
11	0,47	1,00	0,73	11	0,57	1,00	0,78	11	0,70	1,00	0,85
11,5	0,43	1,00	0,72	11,5	0,57	1,00	0,78	11,5	0,70	1,00	0,85
12	0,43	1,00	0,72	12	0,57	1,00	0,78	12	0,67	1,00	0,83
12,5	0,40	1,00	0,70	12,5	0,57	1,00	0,78	12,5	0,67	1,00	0,83
13	0,40	1,00	0,70	13	0,57	1,00	0,78	13	0,63	1,00	0,82
13,5	0,40	1,00	0,70	13,5	0,57	1,00	0,78	13,5	0,63	1,00	0,82
14	0,40	1,00	0,70	14	0,57	1,00	0,78	14	0,63	1,00	0,82
20	0,30	1,00	0,65	20	0,40	1,00	0,70	20	0,33	1,00	0,67
30	0,10	1,00	0,55	30	0,17	1,00	0,58	30	0,17	1,00	0,58
40	0,03	1,00	0,52	40	0,10	1,00	0,55	40	0,07	1,00	0,53
60	0,00	1,00	0,50	60	0,00	1,00	0,50	60	0,00	1,00	0,50

Figura 29: Análisis de curvas ROC para 20 productos químicos de referencia. Los campos resaltados indican valores de umbral que cumplen los requisitos de la OECD TG 439

Con el objetivo de evaluar la reproducibilidad intra-laboratorio del método de predicción basado en el análisis de la capacitancia, se han seleccionado los datos obtenidos tras 42 horas de exposición utilizando un umbral de 7,5 tal y como sugiere el análisis de la curva ROC. En general, las decisiones de clasificación fueron consistentes excepto en el caso del *Di-n-propyl disulphide* (CASRN: 629-19-6), el cual fue clasificado de manera no concordante en uno de los ensayos. Por tanto, se ha obtenido un 95% (19/20) de concordancia de las decisiones de irritante y no irritante, cumpliendo así con el criterio de reproducibilidad intra-laboratorio $\geq 90\%$ definida en la OECD TG 439.

Tabla 21: Reproducibilidad intra-laboratorio del análisis de capacitancia en el modelo QileX-RhE. Los campos resaltados indican una predicción irritante de acuerdo al umbral establecido. Los datos se muestran como media ± SD

Producto	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	Decisión
Control negativo	0,88 ± 1,13	0,74 ± 0,04	0,8 ± 0,32	0,81 ± 0,07	NI
Control positivo	36,08 ± 9,19	25,07 ± 2,55	22,97 ± 13,73	28,04 ± 7,04	I
No irritantes <i>in vivo</i> (GHS No Categoría)					
1	5,34 ± 0,79	5,11 ± 0,10	7,20 ± 2,39	5,88 ± 1,15	NI
2	1,00 ± 0,14	1,34 ± 0,42	1,23 ± 0,29	1,19 ± 0,17	NI
3	0,85 ± 0,08	1,90 ± 0,28	1,14 ± 0,09	1,30 ± 0,54	NI
4	1,31 ± 0,23	1,92 ± 0,50	1,14 ± 0,84	1,74 ± 0,38	NI
5	2,87 ± 0,93	3,75 ± 0,98	4,33 ± 1,33	3,65 ± 0,74	NI
6	3,59 ± 1,78	4,67 ± 2,62	4,35 ± 2,24	4,20 ± 0,55	NI
7	0,95 ± 0,17	1,21 ± 0,12	0,68 ± 0,05	0,95 ± 0,27	NI
8	1,13 ± 0,11	1,28 ± 0,03	0,92 ± 0,04	1,11 ± 0,18	NI
9	0,97 ± 0,05	1,14 ± 0,14	0,65 ± 0,09	0,92 ± 0,25	NI
10	4,02 ± 0,27	5,24 ± 0,42	6,57 ± 1,28	5,28 ± 1,28	NI
Irritantes <i>in vivo</i> (GHS Categoría 2)					
11	38,66 ± 8,45	41,67 ± 2,66	19,55 ± 10,43	33,29 ± 12,00	I
12	15,69 ± 6,58	17,22 ± 2,91	8,73 ± 4,88	13,88 ± 4,53	I
13	10,25 ± 0,49	10,23 ± 0,89	10,42 ± 3,41	10,30 ± 0,10	I
14	36,55 ± 10,60	29,21 ± 5,99	16,48 ± 8,15	27,41 ± 10,15	I
15	9,50 ± 0,70	10,38 ± 1,03	5,79 ± 2,30	8,56 ± 2,44	I
16	20,26 ± 4,76	35,58 ± 14,10	23,98 ± 8,76	26,61 ± 7,99	I
17	9,63 ± 0,69	12,80 ± 0,78	16,88 ± 16,24	13,10 ± 3,63	I
18	8,81 ± 2,09	11,64 ± 4,63	19,64 ± 13,67	13,36 ± 5,62	I
19	25,15 ± 5,44	42,30 ± 4,93	17,16 ± 2,99	28,20 ± 12,85	I
20	19,89 ± 3,37	24,39 ± 4,54	16,35 ± 3,21	20,21 ± 4,03	I

I: Irritante; NI: No Irritante

Por último, se compararon los resultados con la clasificación obtenida utilizando el ensayo de viabilidad MTT, dado que es el método de elección sugerido en la OECD TG 439. Como se muestra en la Figura 30, la predicción obtenida utilizando la capacitancia obtuvo un 100% de sensibilidad, 100% de especificidad y 100% de precisión; mientras que con el uso del ensayo de viabilidad relativa en las mismas muestras se obtuvo un 90% de sensibilidad, 70% de especificidad y 80% de precisión.

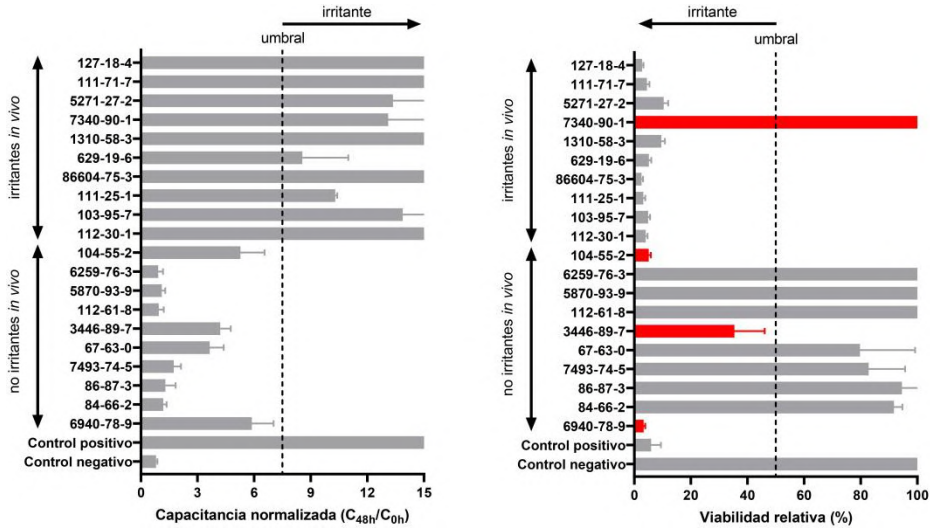


Figura 30: Comparativa entre la predicción obtenida mediante el análisis de la capacitancia tras 42 horas post-exposición a 17 kHz frente al análisis de viabilidad a las 42 horas. El color rojo indica una falsa predicción. La línea de puntos indica el umbral de clasificación (7,5 para la capacitancia y 50% para la viabilidad relativa)

C6.4. Discusión

A pesar de las ventajas de la EIS, hoy en día sigue sin ser una técnica estandarizada para la caracterización de modelos RhE. La técnica más extendida para la evaluación de modelos RhE es la TEER, una medida que se correlaciona con la integridad de las uniones intercelulares y el efecto barrera[39]. Sin embargo, la EIS tiene un gran número de ventajas frente al método de evaluación de la TEER. En concreto, permite la evaluación de un parámetro eléctrico adicional de los modelos RhE, la capacitancia. Previamente, ya se ha demostrado que las variaciones en la capacitancia pueden correlacionarse con el estado de maduración de un modelo RhCE[159]. De este modo, dado que la EIS es una técnica que no requiere mucho más tiempo experimental que la evaluación de la TEER, el análisis mediante EIS resulta más óptimo para la evaluación del estado celular de los modelos RhE dado que permite la evaluación simultánea de todos los parámetros eléctricos de un modelo RhE (incluyendo la TEER y la capacitancia).

A medida que el uso de modelos RhE vaya reemplazando a la experimentación animal, es previsible que surjan nuevos desafíos que deban ser tenidos en cuenta. Entre ellos, la utilización de metodologías no invasivas y libres de marcadores para la evaluación de los estados celulares será un requisito

indispensable en base a las previsiones de aumento de complejidad en los modelos celulares, como por ejemplo durante su integración en sistemas *organ-on-a-chip*[161,162]. En este sentido, la EIS se presenta como una metodología capaz de cumplir estos requisitos, si bien su utilización aún no ha sido adoptada como estándar en la industria.

En este capítulo se evalúa la utilidad de una técnica no-destructiva y no-invasiva basada en el análisis mediante EIS como método predictivo de la irritación cutánea siguiendo los criterios estandarizados descritos en la OECD TG 439 y en el Documento de guía N° 220 para el desarrollo de nuevos métodos predictivos basados en RhE. Los resultados obtenidos muestran que ha sido posible integrar la evaluación de la capacitancia en los protocolos estandarizados para la evaluación de la irritación cutánea en modelos RhE sin interferir en la evaluación de la viabilidad celular por MTT. De este modo, a través del estudio de la capacitancia ha sido posible estudiar la evolución de los daños celulares tras la aplicación de los compuestos químicos tras 2 h, 24 h y 42 h. En base a la metodología convencional utilizando el ensayo MTT, la evaluación de la viabilidad celular debe realizarse tras un periodo de incubación post-tratamiento suficiente para la recuperación de efectos citotóxicos leves y la aparición de efectos citotóxicos claros[29]. Sin embargo, no se hace ninguna distinción entre los productos causantes de estos daños, dado que el ensayo MTT solo puede realizarse una única vez por muestra, por lo que es evaluado únicamente tras 42 horas post-tratamiento, llevando a una predicción final de irritación. Por el contrario, el análisis mediante EIS permite la comparación de los valores individuales de capacitancia pre- y post-tratamiento a diferentes intervalos, lo que permite la evaluación de efectos graves y reversibles en los modelos de epidermis. En nuestros resultados, no se han observado efectos reversibles para los productos químicos evaluados; sin embargo, en algunos casos, respuestas irritantes identificadas a las 24 o 42 horas post-exposición no fueron inicialmente detectadas tras 2 horas post-exposición (producto CASRN 629-19-6 y CASRN 7340-90-1), indicando diferentes grados de capacidad irritante que podrían ser subclasificados con el objetivo de refinar la evaluación de la irritación.

Con el objetivo de determinar la frecuencia que puede ofrecer una mayor capacidad predictiva, se ha evaluado la capacitancia en un amplio rango de frecuencias [1 Hz – 1 MHz]. En el caso de QileX-RhE, se ha observado un pico en la respuesta de la capacitancia tras la aplicación de determinados compuestos a 17 kHz, seleccionándose esta frecuencia para los subsiguientes análisis. Seguidamente, se realizó un análisis mediante curvas ROC para evaluar la capacidad predictiva en los diferentes tiempos evaluados. En todos los tiempos evaluados se ha podido determinar una predicción que se ajusta a los requisitos de la OECD TG 439, asumiendo eso sí diferente sensibilidad, especificidad y precisión. Como se ha sugerido, esto podría ser atribuido a diferentes mecanismos y potenciales irritantes de cada producto químico, los cuales pasan inadvertidos en los ensayos de viabilidad por MTT, dado que solo evalúa la capacidad irritante tras 42 horas. En cualquier caso, se ha estimado un AUC de 0,8361 a las 2 horas post-exposición, un AUC de 0,9884 a las 24 horas y un AUC de 0,9913 a las 42 horas, lo cual sugiere una validez discriminativa excepcional del método de predicción[156] en comparación con lo que puede ser obtenido con el MTT en los métodos validados de referencia[163]. Como comparativa final, se ha seleccionado el análisis que mejor desempeño ha obtenido y se ha comparado con los resultados de viabilidad por MTT obtenidos sobre las mismas muestras. En este caso, se ha obtenido un 100% de sensibilidad, 100% de especificidad, 100% de precisión y 95% de reproducibilidad intra-laboratorio utilizando el análisis de la capacitancia. Por el contrario, se ha obtenido un 90% de sensibilidad, 70% de especificidad, 80% de precisión y 100% de reproducibilidad intra-laboratorio mediante el análisis de la viabilidad por MTT; estando este resultado en línea con las predicciones obtenidas en los estudios de validación de los métodos RhE de referencia utilizando los mismos productos químicos[101,125,126,163].

Esta diferencia en la clasificación entre los datos de capacitancia y los datos de viabilidad celular, a pesar de haber sido obtenidos en las mismas muestras experimentales, puede ser explicada debido a que la irritación cutánea es el resultado de una alteración de la barrera cutánea, en combinación con una activación de la respuesta inmunitaria innata que actúa en la dermis y que desemboca en la dilatación y el aumento de la permeabilidad de las células endoteliales de los vasos sanguíneos[164]. Dado que los modelos RhE carecen de

vasculatura, el ensayo MTT basa su predicción en la muerte celular como evento iniciador de la cascada inflamatoria[29]. Sin embargo, la muerte celular puede no resultar siempre en una cascada pro-inflamatoria debido a que las diferentes rutas que llevan a la muerte celular desempeñan un papel fundamental en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias[165]. De este modo, una sustancia química que induzca la muerte celular por apoptosis tras la exposición, no desencadenará una cascada pro-inflamatoria que conduzca a la irritación *in vivo*; sin embargo, conducirá a un resultado de falso positivo atendiendo al ensayo MTT. Por el contrario, estudios previos han sugerido que los ratios de capacitancia son mayores en la necrosis que en la apoptosis[153], lo que permite diferenciar si una sustancia química desencadenará una cascada inflamatoria o no. En consecuencia, y como sugieren nuestros resultados, el análisis de la capacitancia parece estar más relacionado con los eventos desencadenantes de la cascada pro-inflamatoria que conduce a la irritación *in vivo* y representa un valioso método para evaluar la irritación de la piel en modelos RhE.

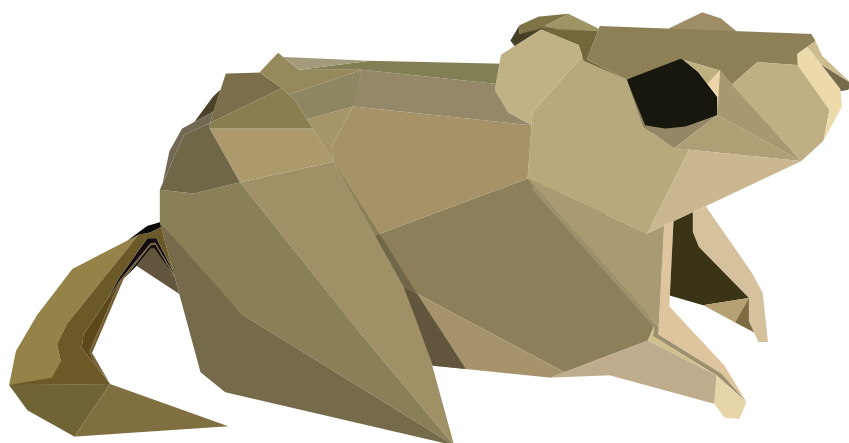
La utilización de la capacitancia como sistema predictivo del daño celular ha sido ampliamente descrito por diferentes autores[153,166], y ha demostrado además ser un mejor sistema predictivo que los ensayos basados en MTT durante la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo en modelos RhCE[159]. No obstante, los datos obtenidos a través de la EIS deben ser evaluados con cautela debido al escaso conocimiento de todos los parámetros que afectan a la impedancia en modelos RhE. Además, debido a la complejidad de la teoría electromagnética de la que surge la EIS, se hace todavía necesario popularizar y divulgar los métodos basados en impedancia para su adopción generalizada en el campo de la biomedicina. No obstante, en aras del refinamiento de métodos alternativos y de la promoción de su utilización en ámbitos más amplios, los organismos reguladores deben reconocer diferentes metodologías científicamente sólidas que demuestren un rendimiento comparable y ofrezcan nuevas perspectivas sobre los procesos celulares que puedan trasladarse a la evaluación de la seguridad para la salud humana.

