

# Avenços en les 3Rs: Mètodes *in vitro* per a avaluar i estudiar la fototoxicitat

---



**Dra. Montse Mitjans**

**Secció de Fisiologia, Dpt. de Bioquímica i Fisiologia,**

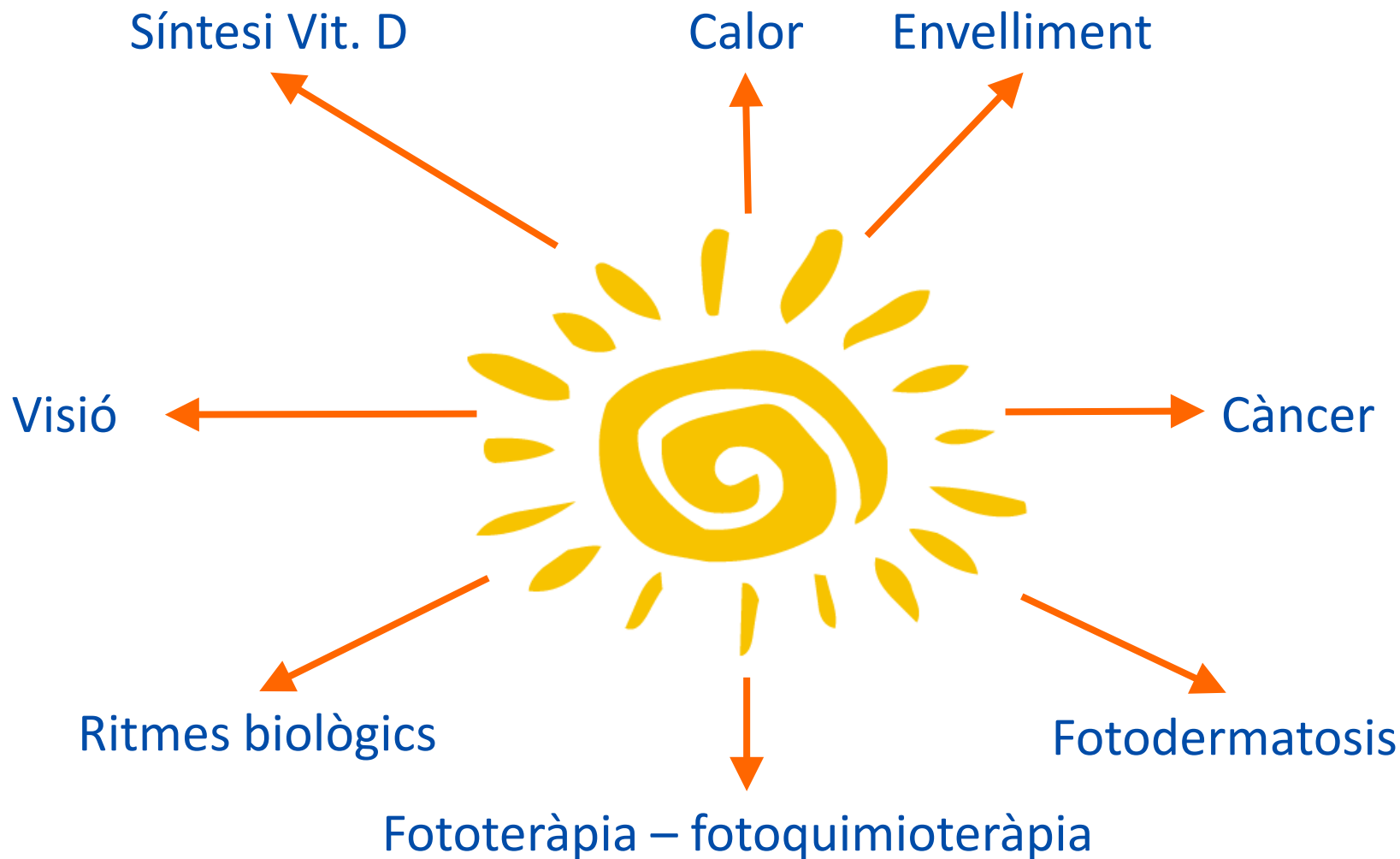
# Què tractarem?