Teniendo en cuenta los datos de este estudio, la evaluación de la capacitancia en modelos RhE permite predecir los procesos de irritación cutánea

en base a los requisitos establecidos en la OECD TG 439 y en el Documento de guía N° 220, mediante un sistema rápido, no invasivo y que puede ser utilizado en combinación con otros ensayos.

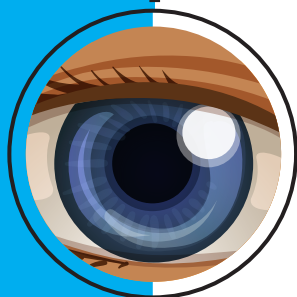
Capítulo 7

Evaluación del efecto protector de pomadas enriquecidas en vitamina A



Meriones unguiculatus
2.978 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

QobuR-RhCE



Análisis de la utilidad del modelo QobuR-RhCE para el tratamiento del síndrome de ojo seco

Evaluación de nuevos productos farmacéuticos



Evaluación del efecto de compuestos basados en hidroxipropil guar, carboximetilcelulosa y vitamina A

Evaluación de la afectación al efecto barrera epitelial



Evaluación de la capacidad protectora frente al daño ocular

Validación de la aplicabilidad del modelo QobuR-RhCE



Es posible la utilización del modelo QobuR-RhCE para la evaluación de nuevos productos farmacéuticos

C7.1. Introducción

El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por la pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y cuya etiología suele acompañar diversos síntomas oculares como inestabilidad e hiperosmolaridad de la película lagrimal, inflamación y daño de la superficie ocular y anomalías neurosensoriales[167]. La enfermedad del ojo seco (DED) es la enfermedad ocular más común, con una prevalencia que oscila entre el 5% y el 50%, llegando hasta el 75% en algunas poblaciones[168]. La presencia de sintomatología y el diagnóstico clínico de la DED muestran una asociación lineal con la edad, con aumentos graduales de entre el 2,0% y el 10,5% por década a partir de los 50 años[168], pudiendo estar causados por una serie de trastornos sistémicos como la diabetes, los trastornos autoinmunes o los tratamientos de quimioterapia.

Por otro lado, el cierre incompleto del párpado es un fenómeno habitual durante el parpadeo[169], y conlleva una mayor exposición de la superficie ocular al aire y una mayor evaporación de la película lagrimal[169,170]. Asimismo, el lagofthalmos nocturno, esto es, la incapacidad de los párpados aparentemente cerrados de obtener un sellado adecuado durante el sueño, puede reducir la protección de la superficie ocular frente a la exposición al aire. De este modo, el TFOS DEWS II estableció en 2017 que el parpadeo incompleto y el lagofthalmos nocturno son una de las causas principales de la sequedad de la superficie ocular, exponiendo la película lagrimal a una mayor evaporación[171,172] y aumentando el riesgo de desecación ocular e hiperosmolaridad lagrimal [171].

Históricamente, la DED se ha tratado prescribiendo productos de sustitución lagrimal o conservando las lágrimas mediante tapones lagrimales[173]. La sustitución lagrimal con lubricantes oculares se considera la terapia principal para el tratamiento de la DED, existiendo numerosas formulaciones tópicas, a menudo denominadas “lágrimas artificiales”. Muchas lágrimas artificiales contienen polímeros naturales para aumentar su viscosidad y mejorar la lubricación. Entre ellos, los más utilizados son carboximetilcelulosa (CMC), dextrano, hidroxipropil guar (HPG), ácido hialurónico y la hidroxipropilmetilcelulosa. Estos productos han reportado efectos beneficiosos en el tratamiento de la DED de leve a moderada[174]. Sin embargo, estos productos

no se dirigen a la fisiopatología subyacente de la DED[173] y son incapaces de proteger contra la desecación extrema en pacientes en estado crítico[175].

Debido a la facilidad de administración, la vía tópica suele ser la preferida para el tratamiento de las enfermedades oculares, minimizando al mismo tiempo los efectos secundarios sistémicos del fármaco. Los tratamientos para el cierre inadecuado de los párpados incluyen el uso de suplementos lagrimales y pomadas de muy alta viscosidad (normalmente instilados por la noche), así como barreras físicas como gafas de humedad o protectores oculares nocturnos, para obtener el cierre mecánico de los párpados[173]. Aunque muchos expertos aceptan que el cierre mecánico de los párpados es beneficioso en el tratamiento de la queratopatía por exposición grave, solo hay unos pocos estudios controlados o experimentales que comparen la eficacia de algunos de los tratamientos y que no muestran diferencias entre el cierre mecánico de los párpados y el uso de pomadas[175–178]. El estudio de metaanálisis de Li et al.[175] mostró que las pomadas protegían de la desecación corneal, la queratinización epitelial y la ulceración en pacientes críticos, significativamente mejor que los colirios, y con igual eficacia en comparación con las cubiertas de polietileno. Así, las pomadas se posicionan como la elección prioritaria en el uso nocturno en casos de desecación extrema y DED grave[173].

Los tratamientos tópicos suelen además añadir fármacos antiinflamatorios a sus formulaciones, como la ciclosporina A[179,180], o biomoléculas naturales con propiedades antiinflamatorias o de cicatrización de heridas, como factores de crecimiento recombinantes, citoquinas y productos derivados de la sangre (suero autólogo o plasma rico en factores de crecimiento)[181]. De este modo, la vitamina A (palmitato de retinilo) ha sido utilizada como aditivo en numerosas formulaciones de colirios y pomadas, mostrando efectos significativos en la mejora de los síntomas de la DED[180].

A pesar de ello, hasta la fecha, no existe ningún estudio *in vitro* centrado en la eficacia de los tratamientos de tipo pomada para proteger completamente la superficie ocular de la desecación. En este capítulo se estudia la eficacia de una pomada hidrofóbica con parafina y enriquecida en vitamina A (vA-PFF) como

medio de cobertura para la prevención del daño sobre las células del epitelio de la superficie ocular.

C7.2. Diseño experimental

QobuR-RhCE

Para este estudio, se utilizaron modelos QobuR-RhCE con valores de TEER $\geq 750 \Omega\text{cm}^2$ y $\leq 2500 \Omega\text{cm}^2$.

Estudio de protección del efecto barrera

El estudio de protección del efecto barrera se realizó por cuadruplicado en un duplicado experimental. Para ello, los modelos QobuR-RhCE fueron preincubados durante 30 minutos con 100 μL de vA-PFF (Aquoral Noche, Esteve Pharmaceuticals, S.A. Barcelona, Spain) y comparada con dos lubricantes en gel basados en HPG (Systane Gel Drops; Alcon) y CMC (Optava gel drops; Allergan).

Tras la preincubación, los diferentes compuestos fueron retirados y los modelos fueron incubados en una solución 0,022% de detergente no iónico Triton X-100 durante 30 minutos.

Tras la exposición, los modelos fueron lavados en PBS, colocados en una placa con medio de cultivo y estabilizados durante 4 horas a 37 °C y 5% CO_2 .

Como control negativo, se utilizaron modelos sin preincubación y sin exposición a Triton X-100. Como control positivo, se utilizaron modelos preincubados con medio de cultivo y expuestos a Triton X-100.

La TEER inicial y final fue evaluada en todos los modelos y el porcentaje de variación fue calculado y comparado para cada condición.

C7.3. Resultados

Criterios de aceptación

Integridad epitelial (TEER)

Los datos de integridad epitelial de los modelos QobuR-RhCE utilizados en cada ensayo se muestra en la Figura 31.

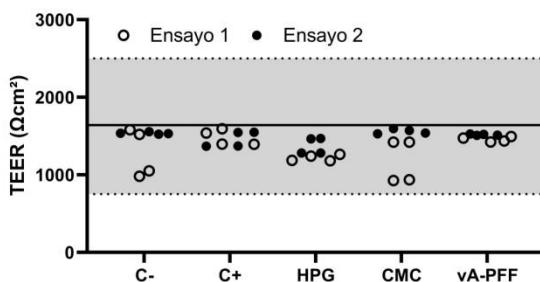


Figura 31: Valores de TEER de cada modelo QobuR-RhCE

Protección del efecto barrera

Los resultados obtenidos tras el estudio de protección del efecto barrera se muestran en la Figura 32 y en la Tabla 22.

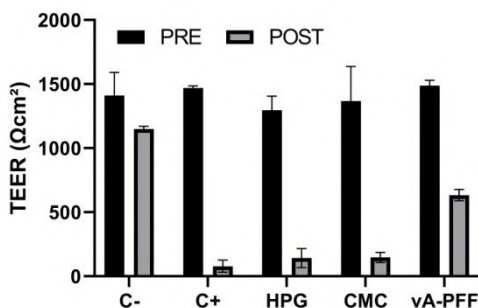


Figura 32: Valores de TEER antes y después de la aplicación del daño con Triton X-100 sobre los modelos QobuR-RhCE pre-tratados con HPG, CMC y vA-PFF

Tabla 22: Porcentaje de variación de la TEER tras el estudio de la protección del efecto barrera

Compuesto	Ensayo 1	Ensayo 2	Media
C-	89,18% ± 5,48%	75,76% ± 1,41%	82,47% ± 9,49%
C+	7,59% ± 0,89%	3,03% ± 0,52%	5,31% ± 3,22%
HPG	15,96% ± 0,60%	6,47% ± 0,84%	11,22% ± 6,71%
CMC	14,22% ± 3,40%	7,69% ± 1,16%	10,95% ± 4,62%
vA-PFF	41,50% ± 8,87%	43,77% ± 0,70%	42,64% ± 1,61%

El estudio de la función barrera muestra una reducción significativa del efecto barrera en todas las muestras analizadas con respecto al control negativo (Figura 33). Además, se encontraron diferencias significativas entre las muestras tratadas con vA-PFF y las muestras tratadas con control positivo, HPG y CMC (Figura 33), revelando un mayor nivel de protección frente al daño por Triton X-100. Por último, no se encontraron diferencias significativas entre el control positivo y las muestras tratadas con HPG y CMC, sugiriendo la ausencia de protección frente al daño por Triton X-100.

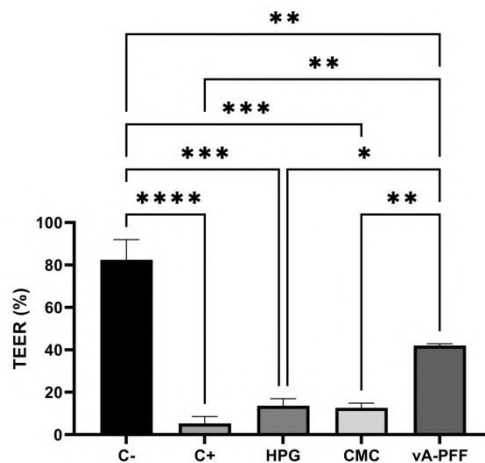


Figura 33: Resultados obtenidos tras el estudio de la protección del efecto barrera. *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,0001**

C7.4. Discusión

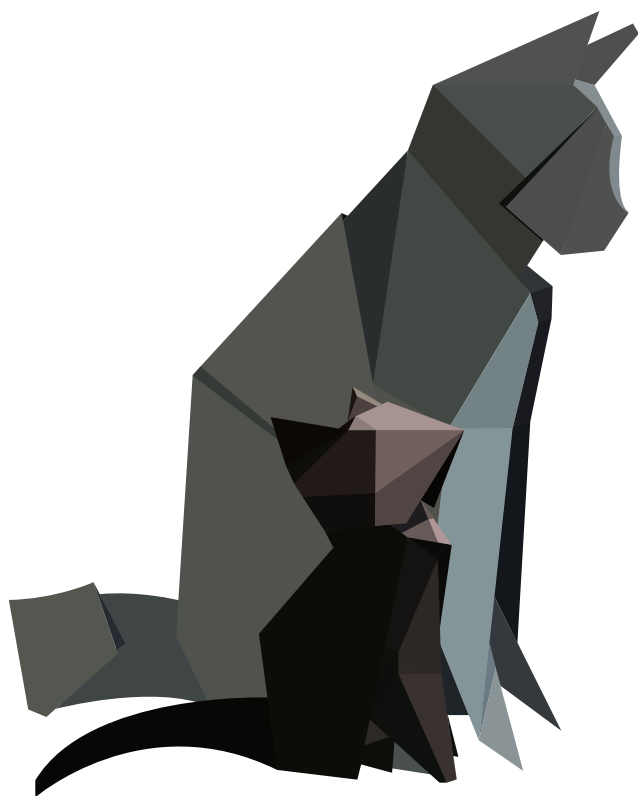
En este capítulo, se demuestran los efectos protectores de una pomada ocular enriquecida en vitamina A sobre el daño en la barrera epitelial en un modelo de epitelio reconstruido. La vitamina A es esencial para el mantenimiento de las células epiteliales, estando implicada en los procesos de regulación celular y diferenciación[182]. De este modo, la ausencia de vitamina A presenta efectos adversos sobre el tejido epitelial ocular, causando una pérdida de células caliciformes e incrementando la queratinización epidérmica y la metaplasia escamosa en las células corneales y conjuntivales[183]. El uso de la vitamina A como terapia combinada con lubricantes oculares para el tratamiento de la DED ha mostrado una mejora significativa en la puntuación del test de Schirmer, el tiempo de rotura lagrimal y los hallazgos citológicos en un estudio prospectivo, aleatorizado, controlado y comparado en paralelo con una solución de ciclosporina A[180].

En este capítulo, se estudia el efecto de una pomada enriquecida en vitamina A como agente protector del efecto barrera del epitelio corneal frente a un daño provocado por un detergente no iónico utilizando la TEER. Los resultados obtenidos muestran que, si bien todos los modelos pre-tratados con los diferentes compuestos (HPG, CMC y vA-PFF) presentan una reducción en la integridad del efecto barrera tras la aplicación de una solución de Triton X-100, se puede observar como la protección frente al daño tras una pre-incubación en vA-PFF protege significativamente mejor que los compuestos basados en HPG y CMC. Este efecto puede, sin embargo, estar relacionado con la naturaleza viscosa de la pomada debido a su contenido en parafina. No obstante, la vitamina A ha demostrado un efecto beneficioso sobre las células epiteliales corneales, tanto en el mantenimiento de la homeostasis como en los procesos de cicatrización[180,182].

De este modo, las propiedades de una pomada ocular enriquecida en vitamina A pueden contribuir a proteger de los efectos causados por una desecación extrema en casos de lagofthalmos nocturno, cierre incompleto del párpado o casos de extrema desecación y DED severo que requiera altos niveles de protección, mediante la formación de una película hidrofóbica con propiedades regenerativas del epitelio corneal, representando un tratamiento prometedor para

pacientes con niveles elevados de exposición al ambiente de la superficie ocular y que necesiten una protección prolongada.

Discusión



Felis silvestris

2.464 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

La experimentación animal ha desempeñado un papel primordial en la investigación biomédica a través de la historia, no estando exenta de acaloradas discusiones públicas y filosóficas acerca de la controversia ética de su utilización. Desde el nacimiento de la medicina, los seres humanos hemos utilizado otras especies de vertebrados (referidos como animales) como modelos anatómicos y fisiológicos, habiendo sido la pieza central para el desarrollo de grandes avances de la investigación biomédica para la salud humana en la historia reciente. A pesar de que la investigación con animales con fines biomédicos continúa siendo moralmente aceptada por la mayoría de la población, el sufrimiento animal es un tema moral y socialmente relevante que ha abierto el debate en busca de un equilibrio ético entre los beneficios aportados por el progreso biomédico y la debida consideración al bienestar de los animales. El principio de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento), introducido por Russel y Burch en 1954, se ha convertido en el principio general de numerosos documentos legislativos que regulan el uso de animales en la ciencia desde la década de los '80.

En la EU, la Directiva 2010/63/EU introduce el principio de las 3Rs a todos los países miembros. En base a esta Directiva, los animales solo pueden ser utilizados con fines biomédicos siempre y cuando los posibles beneficios médicos, veterinarios y científicos sean convincentes y no exista ningún método alternativo viable. Es por ello que el desarrollo de métodos alternativos al uso de animales, como el uso de modelos celulares o la modelización informática, sigue avanzando y su implementación está siendo impulsada a través de piezas clave de la legislación. Una pieza clave que ha fomentado el desarrollo de métodos alternativos en la EU es la Regulación (EC) No. 1907/2006 (REACH). REACH representa el núcleo central que regula el registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas. Bajo REACH, se requiere que los riesgos asociados al uso de cualquier sustancia fabricada o importada en la EU se encuentren debidamente registrados, clasificados y etiquetados. Esto genera la necesidad de identificar las propiedades peligrosas aplicando criterios de clasificación específicos y, a continuación, proporcionar un etiquetado de peligro adecuado e información sobre las medidas de seguridad.

Actualmente, es posible obtener estos requisitos para determinados peligros para la salud humana haciendo uso de métodos alternativos que no implican la utilización de animales y que están validados, u homologados como científicamente válidos, a nivel comunitario por el EURL-ECVAM, con la consideración debida al desarrollo de la validación en la OECD. Dentro de estos peligros, se encuentra la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo y la irritación/corrosión cutánea.

La OECD ha aceptado diversas TG para la evaluación *in vitro* de la irritación ocular/daño ocular severo y la irritación/corrosión cutánea como alternativas al ensayo *in vivo* estandarizado en conejo (OECD TG 404). Parte de estas alternativas *in vitro* hacen uso de modelos RhCE y RhE, los cuales se asemejan histológica, morfológica, bioquímica y fisiológicamente a un epitelio corneal humano normal o a una epidermis humana normal respectivamente. En base a los principios del Documento de guía N° 34 sobre validación y reconocimiento internacional de nuevos métodos para la identificación de peligros, se encuentran disponibles los estándares de desempeño para facilitar los procesos de validación de nuevos métodos basados en RhCE y RhE.

Por todo esto, uno de los objetivos de este trabajo ha sido el de incrementar la disponibilidad de modelos RhCE y RhE mediante el desarrollo y caracterización de nuevo modelos epiteliales con la ambición de ampliar el abanico de métodos alternativos disponibles. La evaluación de la idoneidad del modelo QobuR-RhCE para la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo en base a los estándares de desempeño. Los resultados obtenidos con el modelo QobuR-RhCE mostraron que es posible su utilización dentro de las especificaciones establecidas en la TG 492 de la OECD para la identificación de productos químicos que no requieren clasificación ni etiquetado, habiendo obtenido una sensibilidad del 93,3%, una especificidad del 60% y una precisión del 76,7%, con una reproducibilidad intra-laboratorio del 96,7%. Asimismo, se ha implementado la evaluación de la TEER como parámetro de control de calidad durante la producción de los modelos, así como parámetro de evaluación complementario al estudio de la viabilidad celular para la detección de las

afectaciones a nivel estructural que pueden ser de utilidad para correcta identificación de los potenciales daños oculares.

Además de la TEER, se ha evaluado de forma análoga las alteraciones en la capacitancia celular, habiéndose determinado que a través del estudio de la capacitancia es posible identificar la irritación ocular/daño ocular severo con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 66% y una precisión del 83%. Esto resulta de gran interés ya que representa una metodología no invasiva y no destructiva en los modelos RhCE, permitiendo por tanto complementar los estudios toxicológicos con cualquier otra técnica de interés, así como desarrollar nuevos protocolos que permitan la identificación de efectos reversibles sobre los modelos RhCE o incluso determinar pequeños daños celulares que puedan conducir a efectos adversos tras una aplicación sostenida en el tiempo.

Por su parte, el modelo QileX-RhE presenta una estructura morfológica que refleja la estructura normal de una epidermis humana, observándose un epitelio escamoso pluriestratificado queratinizado estructurado en estrato basal, espinoso, granuloso y córneo. Asimismo, el modelo QileX-RhE muestra un patrón de expresión de marcadores que confirman el alto grado de especialización y diferenciación celular, así como un contenido lipídico del estrato córneo similar al resto de modelos RhE. Además, al igual que en modelo QobuR-RhCE, se ha optado por la evaluación individualizada del efecto barrera epitelial mediante la evaluación de la TEER como criterio de control de calidad, habiendo obtenido valores similares a otros modelos RhE. Todo ello sugiere la idoneidad del modelo QileX-RhE como método para la identificación de productos causantes de procesos de irritación/corrosión cutánea.

Con el objetivo de evaluar si el modelo QileX-RhE cumple con los requisitos establecidos en la TG 439 de la OECD y es susceptible de ser utilizado como método estandarizado para la evaluación de la irritación cutánea, en este estudio se ha evaluado la fiabilidad y la capacidad de predicción utilizando los productos químicos de referencia descritos en los estándares de desempeño para la evaluación de la irritación cutánea en nuevos métodos basados en RhE. Los resultados obtenidos muestran que el método QileX-RhE se encuentra dentro de las especificaciones establecidas en la TG 439 para la identificación de compuestos

causantes de irritación cutánea, habiendo obtenido una sensibilidad del 90%, una especificidad del 70% y una precisión del 80%, con una reproducibilidad intra-laboratorio del 95%.

De igual forma que en el modelo QobuR-RhCE, se ha implementado la evaluación de la TEER durante los protocolos estandarizados de evaluación de la viabilidad celular, permitiendo obtener datos complementarios acerca de las disrupciones generadas en el efecto barrera epitelial y que pueden ser de utilidad en la detección de posibles efectos adversos.

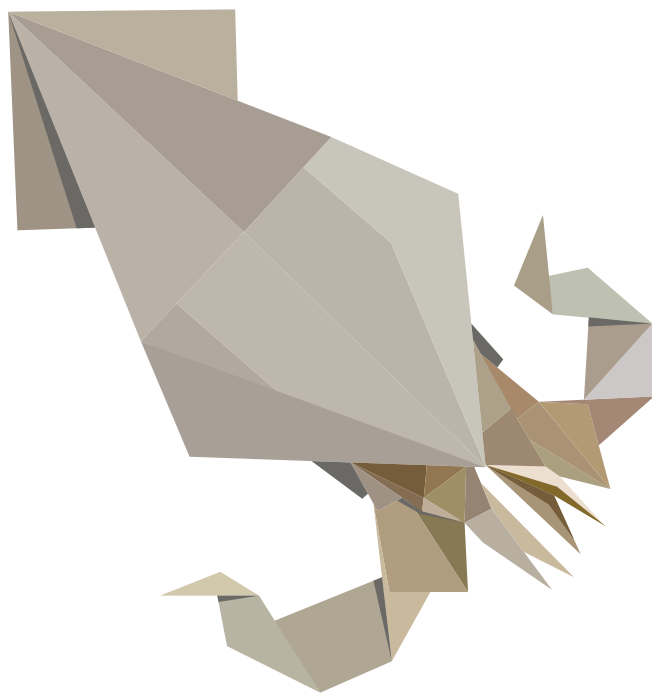
Al mismo tiempo, se ha evaluado la utilidad de la evaluación de la capacitancia como metodología alternativa al estudio de la viabilidad celular para la identificación de productos causantes de irritación cutánea. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que mediante el análisis de las variaciones en la capacitancia celular es posible desarrollar un método no invasivo y no destructivo con una sensibilidad, especificidad y precisión del 100%, mejorando de manera significativa la metodología estandarizada de evaluación de la viabilidad celular.

Con todo ello, este estudio abre las puertas a otras investigaciones futuras, donde una metodología basada en la evaluación de la capacitancia en modelos RhCE y RhE sea científicamente validada e internacionalmente reconocida como método alternativo para la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo y la evaluación de la irritación/corrosión cutánea. Asimismo, el modelo QileX-RhE ha aún de demostrar su utilidad como método predictivo de la corrosión cutánea en base a los requisitos establecidos en la TG 431 de la OECD. Por último, tanto el método QobuR-RhCE para la identificación de sustancias y mezclas que no requieren identificación ni etiquetado para la irritación ocular/daño ocular severo, como el método QileX-RhE para la identificación de sustancias y mezclas causantes de irritación cutánea han de ser sometidos a futuros estudios de validación con el objetivo de determinar la transferibilidad de los resultados ente diferentes laboratorios, también referido como reproducibilidad inter-laboratorio.

No obstante, en este estudio se describe además la aplicación práctica del modelo QobuR-RhCE fuera del ámbito de los ensayos regulados para la clasificación y etiquetado de productos químicos. De este modo, se ha podido demostrar la utilidad del modelo QobuR-RhCE en estudios de evaluación de la eficacia de nuevas formulaciones farmacéuticas de aplicación tópica para el tratamiento de la DED, adaptando la metodología experimental a los requisitos específicos de evaluación.

En general, los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis doctoral sugieren que los métodos QobuR-RhCE y QileX-RhE cumplen con los requisitos mínimos para ser utilizados en la evaluación de peligros para la salud humana. Asimismo, el estudio de la capacitancia celular permite obtener una predicción más precisa de dichos peligros y puede ser incluida dentro de los actuales protocolos estandarizados, lo cual es de gran interés ya que es una metodología rápida, no invasiva y no destructiva que permite la evaluación simultánea de cualquier otro criterio de interés.

Perspectivas de futuro



Loligo vulgaris

1.633 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

La controversia que rodea la utilización de animales con fines científicos es una cuestión creciente y en continuo debate. Desde los primeros argumentos antiviviseccionistas en la Inglaterra del siglo XIX, se ha recorrido un largo camino en relación a la protección y transparencia de los procedimientos realizados en animales.

A pesar de que la experimentación animal continúa jugando un papel vital en el progreso científico, la atención mediática apunta a la mejora continua del bienestar animal, con gran énfasis en el desarrollo de modelos alternativos a la experimentación animal. Hoy en día, el sello *cruelty-free* puede ser encontrado en numerosos envases de champú, pintalabios y otros productos cosméticos con el objetivo de indicar que dicho producto no ha sido evaluado en animales. Marcas como Pantene, Dove y muchas otras han eliminado la experimentación animal en sus procesos de producción, a pesar de que, a efectos prácticos, no supone una diferencia en cuanto al producto que se ofrece en tienda. El incremento en el rechazo de los consumidores a utilizar productos que han sido evaluados en animales está mandando un mensaje claro a las compañías para fomentar el desarrollo e implementación de metodologías alternativas.

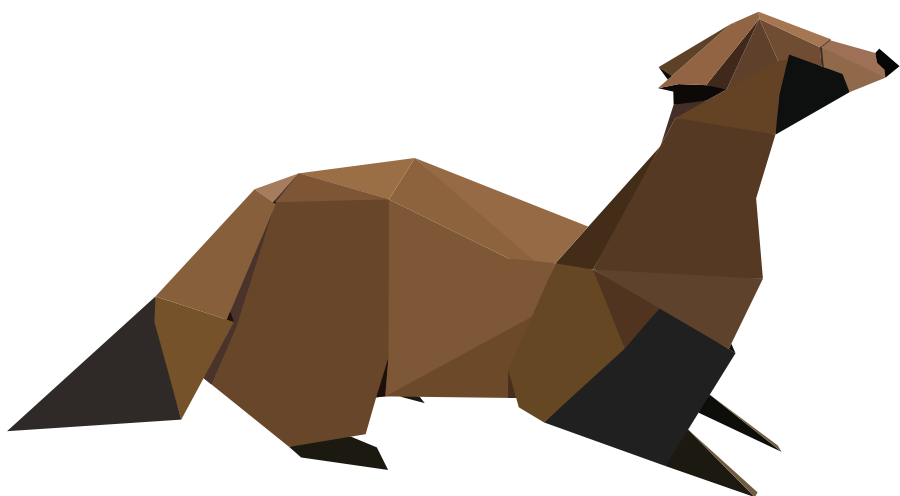
El cultivo *in vitro* de células humanas ha sido durante décadas una de las principales herramientas científicas para el avance en el conocimiento de la fisiología humana, para la comprensión de las interacciones célula-célula, para el estudio de enfermedades y para el descubrimiento de nuevos tratamientos. Sin embargo, los cultivos *in vitro* presentan a su vez sus propias limitaciones al ser incapaces de replicar por completo el escenario *in vivo*. En este sentido, existe la necesidad de incrementar el número de tejidos interconectados que permitan comprender la intrincada interconexión del cuerpo humano. Con este objetivo nace la tecnología *organ-on-a-chip*, una tecnología con el potencial de replicar e interconectar diferentes tejidos humanos de forma miniaturizada mediante la combinación de la ingeniería tisular y las técnicas de microfluídica. La tecnología *organ-on-a-chip* tiene el potencial de representar la mayor revolución en el campo de la medicina de precisión. A pesar de ello, la tecnología *organ-on-a-chip* tiene aún un largo camino por recorrer, dado que actualmente los modelos *organ-on-a-chip* representan un único tejido o la combinación de unos pocos. Debido a que cada

modelo *organ-on-a-chip* es una pequeña pieza dentro de un gran puzzle, la interconexión de todos los modelos dentro de un único sistema representando la mayor parte de los órganos y tejidos humanos es hoy en día un reto pendiente de alcanzar. Sin embargo, este reto presenta grandes desafíos técnicos pendientes de resolver. Por un lado, hay que tener en cuenta el escalado entre los diferentes órganos y tejidos, la utilización de un medio de cultivo común que permita el mantenimiento de cada órgano o tejido, así como el ajuste de la velocidad de flujo para cada uno de ellos. Todo ello, al mismo tiempo que se mantiene la funcionalidad interdependiente de cada uno de los distintos órganos o tejidos representados.

A pesar de que hoy en día existen números órganos y tejidos capaces de ser recreados en un ambiente *in vitro* mediante técnicas de ingeniería tisular y que pueden ser adaptados a las metodologías *organ-on-a-chip*, existen otros muchos cuya fabricación sigue suponiendo un gran desafío, como por ejemplo la retina, el tejido adiposo o la placenta por nombrar algunos. Al mismo tiempo, la interrelación entre el microbioma y el metabolismo activo de las células, tejidos y órganos ha evidenciado la existencia de mecanismos de intercomunicación altamente regulados, con grandes implicaciones en la maduración del sistema inmune o el control hormonal entre otros, haciendo que el estado de maduración de un tejido sea por tanto dependiente de la presencia de una microbiota específica.

Con todo ello, el desarrollo de un sistema *human-on-a-chip* se encuentra aún muy distante. Avanzar en este campo requerirá de una reducción en los costes de fabricación y de implementación experimental para su uso extensivo, reemplazando los componentes más caros por sistemas reutilizables. Al mismo tiempo, la obtención de los resultados en los sistemas *organ-on-a-chip* puede interferir con su propio funcionamiento, requiriendo, por tanto, nuevos sensores que permitan una monitorización no invasiva. Además, a medida que aumenta el número de tejidos y órganos interconectados, la funcionalidad se vuelve exponencialmente más compleja y los datos generados pueden arrastrar componentes artefactuales imposibles de solucionar con la tecnología actual.

Conclusiones



Mustela putorius
1.250 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

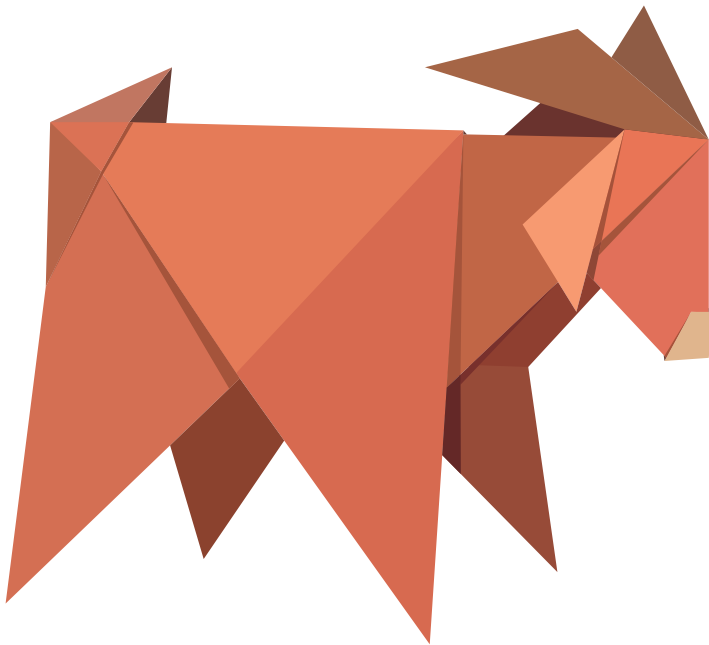
Conclusiones

1. Se ha desarrollado y caracterizado un nuevo modelo de epitelio corneal humano reconstruido y un nuevo modelo de epidermis reconstruida, los cuales presentan una morfología, unos marcadores celulares y un efecto barrera equiparables a un epitelio corneal humano y una epidermis humana normal.
2. El método desarrollado para la evaluación de la irritación ocular utilizando el modelo de epitelio corneal humano reconstruido ha demostrado ser una herramienta relevante para la identificación de productos que no requieren clasificación ni etiquetado, cumpliendo los requisitos mínimos exigidos para nuevas propuestas basadas en modelos de epitelio corneal humano reconstruido para la evaluación del daño ocular. Por otro lado, el método desarrollado para la evaluación de la irritación cutánea utilizando el modelo de epidermis humana reconstruido ha demostrado ser una herramienta relevante para la identificación de productos causantes de irritación cutánea, cumpliendo los requisitos mínimos exigidos para nuevas propuestas basadas en modelos de epidermis reconstruida para la evaluación de la irritación cutánea.
3. La evaluación de las variaciones en la capacitancia en los modelos de epitelio corneal y epidermis reconstruida ha demostrado ser una metodología acorde a los estándares de desempeño para la evaluación de la irritación ocular/daño ocular severo y la irritación cutánea respectivamente, mostrando en todos los casos una mayor capacidad predictiva que los ensayos basados en el estudio de la viabilidad celular.
4. El modelo de epitelio corneal humano reconstruido ha demostrado ser una herramienta de utilidad para la evaluación del efecto protector de nuevos fármacos diseñados para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

Conclusiones

1. A new human reconstructed human corneal epithelial model and a new reconstructed epidermis model have been developed and characterized, exhibiting a comparable morphology, cellular markers and barrier function to that of normal human corneal epithelium and epidermis.
2. The method developed for evaluating ocular irritation using the reconstructed human corneal epithelial model has demonstrated to be a relevant tool for identifying products that do not require classification or labelling, meeting the minimum requirements for new proposals based on reconstructed human corneal epithelial models for evaluating ocular damage. Similarly, the method developed for evaluating skin irritation using the reconstructed human epidermis model has proven to be a relevant tool for identifying products that cause skin irritation, meeting the minimum requirements for new proposals based on reconstructed human epidermis models for evaluating skin irritation.
3. The evaluation of capacitance variations in reconstructed human corneal and epidermal models has demonstrated to be a methodology in accordance with performance standards for evaluating ocular irritation/severe eye damage and skin irritation respectively; showing in all cases a higher predictive capacity than assays based on cellular viability studies.
4. The reconstructed human corneal epithelial model has proven to be a useful tool for evaluating the protective effect of new ophthalmic drugs designed for the treatment of dry eye disease.

Bibliografía



Capra aegagrus
998 utilizadas con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Bibliografia

- [1] N. Unidas, Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) - 9ª Edición, 2021.
- [2] The United Nations Conference on Environment and Development, The Rio Declaration on Environment and Development, 1992.
- [3] Comisión Europea (CE), Reglamento (CE) No 1272/2008 del Parlamento Europeo Y del Consejo de la Unión Europea, 2008.
- [4] Comisión Europea (CE), Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, 2006.
- [5] Comisión Europea (CE), Reglamento (CE) No 440/2008 de la Comisión, 2008.
- [6] OECD, Test Guideline No. 405: In Vivo Eye Irritation/Serious Eye Damage, 2021. doi:10.1787/9789264185333-en.
- [7] OECD, Test Guideline 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion, 2015. doi:10.1787/9789264242678-en.
- [8] OECD, Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation, 2017. doi:10.1787/9789264274693-en.
- [9] OECD, Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation, 2019.
- [10] Comisión Europea (CE), Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, 2009.
- [11] European Union, Directiva 93/35/CEE del Consejo de 14 de julio de 1993 por la que se modifica por sexta vez la Directiva 76/768/CEE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos, 1993.
- [12] Commission of the European Communities, Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC), 2004.
- [13] L. Meigs, L. Smirnova, C. Rovida, M. Leist, T. Hartung, Animal testing and its alternatives - the most important omics is economics, ALTEX. 35 (2018)

- 275–305. doi:10.14573/altex.1807041.
- [14] European Union, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes., 2010. doi:32010L0063.
- [15] M.H. Halder, European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM): its role and contribution, in: Conf. Proc. Proc. Int. Symp., EDQM, Council of Europe, Strasbourg, 2008: pp. 23–32. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC44990> (accessed May 31, 2022).
- [16] EURL ECVAM, Non-animal methods in science and regulation - EURL ECVAM status report 2021, 2021. doi:10.2760/93290.
- [17] OECD, Draft OECD Guideline on Defined Approaches for Serious Eye Damage / Eye Irritation, 2021.
- [18] N. Alépée, M.H. Grandidier, S. Teluob, F. Amaral, E. Caviola, B. De Servi, S. Martin, M. Meloni, L. Nardelli, C. Padelou, V. Tagliati, A. Viricel, E. Adriaens, V. Michaut, Validation of the SkinEthic HCE Time-to-Toxicity test method for eye hazard classification of chemicals according to UN GHS, *Toxicol. Vitro.* 80 (2022). doi:10.1016/J.TIV.2022.105319.
- [19] OECD, Draft Test Guideline 492B: Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RHCE) Test Method For Eye Hazard Identification, 2021.
- [20] F. Cottrez, V. Leblanc, E. Boitel, H. Groux, N. Alépée, The EyeIRR-IS assay: Development and evaluation of an in vitro assay to measure the eye irritation sub-categorization of liquid chemicals, *Toxicol. Vitro.* 71 (2021) 105072. doi:10.1016/j.tiv.2020.105072.
- [21] OECD, Test Guideline No. 494 Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals not requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, 2019.
- [22] OECD, Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, *Guidel. Test. Chem.* (2019) 1–27. <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-492-reconstructed-human-cornea-like-epithelium-rhce-test-method-for->

- identifying-chemicals-not-requiring-classification-and-labelling-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264242548-en.
- [23] EURL ECVAM Science Advisory Committee, ESAC opinion on the EURL ECVAM eye irritation validation study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE, 2014. doi:10.2787/043697.
- [24] EURL ECVAM Scientific Advisory Committee, ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT), 2016. doi:10.2787/390390.
- [25] OECD, PEER REVIEW REPORT OF THE VALIDATION OF THE LABCYTE CORNEA-MODEL₂₄ EYE IRRITATION TEST FOR INCLUSION IN TEST GUIDELINE 492, 39 (2018) 1–106.
- [26] OECD, REPORT OF THE VALIDATION STUDY OF THE MCTT HUMAN CORNEAL- LIKE EPITHELIUM EYE IRRITATION TEST MODEL AND REPORT OF THE VALIDATION PEER-REVIEW, (2019).
- [27] OECD, Revised performance standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro reconstructed human cornea-like epithelium (RhCE) test methods for eye hazard, 2017. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2015\)23&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2015)23&doclanguage=en).
- [28] OECD, Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Ser. Test. Assess. Number 34 (2005). [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2005\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2005)14&doclanguage=en).
- [29] OECD, Test No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidel. Test. Chem. Section 4 (2021) 1–25. <http://www.oecd.org/termsandconditions/>. (accessed February 25, 2022).
- [30] OECD, Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified in vitro Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation Testing as Described in TG 439, 2015.
- [31] OECD, Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guidel. Test. Chem. (2019).

- doi:10.1787/9789264242753-en.
- [32] N.O. Eddy, H. Momoh-Yahaya, E.E. Oguzie, Theoretical and experimental studies on the corrosion inhibition potentials of some purines for aluminum in 0.1 M HCl, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 203–217. doi:10.1016/J.JARE.2014.01.004.
- [33] M. Tounsi, M. Ben Braiek, H. Barhoumi, A. Baraket, M. Lee, N. Zine, A. Maaref, A. Errachid, A novel EIS field effect structures coated with TESUD-PPy-PVC-dibromoaza[7]helicene matrix for potassium ions detection, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 61 (2016) 608–615. doi:10.1016/J.MSEC.2015.12.069.
- [34] S. Jo, N. Jayababu, D. Kim, Facile Fabrication of Double-Layered Electrodes for a Self-Powered Energy Conversion and Storage System, *Nanomater.* (Basel, Switzerland). 10 (2020) 1–12. doi:10.3390/NANO10122380.
- [35] Y. Zhang, K. Murakami, V.J. Borra, M.O. Ozen, U. Demirci, T. Nakamura, L. Esfandiari, A Label-Free Electrical Impedance Spectroscopy for Detection of Clusters of Extracellular Vesicles Based on Their Unique Dielectric Properties, *Biosensors.* 12 (2022). doi:10.3390/BIOS12020104.
- [36] H. Park, K. Jung, M. Nezafati, C.S. Kim, B. Kang, Sodium Ion Diffusion in Nasicon (Na₃Zr₂Si₂PO₁₂) Solid Electrolytes: Effects of Excess Sodium, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 27814–27824. doi:10.1021/ACSAMI.6B09992.
- [37] J.A. Isaac, L.R. Mangani, D. Devaux, R. Bouchet, Electrochemical Impedance Spectroscopy of PEO-LATP Model Multilayers: Ionic Charge Transport and Transfer, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 14 (2022) 13158–13168. doi:10.1021/ACSAMI.1C19235.
- [38] V.F. Lvovich, *Impedance Spectroscopy - Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*, 1967.
- [39] B. Srinivasan, A. Reddy Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems, *J Lab Autom.* 20 (2015) 107–126. doi:10.1177/2211068214561025.
- [40] G. Linz, S. Djeljadini, L. Steinbeck, G. Köse, F. Kiessling, M. Wessling, *Cell*

- barrier characterization in transwell inserts by electrical impedance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.* 165 (2020) 112345. doi:10.1016/j.bios.2020.112345.
- [41] A. Astashkina, B. Mann, D.W. Grainger, A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity, *Pharmacol. Ther.* 134 (2012) 82–106. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.01.001.
- [42] C.- Carvajal CE, L. Q, G. A, Three-Dimensional Cell Culture Models for Biomarker Discoveries and Cancer Research, *Transl. Med.* 01 (2012). doi:10.4172/2161-1025.s1-005.
- [43] U. Marx, T.B. Andersson, A. Bahinski, M. Beilmann, S. Beken, F.R. Cassee, M. Cirit, M. Daneshian, S. Fitzpatrick, O. Frey, C. Gaertner, C. Giese, L. Griffith, T. Hartung, M.B. Heringa, J. Hoeng, W.H. De Jong, H. Kojima, J. Kuehnl, M. Leist, A. Luch, I. Maschmeyer, D. Sakharov, A.J.A.M. Sips, T. Steger-Hartmann, D.A. Tagle, A. Tonevitsky, T. Tralau, S. Tsyb, A. Van De Stolpe, R. Vandebriel, P. Vulto, J. Wang, J. Wiest, M. Rodenburg, A. Roth, Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing, *ALTEX.* 33 (2016) 272–321. doi:10.14573/altex.1603161.
- [44] E.M. Dehne, T. Hasenberg, U. Marx, The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma, *Futur. Sci. OA.* 3 (2017). doi:10.4155/FSOA-2017-0002/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE3.JPEG.
- [45] I. Maschmeyer, A. Lorenz, S. Bauer, A. Ramme, T. Rings, J. Kuehnl, U. Marx, State-of-the-art of the assessment of ADME using multiple organs on a chip, *Toxicol. Lett.* 280 (2017) S34. doi:10.1016/J.TOXLET.2017.07.084.
- [46] H. Spielmann, U. Marx, Human multi-organ-chips (MOCs) from vision to acceptance by industry and regulators, *Toxicol. Lett.* 280 (2017) S30. doi:10.1016/J.TOXLET.2017.07.073.
- [47] S.K. Doke, S.C. Dhawale, Alternatives to animal testing: A review, *Saudi Pharm. J.* 23 (2015) 223–229. doi:10.1016/J.JSPS.2013.11.002.
- [48] T. Gerasimenko, S. Nikulin, G. Zakharova, A. Poloznikov, V. Petrov, A. Baranova, A. Tonevitsky, Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues, *Front. Bioeng.*

- Biotechnol. 7 (2020) 474. doi:10.3389/fbioe.2019.00474.
- [49] D. Günzel, S.S. Zakrzewski, T. Schmid, M. Pangalos, J. Wiedenhoef, C. Blasse, C. Ozboda, S.M. Krug, From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedance spectroscopy, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257 (2012) 142–151. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06540.x.
- [50] C. Canali, A. Heiskanen, H.B. Muhammad, P. Høyum, F.J. Pettersen, M. Hemmingsen, A. Wolff, M. Dufva, O.G. Martinsen, J. Emnéus, Bioimpedance monitoring of 3D cell culturing—Complementary electrode configurations for enhanced spatial sensitivity, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 72–79. doi:10.1016/J.BIOS.2014.07.020.
- [51] M.W. van der Helm, M. Odijk, J.P. Frimat, A.D. van der Meer, J.C.T. Eijkel, A. van den Berg, L.I. Segerink, Direct quantification of transendothelial electrical resistance in organs-on-chips, *Biosens. Bioelectron.* 85 (2016) 924–929. doi:10.1016/J.BIOS.2016.06.014.
- [52] H.P. Schwan, Alternating current electrode polarization, *Biophysik.* 3 (1966) 181–201. doi:10.1007/BF01191612.
- [53] M. Waleed Shinwari, D. Zhitomirsky, I.A. Deen, P.R. Selvaganapathy, M. Jamal Deen, D. Landheer, Microfabricated Reference Electrodes and their Biosensing Applications, *Sensors* 2010, Vol. 10, Pages 1679-1715. 10 (2010) 1679–1715. doi:10.3390/S100301679.
- [54] B. Raut, L.J. Chen, T. Hori, H. Kaji, An Open-Source Add-On EVOM® Device for Real-Time Transepithelial/Endothelial Electrical Resistance Measurements in Multiple Transwell Samples, *Micromachines.* 12 (2021) 1–13. doi:10.3390/MI12030282.
- [55] T. Duff, S. Carter, G. Feldman, G. McEwan, W. Pfaller, P. Rhodes, M. Ryan, G. Hawksworth, Transepithelial resistance and inulin permeability as endpoints in in vitro nephrotoxicity testing, *Altern. Lab. Anim.* 30 Suppl 2 (2002) 53–59. doi:10.1177/026119290203002S08.
- [56] S. Ferruzza, C. Rossi, Y. Sambuy, M.L. Scarino, Serum-reduced and serum-free media for differentiation of Caco-2 cells, *ALTEX - Altern. to Anim. Exp.* 30 (2013) 159–168. doi:10.14573/ALTEX.2013.2.159.
- [57] M. Chacón, N. Vázquez, S. Berisa, M. Persinal, M. Sánchez, B. Baamonde,

- J.F. Alfonso, L.F. Cueto, J. Merayo-Llves, Á. Meana, QobuR – A new in vitro human corneal epithelial model for preclinical drug screening, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 136 (2019) 164–173. doi:10.1016/j.ejpb.2019.01.023.
- [58] J.H. Draize, G. Woodard, H.O. Calvery, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82 (1944) 377–390.
- [59] S. Rönkkö, K.-S. Vellonen, K. Järvinen, E. Toropainen, A. Urtti, Human corneal cell culture models for drug toxicity studies, *Drug Deliv. Transl. Res.* 6 (2016) 660–675. doi:10.1007/s13346-016-0330-y.
- [60] N.J.D. Gower, R.J. Barry, M.R. Edmunds, L.C. Titcomb, A.K. Denniston, Drug discovery in ophthalmology: past success, present challenges, and future opportunities., *BMC Ophthalmol.* 16 (2016) 11. doi:10.1186/s12886-016-0188-2.
- [61] K.-M. Jung, S.-H. Lee, Y.-H. Ryu, W.-H. Jang, H.-S. Jung, J.-H. Han, S.-H. Seok, J.-H. Park, Y. Son, Y.-H. Park, K.-M. Lim, A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test., *Toxicol. In Vitro.* 25 (2011) 403–10. doi:10.1016/j.tiv.2010.10.019.
- [62] L. Li, R. Hartley, B. Reiss, Y. Sun, J. Pu, D. Wu, F. Lin, T. Hoang, S. Yamada, J. Jiang, M. Zhao, E-cadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets., *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 2779–89. doi:10.1007/s00018-012-0951-3.
- [63] J.M. Wolosin, M. Schütte, J.D. Zieske, M.T. Budak, Changes in connexin43 in early ocular surface development., *Curr. Eye Res.* 24 (2002) 430–438. doi:10.1076/ceyr.24.6.430.8599.
- [64] R. Abdayem, S. Callejon, P. Portes, P. Kirilov, F. Ed Eric Demarne, F. Pirot, V. Jannin, M. Haftek, Modulation of transepithelial electric resistance (TEER) in reconstructed human epidermis by excipients known to permeate intestinal tight junctions, (n.d.). doi:10.1111/exd.12750.
- [65] K. Cholkar, S.R. Dasari, D. Pal, A.K. Mitra, Eye: Anatomy, physiology and barriers to drug delivery, in: *Ocul. Transp. Recept. Their Role Drug Deliv.*, Woodhead Publishing, 2013: pp. 1–36. doi:10.1533/9781908818317.1.

- [66] E. Toropainen, V. Ranta, A. Talvitie, P. Suhonen, A. Urtti, Culture Model of Human Corneal Epithelium for Prediction of Ocular Drug Absorption AND, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001) 2942–2948.
- [67] T. Takezawa, K. Nishikawa, P.C. Wang, Development of a human corneal epithelium model utilizing a collagen vitrigel membrane and the changes of its barrier function induced by exposing eye irritant chemicals, *Toxicol. Vitro.* 25 (2011) 1237–1241. doi:10.1016/j.tiv.2011.05.021.
- [68] G.A.G. Castro, Human Hemicornea Model for Drug Transport Testing and Screening of Excipients, (2017).
- [69] M. Sosnová-Netuková, P. Kuchynka, J. V Forrester, The suprabasal layer of corneal epithelial cells represents the major barrier site to the passive movement of small molecules and trafficking leukocytes., *Br. J. Ophthalmol.* 91 (2007) 372–8. doi:10.1136/bjo.2006.097188.
- [70] S. Reichl, Cell culture models of the human cornea - a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro, *J. Pharm. Pharmacol.* 60 (2008) 299–307. doi:10.1211/jpp.60.3.0004.
- [71] S. Reichl, U. Becker, Cell culture models of the corneal epithelium and reconstructed cornea equivalents for in vitro drug absorption studies, *Drug Absorpt. Stud.* (2008). http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-74901-3_12.
- [72] M. Hahne, M. Zorn-Kruppa, G. Guzman, J.M. Brandner, E. Haltner-Ukomado, H. Wätzig, S. Reichl, Prevalidation of a Human Cornea Construct as an Alternative to Animal Corneas for In Vitro Drug Absorption Studies, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2976–2988. doi:10.1002/jps.23190.
- [73] K. Kawazu, H. Shiono, H. Tanioka, A. Ota, T. Ikuse, H. Takashina, Y. Kawashima, Beta adrenergic antagonist permeation across cultured rabbit corneal epithelial cells grown on permeable supports., *Curr. Eye Res.* 17 (1998) 125–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523089>.
- [74] K. Kawazu, K. Yamada, M. Nakamura, A. Ota, Characterization of cyclosporin A transport in cultured rabbit corneal epithelial cells: P-glycoprotein transport activity and binding to cyclophilin, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40 (1999) 1738–1744.

<http://www.biomednet.com/db/medline/99320214>.

- [75] V.R. Goskonda, R.A. Hill, M.A. Khan, I.K. Reddy, Permeability of chemical delivery systems across rabbit corneal (SIRC) cell line and isolated corneas: A comparative study, *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000) 409–416. doi:10.1081/PDT-100100557.
- [76] V.R. Goskonda, M.A. KHan, C.M. Hutak, I. Reddy, Permeability Characteristics of Novel Mydriatic Agents Using an in Vitro Cell Culture Model That Utilizes Sirc Rabbit Corneal Cells, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 180–184.
- [77] M. Stern, M. Klausner, R. Alvarado, K. Renskers, M. Dickens, Evaluation of the EpiOcular(TM) tissue model as an alternative to the draize eye irritation test, *Toxicol. Vitro.* 12 (1998) 455–461. doi:10.1016/S0887-2333(98)00017-4.
- [78] U. Becker, C. Ehrhardt, M. Schneider, L. Muys, D. Gross, K. Eschmann, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, A comparative evaluation of corneal epithelial cell cultures for assessing ocular permeability, *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 36 (2008) 33–44.
- [79] M. Juretić, B.J. Dukovski, I. Krtalić, S. Reichl, B. Cetina-Čižmek, J. Filipović-Grčić, J. Lovrić, I. Pepić, HCE-T cell-based permeability model: A well-maintained or a highly variable barrier phenotype?, *Eur. J. Pharm. Sci.* 104 (2017) 23–30. doi:10.1016/j.ejps.2017.03.018.
- [80] M. Hahne, S. Reichl, Development of a serum-free human cornea construct for in vitro drug absorption studies: The influence of varying cultivation parameters on barrier characteristics, *Int. J. Pharm.* 416 (2011) 268–279.
- [81] M. Griffith, R. Osborne, R. Munger, Functional Human Corneal Equivalents Constructed from Cell lines, *Science* (80-.). 286 (1999) 2169–72.
- [82] K. Araki-sasaki, Y. Ohashi, T. Sasabe, K. Hayashi, An SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36 (1995) 614–621.
- [83] K. Yamasaki, S. Kawasaki, R.D. Young, H. Fukuoka, H. Tanioka, M. Nakatsukasa, A.J. Quantock, S. Kinoshita, Genomic aberrations and

- cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 604–613. doi:10.1167/iovs.08-2239.
- [84] U. Becker, C. Ehrhardt, N. Daum, C. Baldes, U.F. Schaefer, K.W. Ruprecht, K.-J. Kim, C.-M. Lehr, Expression of ABC-Transporters in Human Corneal Tissue and the Transformed Cell Line, HCE-T, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 23 (2007) 172–181. doi:10.1089/jop.2006.0095.
- [85] H. Yamaguchi, T. Takezawa, Fabrication of a corneal model composed of corneal epithelial and endothelial cells via a collagen vitrigel membrane functioned as an acellular stroma and its application to the corneal permeability test of chemicals, *Drug Metab. Dispos.* (2018) dmd.118.080820. doi:10.1124/dmd.118.080820.
- [86] M. Hornof, E. Toropainen, A. Urtili, Cell culture models of the ocular barriers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 207–225. doi:10.1016/j.ejpb.2005.01.009.
- [87] The European Parliament and the Council of the European Union, Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament of the council, 2009. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>.
- [88] A.R. Wheeler, Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing, 2019. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-09/documents/image2019-09-09-231249.pdf>.
- [89] N. Alépée, M.H. Grandidier, J. Cotovio, Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431, *Toxicol. Vitro.* 28 (2014) 131–145. doi:10.1016/j.tiv.2013.10.016.
- [90] P. Portes, M.H. Grandidier, C. Cohen, R. Roguet, Refinement of the EpiSkin® protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. Vitro.* 16 (2002) 765–770. doi:10.1016/S0887-2333(02)00090-5.
- [91] J. Cotovio, M.H. Grandidier, P. Portes, R. Roguet, G. Rubinstenn, The in vitro acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 33 (2005) 329–349.

- doi:10.1177/026119290503300403.
- [92] J.H. Fentem, Validation of in vitro Tests for Skin Corrosivity., ALTEX. 16 (1999) 150–153. http://www.altex.ch/resources/altex_1999_3_150_153_Fentem.pdf.
- [93] J.H. Fentem, D. Briggs, C. Chesné, G.R. Elliott, J.W. Harbell, J.R. Heylings, P. Portes, R. Roguet, J.J.M. Van De Sandt, P.A. Botham, A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team, Toxicol. Vitro. 15 (2001) 57–93. doi:10.1016/S0887-2333(01)00002-9.
- [94] H. Kandárová, M. Liebsch, I. Gerner, E. Schmidt, E. Genschern, D. Traue, H. Spielmann, The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests - An assessment of the performance of the optimised test, ATLA Altern. to Lab. Anim. 33 (2005) 351–367. doi:10.1177/026119290503300408.
- [95] N. Alépée, C. Robert, C. Tornier, J. Cotovio, The usefulness of the validated SkinEthic™ RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories, Toxicol. Vitro. 28 (2014) 616–625. doi:10.1016/j.tiv.2013.12.013.
- [96] J. Hoffmann, E. Heisler, S. Karpinski, J. Losse, D. Thomas, W. Siefken, H.-J. Ahr, H.-W. Vohr, H.W. Fuchs, Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000)—A new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing, Toxicol. Vitro. 19 (2005) 925–929. doi:10.1016/J.TIV.2005.06.010.
- [97] H. Kandárová, M. Liebsch, H. Spielmann, E. Genschow, E. Schmidt, D. Traue, R. Guest, A. Whittingham, N. Warren, A.O. Gamer, M. Remmele, T. Kaufmann, E. Wittmer, B. De Wever, M. Rosdy, Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, Toxicol. Vitro. 20 (2006) 547–559. doi:10.1016/J.TIV.2005.11.008.
- [98] LabCyte Validation Management Team, ME-TOO VALIDATION REPORT - Validation Study for in vitro skin corrosion test method using reconstructed human epidermal tissue LabCyte EPI-MODEL24, 2018. [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/EPI-MODEL24 SCT Validation Report ver 2.1_13Aug2018_AWA revised \(1\).pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/EPI-MODEL24_SCT_Validation_Report_ver_2.1_13Aug2018_AWA_revised(1).pdf).

- [99] M. Katoh, F. Hamajima, T. Ogasawara, K.I. Hata, Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol, *J. Toxicol. Sci.* 34 (2009) 327–334. doi:10.2131/JTS.34.327.
- [100] M. Katoh, K. Hata, Refinement of LabCyte EPI-MODEL₂₄ Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *Altern. to Anim. Test. Exp.* 16 (2011) 111–122. doi:10.11232/AATEX.16.111.
- [101] LabCyte Validation Management Team, Validation study of in vitro skin irritation test using LabCyte EPI-MODEL₂₄ (Final report), 2009.
- [102] OECD Environment Directorate, H. and S.D. Environment, Reports of the peer reviews of the epiCS and SKIN+ test methods in view of their inclusion in Test Guideline 439 on in vitro skin irritation, 2019.
- [103] M. Woelfle, P. Olliaro, M.H. Todd, Open science is a research accelerator, *Nat. Chem.* 3 (2011) 745–748. doi:10.1038/nchem.1149.
- [104] EC - European Commission, N. Kroes, Recommendation on access to and preservation of scientific information in Europa, *Off. J. Eur. Union.* (2012) 1–125. doi:10.4403/jlis.it-8649.
- [105] F. Groeber, L. Schober, F.F. Schmid, A. Traube, S. Kolbus-Hernandez, K. Daton, S. Hoffmann, D. Petersohn, M. Schäfer-Korting, H. Walles, K.R. Mewes, Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II), *Toxicol. Vit.* 36 (2016) 254–261. doi:10.1016/j.tiv.2016.07.008.
- [106] K.R. Mewes, A. Fischer, N.N. Zöller, V. Laubach, A. Bernd, A. Jacobs, A. van Rompay, M. Liebsch, R. Pirow, D. Petersohn, Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I), *Toxicol. Vit.* 36 (2016) 238–253. doi:10.1016/j.tiv.2016.07.007.
- [107] M. Ponc, E. Boelsma, S. Gibbs, M. Mommaas, Characterization of reconstructed skin models, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15 (2002) 4–17. doi:10.1159/000066682.

- [108] European Commission, EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches, 2018. doi:10.2760/818599.
- [109] EURL-ECVAM, DB-ALM Protocol n ° 117 : SKIN 2 TM ZK 1350 Corrosivity Test, 1997. http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/VER2-o/online/DBALM_docs/117_P_SKIN2_TM_ZK_1350_Corrosivity_Test.pdf.
- [110] J.G. Rheinwald, H. Green, Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells., *Cell*. 6 (1975) 331–43. doi:10.1016/S0092-8674(75)80001-8.
- [111] S.G. Llamas, M. Del Rio, F. Larcher, E. García, M. García, M.J. Escamez, J.L. Jorcano, P. Holguín, Á. Meana, Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin, *Transplantation*. 77 (2004) 350–355. doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.47.001.
- [112] H. Alam, L. Sehgal, S.T. Kundu, S.N. Dalal, M.M. Vaidya, Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells., *Mol. Biol. Cell*. 22 (2011) 4068–78. doi:10.1091/mbc.E10-08-0703.
- [113] R. Moll, W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, R. Krepler, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells., *Cell*. 31 (1982) 11–24. doi:10.1016/0092-8674(82)90400-7.
- [114] G. Pellegrini, E. Dellambra, O. Golisano, E. Martinelli, I. Fantozzi, S. Bondanza, D. Ponzin, F. McKeon, M. De Luca, p63 identifies keratinocyte stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 3156–3161. doi:10.1073/pnas.061032098.
- [115] J.S. Reis-Filho, B. Torio, A. Albergaria, F.C. Schmitt, p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas, *J. Cutan. Pathol.* 29 (2002) 517–523. doi:10.1007/s00428-002-0710-1.
- [116] A.E. Kalinin, A. V. Kajava, P.M. Steinert, Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope, *BioEssays*. 24 (2002) 789–800. doi:10.1002/bies.10144.

Bibliografía

- [117] S. Nithya, T. Radhika, N. Jeddy, Loricrin - an overview., *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 19 (2015) 64–8. doi:10.4103/0973-029X.157204.
- [118] J. Molinari, C. Eskes, E. Andres, N. Remoué, V.M. Sá-Rocha, S.P. Hurtado, C. Barrichello, Improved procedures for in vitro skin irritation testing of natural botanicals, *Toxicol. Lett.* 211 (2012) S113. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.418.
- [119] N.Y. Schurer, P.M. Elias, The Biochemistry and Function of Stratum Corneum Lipids, *Adv. Lipid Res.* 24 (1991) 27–56. doi:10.1016/B978-0-12-024924-4.50006-7.
- [120] S. Knox, N.M. O'Boyle, Skin lipids in health and disease: A review, *Chem. Phys. Lipids.* 236 (2021). doi:10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2021.105055.
- [121] P. Sjövall, L. Skedung, S. Gregoire, O. Biganska, F. Clément, G.S. Luengo, Imaging the distribution of skin lipids and topically applied compounds in human skin using mass spectrometry, *Sci. Reports* 2018 81. 8 (2018) 1–14. doi:10.1038/s41598-018-34286-x.
- [122] M.A. Lampe, A.L. Burlingame, J.A. Whitney, M.L. Williams, B.E. Brown, E. Roitman, P.M. Elias, Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations, *J. Lipid Res.* 24 (1983) 120–130. doi:10.1016/S0022-2275(20)38005-6.
- [123] L. Coderch, O. López, A. De La Maza, J.L. Parra, Ceramides and skin function, *Am. J. Clin. Dermatol.* 4 (2003) 107–129. doi:10.2165/00128071-200304020-00004.
- [124] O. Kose, P. Erkekoglu, S. Sabuncuoglu, B. Kocer-Gumusel, Evaluation of skin irritation potentials of different cosmetic products in Turkish market by reconstructed human epidermis model, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 98 (2018) 268–273. doi:10.1016/j.yrtph.2018.08.010.
- [125] P. Portes, M.-H. Grandidier, C. Cohen, R. Roguet, Refinement of the Episkin® protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. Vitro.* 16 (2002) 765–770. doi:10.1016/S0887-2333(02)00090-5.
- [126] H. Kandárová, Evaluation and Validation of Reconstructed Human Skin Models as Alternatives to Animal Tests in Regulatory Toxicology, *Freie*

- Universität Berlin, 2006. http://edocs.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_00000002248.
- [127] K.M. Jung, S.H. Lee, W.H. Jang, H.S. Jung, Y. Heo, Y.H. Park, S.J. Bae, K.M. Lim, S.H. Seok, KeraSkinTM-VM: A novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests, *Toxicol. Vitro*. 28 (2014) 742–750. doi:10.1016/j.tiv.2014.02.014.
- [128] T. Akagi, M. Nagura, A. Hiura, H. Kojima, M. Akashi, Construction of Three-Dimensional Dermo–Epidermal Skin Equivalents Using Cell Coating Technology and Their Utilization as Alternative Skin for Permeation Studies and Skin Irritation Tests, *Tissue Eng. Part A*. 23 (2017) 481–490. doi:10.1089/ten.tea.2016.0529.
- [129] OECD, OBSOLETO - Test Guideline No. 405 Acute Eye Irritation/Corrosion, OECD Guidel. Test. Chem. (2020) 1–14.
- [130] United-Nations, Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Seventh re, New York and Geneva, 2017.
- [131] OECD, Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, 2020.
- [132] OECD, Test No. 438: Isolated chicken eye test method for identifying I) chemicals inducing serious eye damage and II) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage, 2018. <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.
- [133] OECD, Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, 2017.
- [134] OECD, Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, 2020. <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.
- [135] Y. Kaluzhny, H. Kandárová, P. Hayden, J. Kubilus, L. D'Argembeau-Thornton, M. Klausner, Development of the epiocularTM eye irritation test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in

- response to the requirements of the EU cosmetics directive and REACH legislation, *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 39 (2011) 339–364. doi:10.1177/026119291103900409.
- [136] N. Alépée, V. Leblanc, E. Adriaens, M.H. Grandidier, D. Lelièvre, M. Meloni, L. Nardelli, C.S. Roper, E. Santirocco, F. Toner, A. Van Rompay, J. Vinall, J. Cotovio, Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals, *Toxicol. Vitro.* 31 (2016) 43–53. doi:10.1016/j.tiv.2015.11.012.
- [137] S. Lim, S. Jin, W. Jang, K. Jung, M. Jung, K. Yeo, J. Kim, T. Jeong, M. Kang, S. Lee, K. Ko, T. Kim, K. Park, S. Bae, K. Lim, Me-too validation study for in vitro eye irritation test with 3D-reconstructed human cornea epithelium , MCTT HCE TM, *Toxicol. Vitro.* 55 (2019) 173–184. doi:10.1016/j.tiv.2018.12.003.
- [138] M. Katoh, F. Hamajima, T. Ogasawara, K.-I. ichiro Hata, Establishment of a new in vitro test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL, *Toxicol. Vitro.* 27 (2013) 2184–2192. doi:10.1016/j.tiv.2013.08.008.
- [139] LabCyte Validation Management Team, Me-too validation report: validation study for LabCyte Cornea-Model24 eye irritation test, 2017.
- [140] Scientific Committee on Consumer Products, Opinion on Disperse Red 17, 2006. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm.
- [141] M. Chacón, N. Vázquez, M. Persinal-Medina, S. Alonso-Alonso, M. Pevida, S. Llamas, B. Baamonde, L. Quiros, J. Merayo-Lloves, Á. Meana, Development of an in-house reconstructed human epidermis model as an alternative method in skin corrosion assessment, *Toxicol. Vitro.* 65 (2020) 104779. doi:10.1016/j.tiv.2020.104779.
- [142] C.C. Liao, C.Y. Wu, M.H. Lin, F.K. Hsieh, L.T. Hsu, S.Y. Chang, K.J. Chen, H.T. Huang, H.C. Hsu, C.H. Lin, P.J. Lin, H.M. Lai, H. Kojima, H. Todo, S.J. Lin, J.H. Li, W. Chen, Validation study of a new reconstructed human epidermis model EPiTRI for in vitro skin irritation test according to OECD guidelines, *Toxicol. Vitro.* 75 (2021) 105197. doi:10.1016/J.TIV.2021.105197.
- [143] T. do N. Pedrosa, C.M. Catarino, P.C. Pennacchi, S.R. de Assis, F.

- Gimenes, M.E.L. Consolaro, S.B. de M. Barros, S.S. Maria-Engler, T. Do, N. Pedrosa, C.M. Catarino, P.C. Pennacchi, S. Romano De Assis, F. Gimenes, M. Edilaine, L. Consolaro, S. Berlanga De Moraes Barros, S.S. Maria-Engler, A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing, *Toxicol. Vitro.* 42 (2017) 31–37. doi:10.1016/j.tiv.2017.03.010.
- [144] Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products, Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers concerning Diethyl Phthalate, 2002.
- [145] D.W. DelMonte, T. Kim, Anatomy and physiology of the cornea, *J. Cataract Refract. Surg.* 37 (2011) 588–598. doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037.
- [146] R.P. Verma, E.J. Matthews, An in silico expert system for the identification of eye irritants, *SAR QSAR Environ. Res.* 26 (2015) 383–395. doi:10.1080/1062936X.2015.1039578.
- [147] M. Piehl, M. Carathers, R. Soda, D. Cerven, G. DeGeorge, Porcine Corneal Ocular Reversibility Assay (PorCORA) predicts ocular damage and recovery for global regulatory agency hazard categories, *Toxicol. Vitro.* 25 (2011) 1912–1918. doi:10.1016/j.tiv.2011.06.008.
- [148] P. Gautheron, M. Dukik, D. Alix, J.F. Sina, Bovine corneal opacity and permeability test: An in Vitro assay of ocular irritancy, *Toxicol. Sci.* 18 (1992) 442–449. doi:10.1093/toxsci/18.3.442.
- [149] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [150] S. Ray, A. Kassan, A.R. Busija, P. Rangamani, H.H. Patel, The plasma membrane as a capacitor for energy and metabolism, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 310 (2016) C181–C192. doi:10.1152/ajpcell.00087.2015.
- [151] S. Wu, S.A. Ketcham, C.C. Corredor, D. Both, J.K. Drennen, C.A. Anderson, Rapid at-line early cell death quantification using capacitance spectroscopy, *Biotechnol. Bioeng.* 119 (2022) 857–867. doi:10.1002/BIT.28011.
- [152] J. Boutzen, M. Valet, A. Alviset, V. Fradot, L. Rousseau, S. Picaud, G.

- Lissorgues, O. Français, A detailed in-vitro study of Retinal pigment epithelium's growth as seen from the perspective of impedance spectroscopy analysis, *Biosens. Bioelectron.* 167 (2020). doi:10.1016/j.bios.2020.112469.
- [153] R.M. Lee, H. Choi, J.S. Shin, K. Kim, K.H. Yoo, Distinguishing between apoptosis and necrosis using a capacitance sensor, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2586–2591. doi:10.1016/j.bios.2009.01.028.
- [154] F. Groeber, L. Engelhardt, S. Egger, H. Werthmann, M. Monaghan, H. Walles, J. Hansmann, Impedance Spectroscopy for the Non-Destructive Evaluation of in Vitro Epidermal Models, *Pharm. Res.* 32 (2015) 1845–1854. doi:10.1007/s11095-014-1580-3.
- [155] S. Barabino, B. De Servi, S. Aragona, D. Manenti, M. Meloni, Efficacy of a New Ocular Surface Modulator in Restoring Epithelial Changes in an In Vitro Model of Dry Eye Syndrome, [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/02713683.2016.1184282](http://dx.doi.org/10.1080/02713683.2016.1184282). 42 (2016) 358–363. doi:10.1080/02713683.2016.1184282.
- [156] E.A. Youngstrom, A primer on receiver operating characteristic analysis and diagnostic efficiency statistics for pediatric psychology: We are ready to ROC, *J. Pediatr. Psychol.* 39 (2014) 204–221. doi:10.1093/jpepsy/jst062.
- [157] Y. Kaluzhny, H. Kandárová, L. D 'argembeau-Thornton, P. Kearney, M. Klausner, Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification of Eye Irritating Chemicals using Reconstructed Human Cornea-like Epithelial (RhCE) Tissue Model Video Link, *J. Vis. Exp.* (n.d.). doi:10.3791/52979.
- [158] C. Lotz, L. Kiesewetter, F.F. Schmid, J. Hansmann, H. Walles, F. Groeber-Becker, Replacing the Draize eye test: Impedance spectroscopy as a 3R method to discriminate between all GHS categories for eye irritation, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–13. doi:10.1038/s41598-018-33118-2.
- [159] M. Chacón, M. Sánchez, N. Vázquez, M. Persinal-Medina, S. Alonso-Alonso, B. Baamonde, J.F. Alfonso, L. Fernández-Vega-Cueto, J. Merayo-Llves, Á. Meana, Impedance-based non-invasive assay for ocular damage prediction on in vitro 3D reconstructed human corneal epithelium, *Bioelectrochemistry.* 146 (2022) 108129. doi:10.1016/J.BIOELECTHEM.2022.108129.

- [160] S. Lanfredi, A.C.M. Rodrigues, Impedance spectroscopy study of the electrical conductivity and dielectric constant of polycrystalline LiNbO_3 , *J. Appl. Phys.* 86 (1999) 2215–2219. doi:10.1063/1.371033.
- [161] Z. Li, J. Hui, P. Yang, H. Mao, Microfluidic Organ-on-a-Chip System for Disease Modeling and Drug Development, *Biosensors*. 12 (2022). doi:10.3390/BIOS12060370.
- [162] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. Von Stetten, R. Zengerle, Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1153–1182. doi:10.1039/B820557B.
- [163] J. Han, S. Kim, S.H. Lee, J.S. Kim, Y.J. Chang, T.C. Jeong, M.J. Kang, T.S. Kim, H.S. Yoon, G.Y. Lee, S.J. Bae, K.M. Lim, Me-too validation study for in vitro skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, *KeraSkin™* for OECD test guideline 439, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 117 (2020) 104725. doi:10.1016/j.yrtph.2020.104725.
- [164] K. Patel, R. Nixon, Irritant Contact Dermatitis — a Review, *Curr. Dermatol. Rep.* 11 (2022) 41. doi:10.1007/S13671-021-00351-4.
- [165] X.M. Hu, Z.X. Li, R.H. Lin, J.Q. Shan, Q.W. Yu, R.X. Wang, L.S. Liao, W.T. Yan, Z. Wang, L. Shang, Y. Huang, Q. Zhang, K. Xiong, Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021) 1–28. doi:10.3389/fcell.2021.634690.
- [166] R. Lee, J. Kim, S.Y. Kim, S.M. Jang, S.M. Lee, I.H. Choi, S.W. Park, J.S. Shin, K.H. Yoo, Capacitance-based assay for real-time monitoring of endocytosis and cell viability, *Lab Chip*. 12 (2012) 2377–2384. doi:10.1039/c2lc21236f.
- [167] J.P. Craig, K.K. Nichols, E.K. Akpek, B. Caffery, H.S. Dua, C.K. Joo, Z. Liu, J.D. Nelson, J.J. Nichols, K. Tsubota, F. Stapleton, TFOS DEWS II Definition and Classification Report., *Ocul. Surf.* 15 (2017) 276–283. doi:10.1016/J.JTOS.2017.05.008.
- [168] F. Stapleton, M. Alves, V.Y. Bunya, I. Jalbert, K. Lekhanont, F. Malet, K.S. Na, D. Schaumberg, M. Uchino, J. Vehof, E. Viso, S. Vitale, L. Jones, TFOS DEWS II Epidemiology Report, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 334–365. doi:10.1016/J.JTOS.2017.05.003.

Bibliografía

- [169] H. NL, B. CG, B. A, W. JA, Blinking and tear break-up during four visual tasks, *Optom. Vis. Sci.* 86 (2009) E106–E114. doi:10.1097/OPX.0B013E318194E962.
- [170] K. Tsubota, K. Nakamori, Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics, *Arch. Ophthalmol.* (Chicago, Ill. 1960). 113 (1995) 155–158. doi:10.1001/ARCHOPHT.1995.01100020037025.
- [171] A.J. Bron, C.S. de Paiva, S.K. Chauhan, S. Bonini, E.E. Gabison, S. Jain, E. Knop, M. Markoulli, Y. Ogawa, V. Perez, Y. Uchino, N. Yokoi, D. Zoukhri, D.A. Sullivan, TFOS DEWS II pathophysiology report, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 438–510. doi:10.1016/J.JTOS.2017.05.011.
- [172] J.P. Craig, J.D. Nelson, D.T. Azar, C. Belmonte, A.J. Bron, S.K. Chauhan, C.S. de Paiva, J.A.P. Gomes, K.M. Hammitt, L. Jones, J.J. Nichols, K.K. Nichols, G.D. Novack, F.J. Stapleton, M.D.P. Willcox, J.S. Wolffsohn, D.A. Sullivan, TFOS DEWS II Report Executive Summary, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 802–812. doi:10.1016/J.JTOS.2017.08.003.
- [173] L. Jones, L.E. Downie, D. Korb, J.M. Benitez-del-Castillo, R. Dana, S.X. Deng, P.N. Dong, G. Geerling, R.Y. Hida, Y. Liu, K.Y. Seo, J. Tauber, T.H. Wakamatsu, J. Xu, J.S. Wolffsohn, J.P. Craig, TFOS DEWS II Management and Therapy Report, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 575–628. doi:10.1016/J.JTOS.2017.05.006.
- [174] A.R. Wegener, L.M. Meyer, C.L. Schönfeld, Effect of Viscous Agents on Corneal Density in Dry Eye Disease, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 31 (2015) 504–508. doi:10.1089/JOP.2014.0157.
- [175] T. Li, H. Zhou, Effect of Polyethylene Cover for Preventing Corneal Injury in Critically Ill Patients: A Meta-Analysis, *Comput. Math. Methods Med.* 2022 (2022). doi:10.1155/2022/6578229.
- [176] H.M. So, C.C.H. Lee, A.K.H. Leung, J.M.J.A. Lim, C.S.C. Chan, W.W. Yan, Comparing the effectiveness of polyethylene covers (Gladwrap) with lanolin (Duratears) eye ointment to prevent corneal abrasions in critically ill patients: a randomized controlled study, *Int. J. Nurs. Stud.* 45 (2008) 1565–1571. doi:10.1016/J.IJNURSTU.2008.02.005.
- [177] T. Nikseresht, M. Rezaei, A. Khatony, The Effect of Three Eye Care Methods on the Severity of Lagophthalmos in Intensive Care Patients: A

- Randomized Controlled Clinical Trial, *J. Ophthalmol.* 2021 (2021). doi:10.1155/2021/6348987.
- [178] N. Koroloff, R. Boots, J. Lipman, P. Thomas, C. Rickard, F. Coyer, A randomised controlled study of the efficacy of hypromellose and Lacri-Lube combination versus polyethylene/Cling wrap to prevent corneal epithelial breakdown in the semiconscious intensive care patient, *Intensive Care Med.* 30 (2004) 1122–1126. doi:10.1007/S00134-004-2203-Y.
- [179] S.B. Hwang, J.H. Park, S.S. Kang, D.H. Kang, J.H. Lee, S.J. Oh, J.Y. Lee, J.Y. Kim, H. Tchah, Protective Effects of Cyclosporine A Emulsion Versus Cyclosporine A Cationic Emulsion Against Desiccation Stress in Human Corneal Epithelial Cells, *Cornea.* 39 (2020) 508–513. doi:10.1097/ICO.0000000000002244.
- [180] E.C. Kim, J.S. Choi, C.K. Joo, A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0.05% eye drops for treatment of dry eye syndrome, *Am. J. Ophthalmol.* 147 (2009). doi:10.1016/J.AJO.2008.08.015.
- [181] E. Anitua, M.L. de la Fuente, I. Alcalde, C. Sanchez, J. Merayo-Llodes, F. Muruzabal, Development and Optimization of Freeze-Dried Eye Drops Derived From Plasma Rich in Growth Factors Technology, *Transl. Vis. Sci. Technol.* 9 (2020) 1–16. doi:10.1167/TVST.9.7.35.
- [182] T.K. Kobayashi, K. Tsubota, E. Takamura, M. Sawa, Y. Ohashi, M. Usui, Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation, *Ophthalmologica.* 211 (1997) 358–361. doi:10.1159/000310829.
- [183] D.L. Hatchell, A. Sommer, Detection of ocular surface abnormalities in experimental vitamin A deficiency, *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960).* 102 (1984) 1389–1393. doi:10.1001/ARCHOPHT.1984.01040031131040.

Bibliografia

Divulgación



Macaca mulatta

227 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Publicaciones científicas directamente relacionadas con la tesis doctoral

- *QobuR – A new in vitro human corneal epithelial model for preclinical drug screening.* **M. Chacón**; N. Vázquez; S. Berisa; M. Persinal; M. Sánchez; B. Baamonde; J.F. Alfonso; L. Fernández-Vega-Cueto; J. Merayo-Llaves; Á. Meana. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 136 (2019) 164-173
- *Development of an in-house reconstructed human epidermis model as an alternative method in skin corrosion assessment.* **M. Chacón**; N. Vázquez; M. Persinal-Medina; S. Alonso-Alonso; M. Pevida; S. Llamas; B. Baamonde; L. Quiros; J. Merayo-Llaves; Á. Meana. *Toxicology in Vitro*. 65 (2020) 104779
- *Impedance-based non-invasive assay for ocular damage prediction on in vitro reconstructed human corneal epithelium.* **M. Chacón**; M. Sánchez; N. Vázquez; M. Persinal-Medina; S. Alonso-Alonso; B. Baamonde; J.F. Alfonso; L. Fernández-Vega-Cueto; J. Merayo-Llaves; Á. Meana. *Bioelectrochemistry*. 146 (2022) 108129
- *In house performance assessment of 3D QobuR-Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) for the evaluation of eye hazard.* **M. Chacón**; N. Vázquez; M. Persinal-Medina; S. Alonso-Alonso; I. Alcalde; J. Merayo-Llaves; Á. Meana. *Toxicology in vitro*. 82 (2022) 105390
- *Improved tool for predicting skin irritation on Reconstructed human Epidermis model based on electrochemical impedance spectroscopy.* **M. Chacón**, N. Vázquez; S. Alonso-Alonso; M. Persinal-Medina; S. Llamas; M. Pevida; I. Alcalde; J. Merayo-Llaves; Á. Meana. *Biosensors*. 13 (2023) 162

Otras publicaciones científicas realizadas por el doctorando

- *Reduced graphene oxide membranes in ocular regenerative medicine*. I. Zambrano-Andazol; N. Vázquez; **M. Chacón**; R.M. Sánchez-Ávila; M. Persinal; C. Blanco; Z. González; R. Menéndez; M. Sierra; Á. Fernández-Vega; T. Sánchez; J. Merayo-Lloves; Á. Meana. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 114 (2020) 111075
- *Xeno-free approach for the expansion of human adipose derived mesenchymal stem cells for ocular therapies*. M. Persinal-Medina; S. Llamas; N. Vázquez; **M. Chacón**; A. Acebes-Huerta; E. Uribe; S. Alonso-Alonso; C. Fernández-Vega González; B. Baamonde; L. Quirós; J. Merayo-Lloves; Á. Meana. *Experimental Eye Research*. 202 (2021) 108358
- *Fibrin-plasma rich in growth factors membrane for the treatment of a rabbit alkali-burn lesion*. R.M. Sánchez-Ávila; N. Vázquez; **M. Chacón**; M. Persinal-Medina; A. Brea-Pastor; S. Berisa-Prado; L. Fernández-Vega-Cueto; E. Anitua; Á. Meana; J. Merayo-Lloves. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021) 5564
- *Mini cleanroom for the manufacture of advanced therapy medicinal products (Atmp): Bioengineered corneal epithelium*. S. Berisa-Prado; N. Vázquez; **M. Chacón**; M. Persinal-Medina; S. Alonso-Alonso; B. Baamonde; J.F. Alfonso; L. Fernández-Vega-Cueto; J. Merayo-Lloves; Á. Meana. *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1282
- *Polymerizable skin hidrogel for full thickness wound healing*. M. Persinal-Medina; S. Llamas; **M. Chacón**; N. Vázquez; M. Pevida; I. Alcalde; S. Alonso-Alonso; L.M. Martínez-López; J. Merayo-Lloves; Á. Meana. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2022) 4837
- *A simple, safe, and effective method for preparing autologous bio-based fibrin glue for ophthalmic use*. L. Fernández-Vega-Cueto; M. Persinal-Medina; N. Vázquez; **M. Chacón**; B. Alfonso-Bartolozzi; S. Alonso-Alonso; T. Sánchez; S. Berisa-Prado; L.M. Martínez-López; J. Merayo-Lloves; Á. Meana. *Pharmaceutics*. 14 (2022) 2325

Publicaciones en congresos directamente relacionadas con la tesis doctoral

- *A new in vitro corneal epithelial model for preclinical drug screening.* **Manuel Chacón**, Álvaro Meana, Natalia Vázquez, Silvia Berisa, Mairobi Persinal, Manuel Sánchez, Luís Fernández-Vega Cueto-Felgueroso, Jose F. Alfonso, Jesús Merayo-Lloves. *3rd Biennial International Symposium on Ocular Regeneration* (2018, Boston, EE. UU.)
- *Evaluating the safety of pharmaceutical drugs in a dual model of cell viability and barrier integrity.* **Manuel Chacón**, Álvaro Meana, Natalia Vázquez, Silvia Berisa, Mairobi Persinal, Manuel Sánchez, Luís Fernández-Vega Cueto-Felgueroso, Jose F. Alfonso, Jesús Merayo-Lloves. *14th Congress on Ocular Pharmacology and Therapeutics (AOPT)* (2019, Nueva Orleans, EE.UU.)
- *Cruelty-free corneal damage assay based on automatic high-throughput cell capacitance.* **Manuel Chacón**; María Begoña González-García; Daniel Izquierdo-Bote; Manuel Sánchez; Natalia Vázquez; Silvia Berisa; Mairobi Persinal-Medina; Sergio Alonso-Alonso; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2020, Baltimore, EE.UU.)
- *A non-invasive cell death monitoring based on automatic high-throughput cell capacitance measurements.* Pablo Fanjul; Daniel Izquierdo-Bote; María Begoña González-García; **Manuel Chacón**; Lorena Suarez; Manuel Sánchez; David Hernández-Santos. *Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid State Science (PRiME)* (2020, Virtual, Corea)
- *Evaluación cruelty-free del daño ocular mediante capacitancia celular de alto rendimiento.* **Manuel Chacón**, Jesús Merayo-Lloves, Álvaro Meana. *IX Jornadas Internacionales de Doctorado de la Universidad de Oviedo* (2020, Asturias, España)
- *Evaluation of ocular irritancy based on cell membrane capacitance on a cruelty-free in vitro corneal model.* **Manuel Chacón**; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; Sergio Alonso-Alonso; Ignacio Alcalde; Manuel Sánchez; Luis Fernández-Vega-Cueto; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2021, Virtual, EE.UU.)

- *Cell membrane capacitance – A non-invasive alternative to predict ocular irritancy on reconstructed human corneal epithelia.* **Manuel Chacón**; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; Sergio Alonso-Alonso; Ignacio Alcalde; Manuel Sánchez; Álvaro Meana. *JCR Summer School on Non-Animal Approaches in Science* (2021, Ispra, Italia)
- *Capacitancia celular – Una alternativa no invasiva para predecir la irritación ocular en modelos de epitelio corneal reconstruido.* **Manuel Chacón**, Jesús Merayo-Lloves, Álvaro Meana. *X Jornadas Internacionales de Doctorado de la Universidad de Oviedo.* (2021, Asturias, España)
- *Ocular irritancy prediction based on non-invasive cell membrane capacitance measurement.* **Manuel Chacón**; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; Sergio Alonso-Alonso; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. *VII International Congress of Research in Retina and Vision (SIREV)* (2021, Virtual, España)
- *Performance assessment of QobuR-RhCE – a cruelty-free in vitro cornea model.* **Manuel Chacón**; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; Sergio Alonso-Alonso; Ignacio Alcalde; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2022, Denver, EE.UU.)
- *Métodos alternativos a la experimentación animal.* **Manuel Chacón**; Natalia Vázquez; Sergio Alonso, Mairobi Medina; Álvaro Meana. *Semana del Instituto Universitario Fernández-Vega.* (2022, Asturias, España)
- *Electrochemical impedance spectroscopy as an alternative to the Draize eye irritation test.* **Manuel Chacón**, Natalia Vázquez, Sergio Alonso-Alonso, Mairobi Persinal-Medina, Ignacio Alcalde, Jesús Merayo-Lloves, Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)

Otras publicaciones en congresos realizadas por el doctorando

- *El servicio de farmacia hospitalaria implicado en el desarrollo de un sistema de calidad farmacéutico para la producción de un medicamento de terapias avanzadas en una instalación no convencional.* Silvia Berisa; Álvaro Meana; Natalia Vázquez; **Manuel Chacón**; Jesús Merayo. 64 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) (2019, Sevilla, España)
- *Xeno-free and minimally invasive approach for ocular therapies based on mesenchymal stem cells.* Jesús Merayo-Lloves; Mairobi Persinal-Medina; Natalia Vázquez; **Manuel Chacón**; Sergio Alonso-Alonso; Luís Fernández-Vega-Cueto; Begoña Baamonde; José I. Blázquez; Carlos Lisa; Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2020, Baltimore, EE.UU.)
- *Corneas discarded by low endothelial count: a source of human corneal endothelial cells (hCECs).* Álvaro Meana; Natalia Vázquez; Sergio Alonso-Alonso; Carlota Suarez-Barrio; Susana del Olmo-Aguado; **Manuel Chacón**; Eva García-Pérez; Mairobi Persinal-Medina; Miguel Naveiras; José F. Alfonso; Jesús Merayo-Lloves. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2020, Baltimore, EE.UU.)
- *Autologous tissue adhesive in ophthalmological surgery.* Mairobi Persinal-Medina, Silvia Berisa, **Manuel Chacón**, Natalia Vázquez, Ignacio Blázquez, Álvaro Meana, Jesús Merayo Lloves, Luis Fernández Vega Cueto Felgueroso. *25th Congress of the European Association of Hospital Pharmacists (EAHP)* (2020, Gothenburg, Suecia)
- *Nanoparticles for improving therapeutic effects of antibiotics in cornea.* Alejandro Llamedo; Rosalía Sánchez; **Manuel Chacón**; Rebeca Alonso. *Nanomaterials Applied to Life Science (NALS)* (2020, Madrid, España)
- *Oral mucosa culture system for ocular surface treatment avoiding the use of xenogeneic components.* Álvaro Meana; Mairobi Persinal-Medina; Natalia Vázquez; **Manuel Chacón**; Sergio Alonso-Alonso; Carlos Fernández-Vega-González; José I. Blázquez; Sara Llames; Jesús Merayo-Lloves. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2021, Virtual, EE.UU.)

- *Development of a new xeno-free human corneal endothelial cells culture system based on Platelet Rich in Growth Factors.* Sergio Alonso-Alonso; Natalia Vázquez; Carlota Suarez-Barrio; Susana del Olmo-Aguado; **Manuel Chacón**; Eva García-Pérez; Mairobi Persinal-Medina; José F. Alfonso; Belén Alfonso; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2021, Virtual, EE.UU.)
- *In vitro study of the generation of anterior subcapsular opacity after mechanical stimuli.* Ignacio Alcalde; Cristina Sánchez-Fernández; Belén Alfonso; **Manuel Chacón**; Natalia Vázquez; Carla Martín; Álvaro Meana; Jesús Merayo-Lloves; José F. Alfonso. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2021, Virtual, EE.UU.)
- *Discarded corneal endothelial tissues: a source of viable endothelial cells usable for other therapies.* Sergio Alonso-Alonso; Natalia Vázquez; Susana del Olmo-Aguado; **Manuel Chacón**; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. *VII International Congress of Research in Retina and Vision (SIREV)* (2021, Virtual, España)
- *Comparison of mRNA expression in primary cultures of human anterior lens epithelium and human corneal endothelium.* Sergio Alonso-Alonso; Natalia Vázquez; **Manuel Chacón**; Mairobi Persinal-Medina; Noemí Caballero-Sánchez; Laszlo Nagy; Luís Fernández-Vega-Cueto-Felgueroso; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (2022, Denver, EE.UU.)
- *Design of a New Facility for the Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (Bioengineered Epithelia) for Rare Diseases Treatment at Very Reasonable Cost.* Sara Llames; Natalia Vázquez; Marta Pevida; **Manuel Chacón**; Laura Martínez; Álvaro Meana. *11th European Conference on Rare Diseases & Orphan Products (EURORDIS)* (2022, Virtual)
- *Cultured oral mucosal and adipocytic msc in an alkaline chemical burn of the corneal in an experimental model.* Álvaro Meana, Mairobi Persinal-Medina, Natalia Vázquez, **Manuel Chacón**, Sergio Alonso-Alonso, Sara Llames, Marta Pevida, Jesús Merayo-Lloves. *Annual Meeting of the*

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)

- *Feasibility of a Corneal Endothelial Cell Therapy using two in vitro corneal models.* Sergio Alonso-Alonso, Natalia Vázquez, **Manuel Chacón**, Mairobi Persinal-Medina, Jesús Merayo-Lloves, Álvaro Meana. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)*
- *Plasma Rich in Growth Factors enhances corneal nerve regeneration after experimental laser ablation in mice.* Ignacio Alcalde, Cristina Sánchez-Fernández, Alberto Barros, Susana del Olmo-Aguado, **Manuel Chacón**, Luís Fernández-Vega-Cueto, Noelia Blanco-Agudín, Jesús Merayo-Lloves. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)*

Premios

- *2018 Travel Grant Recipient.* 3rd Biennial International Symposium on Ocular Regeneration (2018, Boston, EE.UU.)
- *2019 Travel Grant Recipient.* 14th Congress on Ocular Pharmacology and Therapeutics (AOPT) (2019, Nueva Orleans, EE.UU.)
- *2020 Travel Grant Recipient.* Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2020, Baltimore, EE.UU.)
- *2020 ESACT Grant.* European Society for Animal Cell Technology (ESACT)
- *2021 Travel Grant Recipient.* Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2021, Virtual, EE.UU.)
- *Premio RADAR Spin-Off.* Centro Europeo de Empresas e Innovación. (2021, Asturias, España)

Otros méritos

- *Socio co-fundador de Ethicell SL* (Agosto 2022)

Financiación



Lemur catta

54 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha contado con la siguiente financiación:

Título del proyecto: Aplicaciones Biomédicas de modelos de tejido artificial en pruebas de toxicidad y permeabilidad de preparaciones tópicas [BIO-TEAR]

Entidad financiadora: Gobierno del Principado de Asturias cofinanciado por los Fondos de Desarrollo Europeos (FEDER).

Referencia: INNOVA-IDEPA-IDE-2016-000215



Título del proyecto: Evaluación de la toxicidad y biodisponibilidad de nuevas formulaciones galénicas nanoestructuradas empleado un nuevo método alternativo que evite el uso de animales de experimentación [NANOBIOTEER]

Entidad financiadora: Gobierno del Principado de Asturias cofinanciado por los Fondos de Desarrollo Europeos (FEDER).

Referencia: INNOVA-IDEPA-IDE-2018-000415



Financiación

Título del proyecto: Pre-validación de epitelios humanos reconstruidos para su utilización como método alternativo a la experimentación animal en la evaluación de los peligros para la salud humana de los productos químicos [SAFECHEM]

Entidad financiadora: Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020.

Referencia: PID2019-111745RB-I00



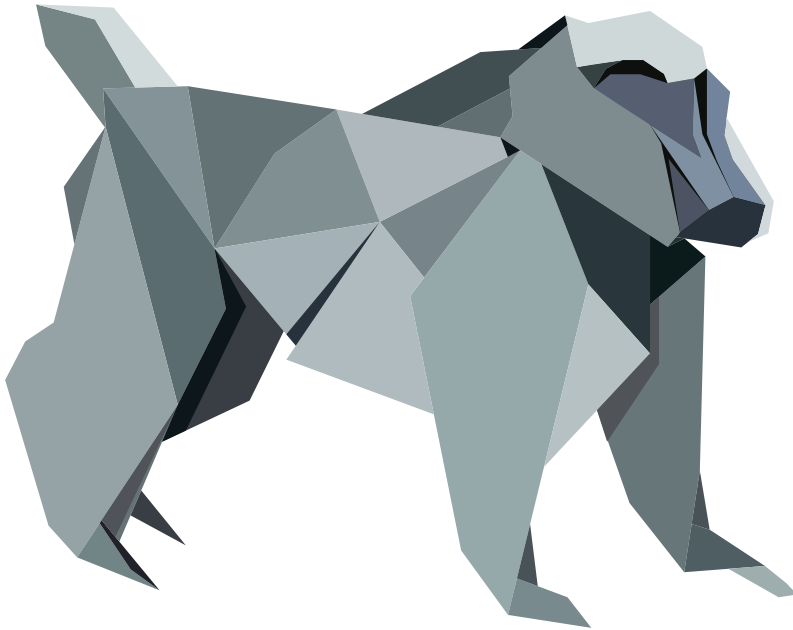
Título del proyecto: Desarrollo y validación de métodos *cruelty-free* basados en epitelios humanos reconstruidos para la identificación de peligros para la salud humana [FRhEE]

Entidad financiadora: Programa Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2021-2023.

Referencia: PLEC2022-009463



Anexos



Papio anubis

53 utilizados con fines científicos en la
Unión Europea en 2020

Director, Cornea Service
243 Charles St., Boston, MA 02114
Tel: +1.617.573.4331
Fax: +1.617.573.4300
Email: reza_dana@meci.harvard.edu
<http://eye.hms.harvard.edu/rezadana>

REZA DANA, MD, MPH, MSc, FARVO
Claes H. Dohlman Professor of Ophthalmology
Vice Chairman & Associate Chief for Academic Programs
Director, Harvard-Vision Clinical Scientist Development Program

Senior Scientist and Director
Laboratory of Corneal Immunology,
Transplantation & Regeneration
Schepens Eye Research Institute
20 Staniford Street, Boston, MA 02114
Tel: +1.617.912.7401

CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION
CERTIFICADO DE ESTANCIA EN UNA INSTITUCIÓN EXTRANJERA
APPLICANT / BENEFICIARIO

Name / Nombre y Apellidos: Manuel Chacón Rodríguez
National Identity Card / Documento Nacional de Identidad: 71893669Q
Home Institution / Centro de partida: Fundación de Investigación Oftalmológica. Instituto Universitario Fernández-Vega.
Universidad de Oviedo

HOST INSTITUTION / CENTRO EN EL QUE HA REALIZADO LA ESTANCIA

Name / Nombre: Schepens Eye Research Institute of Mass Eye and Ear. Harvard Medical School
City / Localidad: Boston, MA, USA
Address / Dirección: 20 Staniford Street

Host Institution Supervisor / Investigador responsable en el centro de la estancia: Reza Dana

THIS IS TO CERTIFY

That Manuel Chacón Rodríguez has performed a stay in this Institution in the following dates:

From April 20, 2023, to July 20 2023

CERTIFICO

Que la persona arriba mencionada ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas

Desde 20 de abril de 2023 hasta 20 de julio de 2023

City and date / Lugar y Fecha: Boston, MA, USA - 07/27/2023

Signature / Firma:



Reza Dana, MD, MPH, MSc



Research paper

QobuR – A new in vitro human corneal epithelial model for preclinical drug screening



Manuel Chacón^{a,*}, Natalia Vázquez^a, Silvia Berisa^{a,b}, Mairobi Persinal^a, Manuel Sánchez^c, Begoña Baamonde^a, Jose F. Alfonso^{a,b}, Luis Fernández-Vega Cueto^{a,b}, Jesús Merayo-Llves^a, Álvaro Meana^{a,d}

^a Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

^b Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Oviedo, Spain

^c Departamento de Medicina (Farmacología), Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

^d Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER U714), Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Ocular irritancy
Drug absorption
In vitro cornea model
QobuR
TEER measurement
Barrier disruptions
Alternative method

ABSTRACT

A new in vitro human corneal epithelial model (QobuR) obtained from normal limbal tissue has been developed to study ocular irritancy of different ophthalmic compounded drugs. Phenotypical characterization and trans-epithelial electrical resistance (TEER) of QobuR revealed essential similarities compared with a native human cornea, displaying functional markers and TEER values near $1500\ \Omega\text{cm}^2$ at day 7th of cellular differentiation. Using this model, ocular irritancy and barrier integrity alterations were evaluated using MTT reaction and variations in TEER. We found that some of the Non-Irritant products evaluated still damage the corneal epithelial integrity and current protocols for ocular irritancy should therefore include a barrier integrity evaluation. Moreover, in order to comprehensively evaluate corneal permeability of the active ingredients, we propose the use of QobuR as an all-in-one alternative method for evaluating ocular irritancy, barrier disruptions and permeability rates of topically applied ocular drugs to improve current in vitro drug testing procedures.

1. Introduction

In order to guarantee the safety of the general public, every pharmaceutical or cosmetic product must be evaluated and classified according to its potential to damage the ocular surface according to the Globally Harmonised System (GHS) proposed by the United Nations [1]. This classification defines four different categories based on the results obtained in the in vivo Draize Rabbit Eye Test [2]: Category 1 (irreversible damage to eyes), Category 2A (irritating to eyes), Category 2B (mildly irritating to eyes) and No Category (non-irritating). The European Union has officially adopted GHS classification into its legislation with the only difference being combining GHS categories 2A and 2B into a single Category 2 (irritating to eyes) [3].

Following the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes [4], toxicity studies using animal models are being replaced by non-animal tests. To date, several alternative methods have been validated and regulatory accepted as OECD Test Guidelines (TG) for the prediction of ocular irritation. These alternative methods can be grouped into 3 categories:

- 1- **Ex vivo models:** Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method (OECD TG 437) and Isolated Chicken Eye (ICE) test method (OECD TG 438).
- 2- **In vitro monolayer models:** Short Time Exposure (STE) test method (OECD TG 491) and Fluorescein Leakage (FL) test method (OECD TG 460).
- 3- **In vitro 3D models:** Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method (OECD TG 492).

Of these alternative methods, ex vivo animal models and in vitro monolayer models have substantial differences in comparison with a native human cornea. Interspecies anatomical differences may lead to erroneous interpretations, while monolayer cell culture does not reflect the real microstructure of a normal epithelium [5]. In vitro 3D models of corneal epithelium most accurately represent the cellular architecture of the human ocular surface. In the OECD TG 492, the use of two commercially available cornea models are described: EpiOcular™ (MatTek, MA, USA) and SkinEthic HCE (SkinEthic, Lyon, France). However, the use of non-corneal cells (EpiOcular™ [6]) and

* Corresponding author at: Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Asturias, Spain.
E-mail address: m.chacon@fio.as (M. Chacón).



Development of an in-house reconstructed human epidermis model as an alternative method in skin corrosion assessment

Manuel Chacón^{a,*}, Natalia Vázquez^a, Mairobi Persinal-Medina^a, Sergio Alonso-Alonso^a, Marta Pevida^b, Sara Llames^{b,c,d}, Begoña Baamonde^a, Luis Quiros^a, Jesús Merayo-Llodes^a, Álvaro Meana^{a,b,c}

^a Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

^b Unidad de Ingeniería Tisular, Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, Oviedo, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) (U714), ISCIII, Madrid, Spain

^d Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

DIY-RhE

Open science

Corrosivity test

Alternatives to animal use

TEER

ABSTRACT

Defining the corrosive properties of chemical products generally involves the use of animal models for human health safety assessment. However, a few alternatives to animal experimentation are currently internationally accepted in order to reduce animal suffering. One of these alternatives makes use of in vitro reconstructed human epidermis (RhE) models and predicts corrosive potential based on the evaluation of cell viability after topical exposure. These models rely on its similarity to human skin, both functional and histological, and are currently worldwide marketed by a few private companies.

In this manuscript, we describe the fundamentals of the production of a Do It Yourself (DIY) RhE model, and the operating procedures for the assessment of skin corrosion based on the guidelines proposed for the development of new alternative methods for skin corrosion.

Our results indicate that the DIY-RhE model resembles the anatomy of the normal human epidermis as seen by immunohistochemical analysis. Moreover, barrier properties of DIY-RhE were assessed by the measure of Transepithelial Electrical Resistance. Applicability of DIY-RhE for the assessment of skin corrosion was evaluated by measuring cell viability after topical exposure of twelve reference chemicals for 3 and 60 min. Predictive performance resulted in 100% sensitivity, 100% specificity and 100% accuracy matching current requirements for new RhE models proposed for the discrimination of corrosives and non-corrosives.

1. Introduction

Skin is the largest organ in the human body and its main role is to provide an efficient barrier against the external environment. The skin protects the human body against harmful stimuli such as antigens, UV light, toxins, small particles and chemicals found in consumer products. Topical exposure to chemical products could lead to unwanted adverse effects on the human skin that can be classified according to the severity and reversibility of the damage in cutaneous irritancy and skin corrosion. Therefore, consumer products must ensure human health safety before being released to the general public through extensive toxicological analysis. In order to evaluate acute dermal irritation/corrosion, the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has implemented the use of the Draize test assay (Draize et al., 1944) in the Test Guideline (TG) 404 (OECD, 2015a). In

the Draize test, test chemicals are applied directly to the skin of an experimental animal, having the potential to cause them severe discomfort or pain, rising up serious concerns in ethics and animal welfare. Worldwide legislation endorses the development and use of alternative test methods in order to reduce, refine and replace animal experimentation and has led to the implementation of OECD TGs 430 (OECD, 2015b), 431 (OECD, 2019) and 435 (OECD, 2015c) as alternative methods for the assessment of skin corrosion. The development of alternative methods was a game-changing decision driven by the European Union through the Regulation 1223/2009 that has implemented a stepwise ban on animal test for cosmetic products and ingredients and a ban in marketing of cosmetic products that contains ingredients tested on animals that is currently enforced since March 2013 (The European Parliament and the Council of the European Union, 2009). Several other countries have followed its lead on phasing out animal testing

* Corresponding author at: Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Asturias, Spain.
E-mail address: m.chacon@fio.as (M. Chacón).



Impedance-based non-invasive assay for ocular damage prediction on in vitro 3D reconstructed human corneal epithelium

Manuel Chacón^{a,b,*}, Manuel Sánchez^{b,c}, Natalia Vázquez^{a,b}, Mairobi Persinal-Medina^{a,b}, Sergio Alonso-Alonso^{a,b}, Begoña Baamonde^{a,b}, Jose F. Alfonso^{a,b}, Luis Fernández-Vega-Cueto^{a,b}, Jesús Merayo-Llodes^{a,b}, Álvaro Meana^{a,b,c,d}

^a Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain

^c Departamento de Medicina (Farmacología), Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) (U714), ISCIII, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Impedance
Membrane capacitance
Trans epithelial electrical resistance (TEER)
Reconstructed human Corneal Epithelium (RhCE)
Corneal irritation

ABSTRACT

Reconstructed human cornea-like epithelium (RhCE) holds unprecedented promise for toxicological analyses and the replacement of animal use. However, current standards to evaluate potential ocular irritancy present a major downfall, the need to invasively alter tissue samples to evaluate cell viability. In this study, the applicability of impedance analysis was validated by monitoring the change in cell capacitance during tissue maturation and before and after chemical application using coupled electrodes. Our results indicate that cell maturation on RhCE models can be evaluated during model production using capacitance sensing offering a faster and simpler quality control criteria for RhCE model usability. Additionally, cell capacitance resulted to be more sensitive in detecting slight cell damages than methods based on cell metabolism, and when integrated into OECD-approved testing strategies, capacitance sensing performed as good as currently accepted methodologies displaying 66% sensitivity, 100% specificity and 83% accuracy when evaluated at 300 Hz. In summary, a quantitative analysis to predict *in vivo* ocular irritation based on changes in RhCE capacitance by impedance spectroscopy is suggested. This methodology represents a non-invasive and non-destructive alternative that would enable the monitoring of reversible effects or repeated dose toxicity.

1. Introduction

The cornea is a transparent and avascular organ comprised of five different layers: epithelium, Bowman's membrane, stroma, Descemet's membrane and endothelium [1]. Unlike the human skin, the corneal epithelium is not cornified and thus is more vulnerable to chemical or mechanical injuries. Due to the importance of human eyesight, commercial products must ensure human health safety before being released through extensive toxicological analysis. To evaluate ocular irritation, several standardized test protocols have already been developed. The first standardized protocol was developed in 1944 by John Draize and consisted in the application in one eye of an albino rabbit and the analysis of the adverse effects for 21 days [2]. However, due to the increasing ethical concerns regarding animal experimentation, international legislation such as the European Directive 2010/63/EU ensures

that alternative methods to animal use should be used whether scientifically possible [3]. Accordingly, several alternative methods involving the use of different *in silico* [4], *ex vivo* [5,6] and *in vitro* [7–10] models have been developed and some are already approved as OECD Test Guidelines (TG) to replace the Draize irritation test [11–13]. Among these alternatives, OECD TG 492 encompasses the use of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) models for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation and whose prediction is generally based on the evaluation of cytotoxicity by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)-assay, an endpoint destructive test based on the enzymatic reduction of the yellow tetrazolium dye to a purple formazan salt by cells with active metabolism that renders the model unusable for further testing [14]. However, it is generally accepted that animal testing could not be effectively replaced by a single *in vitro* result of cell viability; hence the

* Corresponding author at: Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega 34, 33012 Oviedo, Asturias, Spain.

E-mail address: m.chacon@fio.as (M. Chacón).

<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108129>

Received 17 February 2022; Received in revised form 28 March 2022; Accepted 30 March 2022

Available online 2 April 2022

1567-5394/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

In-house performance assessment of 3D QobuR-Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) for the evaluation of eye hazard

Manuel Chacón^{a,b,*}, Natalia Vázquez^{a,b}, Mairobi Persinal-Medina^{a,b}, Sergio Alonso-Alonso^{a,b}, Ignacio Alcalde^{a,b}, Jesús Merayo-Llves^{a,b}, Álvaro Meana^{a,b,c}

^a Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) (U714), ISCIII, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Editor: P Jennings

Keywords:

QobuR-RhCE
Corneal irritation
Alternative method
TEER
Ocular irritancy
In vitro cornea model

ABSTRACT

To replace the Draize eye irritation test (OECD Test Guideline 404), several test methods based on reconstructed cornea-like epithelium (RhCE) have been developed and adopted in the OECD TG 492. The objective of this study was to establish the experimental procedures and evaluate the performance assessment of QobuR-RhCE, an in-house RhCE model to be used for the evaluation of eye hazard. We define the essential structural, functional and procedural elements of the test method components to help assuring that the proposed test method is based on the same concepts as the validated reference methods. Performance assessment was evaluated in accordance with the revised performance standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro reconstructed human cornea-like epithelium and the minimum list of reference chemicals was evaluated. As result, the proposed method scored 93.3% sensibility, 60% specificity, 76.7% accuracy and 96.7% within-laboratory reproducibility (WLR), providing a similar performance in comparison to the validated reference methods. Additionally, we describe a secondary endpoint based on Transepithelial Electrical Resistance (TEER) that could be of use to better discriminate between irritants and non-irritants. Taken together the results indicate that the QobuR-RhCE test method is an accurate screening tool that can be used as a standalone alternative to evaluate ocular irritation.

1. Introduction

Eye hazard must be identified for any new raw materials included in pharmaceuticals, cosmetics and chemicals in order to determine the risk posed by its use or handling. For many years, the in vivo Draize eye irritation test represented the only approved test guideline (TG) by the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) for the evaluation of ocular damage. The Draize eye irritation test consists in the application of a single dose to one of the eyes of an experimental animal and the scoring of the irritating lesions in the conjunctiva, cornea and iris at specific intervals (OECD, 2020a). However, societal changes regarding animal welfare are contributing to the decline of animal-based in vivo test in favor of alternative test methods. Following the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes (European Union, 2010), the European Union (EU) has enforced the regulatory framework for phasing out animal testing and bans the use of animals for cosmetic testing (The European Parliament

and the Council of the European Union, 2009). This has led to the development of alternative methods to replace the Draize eye irritation test and its adoption to distinguish between irritants (Category 1 and Category 2) and non-irritants (No category) according to the UN-GHS (United-Nations, 2017). Currently OECD approved TGs to replace animal testing include the TG 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method (OECD, 2020b); TG 438: Isolated Chicken Eye (ICE) test method (OECD, 2018); TG 460: Fluorescein leakage test method (OECD, 2017a); TG 491: Short-Time Exposure test (STE) test method (OECD, 2020c); TG 492: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method (OECD, 2019a) and TG 494: Vitrigel-Eye Irritancy test method (OECD, 2019b).

Among these, RhCE test methods are one of the recommendations for use as a first step in a Bottom-up strategy in the framework of tiered testing according to the integrated approach on testing and assessment (IATA) (OECD, 2017b). In RhCE models, cells are cultured in insert at the air/liquid interphase, leading to a 3D stratified epithelium that

* Corresponding author at: Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega 34, 33012 Oviedo, Asturias, España.

E-mail address: m.chacon@fo.as (M. Chacón).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105390>

Received 4 January 2022; Received in revised form 4 April 2022; Accepted 13 May 2022

Available online 17 May 2022

0887-2333/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article

Improved Tool for Predicting Skin Irritation on Reconstructed Human Epidermis Models Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy

Manuel Chacón^{1,2,*}, Natalia Vázquez^{1,2}, Sergio Alonso-Alonso^{1,2}, Mairobi Persinal-Medina^{1,2}, Sara Llames^{1,3,4,5}, Marta Pevida^{1,2,3,4}, Ignacio Alcalde^{1,2}, Jesús Merayo-Llves^{1,2} and Álvaro Meana^{1,2,3,4}

- ¹ Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Avda. Doctores Fernández-Vega, 33012 Oviedo, Spain
 - ² Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Avda. del Hospital Universitario, 33011 Oviedo, Spain
 - ³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) ISCIII, 28029 Madrid, Spain
 - ⁴ Unidad de Ingeniería Tisular, Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias (CCST), 33006 Oviedo, Spain
 - ⁵ Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), 28015 Madrid, Spain
- * Correspondence: m.chacon@fio.as

Abstract: The rabbit skin irritation test has been the standard for evaluating the irritation potential of chemicals; however, alternative methods that do not use animal testing are actively encouraged. Reconstructed human epidermis (RhE) models mimic the biochemical and physiological properties of the human epidermis and can be used as an alternative method. On RhE methods, the metabolic activity of RhE models is used to predict skin irritation, with a reduction in metabolic activity indicating a reduced number of viable cells and linking cell death to skin irritation processes. However, new challenges have emerged as the use of RhE models increases, including the need for non-invasive and marker-free methodologies to assess cellular states. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is one such methodology that can meet these requirements. In this study, our results showed that EIS can differentiate between irritant and non-irritant chemicals, with a significant increase in the capacitance values observed in the irritant samples. A ROC curve analysis showed that the prediction method based on EIS met OECD TG 439 requirements at all time points and had 95% within-laboratory reproducibility. Comparison with the MTT viability assay showed that prediction using EIS achieved higher sensitivity, specificity, and accuracy. These results suggest that EIS could potentially replace animal testing in the evaluation of irritation potential and could be a valuable addition to in vitro testing strategies.

Keywords: electrochemical impedance spectroscopy; capacitance; reconstructed human epidermis; skin irritation; safety assessment; alternative method



Citation: Chacón, M.; Vázquez, N.; Alonso-Alonso, S.; Persinal-Medina, M.; Llames, S.; Pevida, M.; Alcalde, I.; Merayo-Llves, J.; Meana, Á. Improved Tool for Predicting Skin Irritation on Reconstructed Human Epidermis Models Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Biosensors* **2023**, *13*, 162. <https://doi.org/10.3390/bios13020162>

Received: 9 December 2022

Revised: 17 January 2023

Accepted: 17 January 2023

Published: 20 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The rabbit skin irritation test has been the gold standard for the evaluation of the irritation potential of chemicals since the adoption of the OECD test guideline (TG) 404 in 1981 [1]. This method is based on the application of a single dose to the skin of an experimental animal and the scoring of the degree of irritation/corrosion at specified intervals. In the interest of both sound science and animal welfare, alternative methods to animal experimentation are highly encouraged to replace the testing and evaluation strategy provided in OECD TG 404. As so, OECD TG 439, originally adopted in 2010, includes in its latest update seven validated test methods of different commercially available in vitro models, representing an in vitro alternative based on the reconstructed human epidermis (RhE), a test system that mimics the biochemical and physiological properties