---

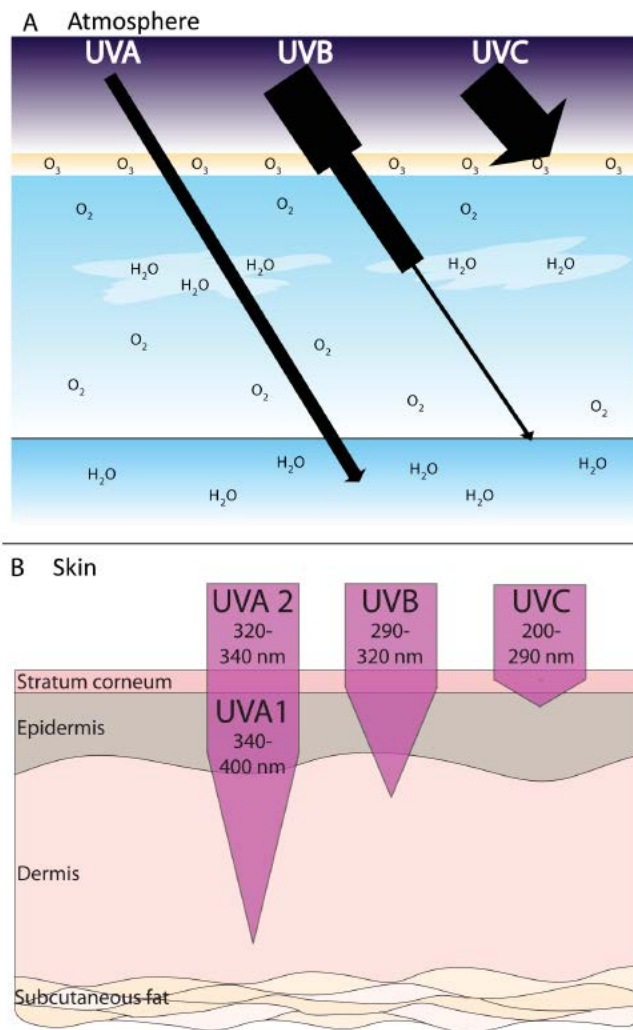
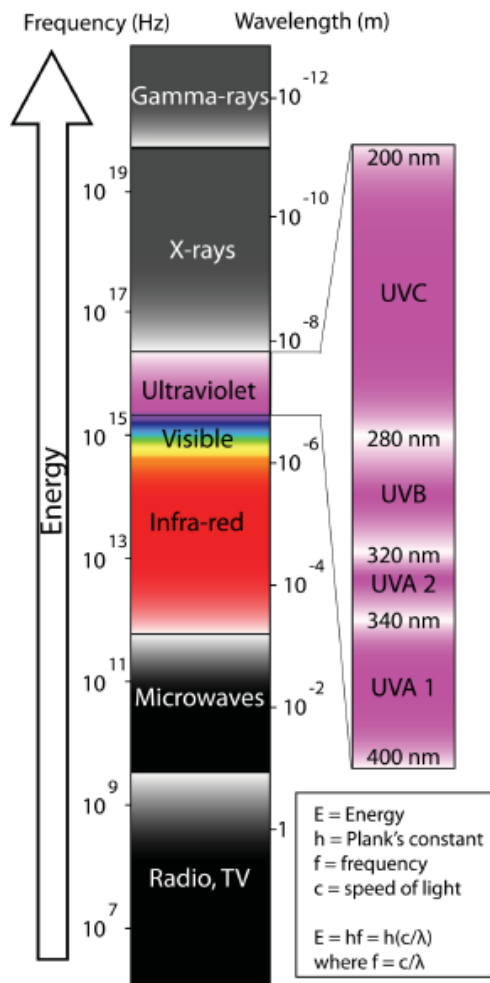
- Llum solar i efectes biològics
- Consumidors i seguretat
- Fototoxicitat
  - Assajos *in vivo*
  - Assajos *in chemico*
  - Assajos *in vitro*
- Perspectives

# Efectes biològics de la llum solar

---



# Llum solar: radiació electromagnètica



Maverakis et al., J. Autoimmun, 34: J247-J257, 2010

# Resposta a l'agressió

---

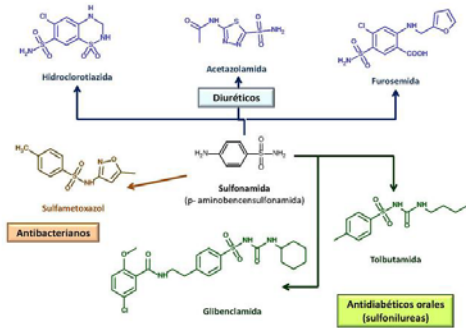


[https://www.medicinenet.com/image-collection/phytophotodermatitis\\_with\\_blisters\\_picture/picture.htm](https://www.medicinenet.com/image-collection/phytophotodermatitis_with_blisters_picture/picture.htm)

# Riscos pels consumidors

## Medicaments

Tòpics - Sistèmics



## Cosmètics



## Productos d'ús quotidià

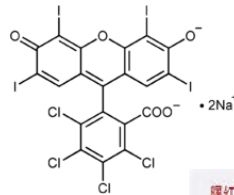
Detergents -desinfectants



## Perfums



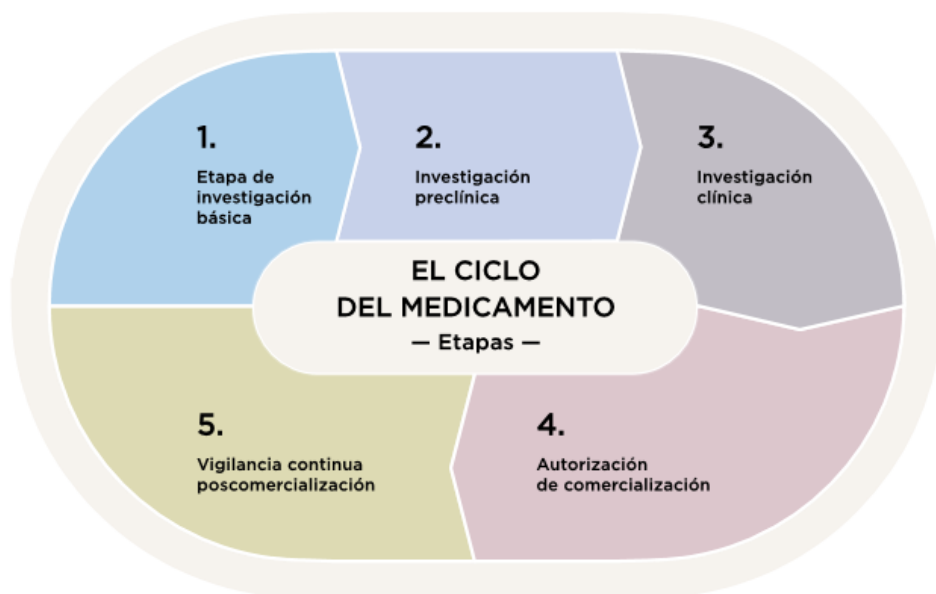
## Colorants



## Vegetals (furocumarines)







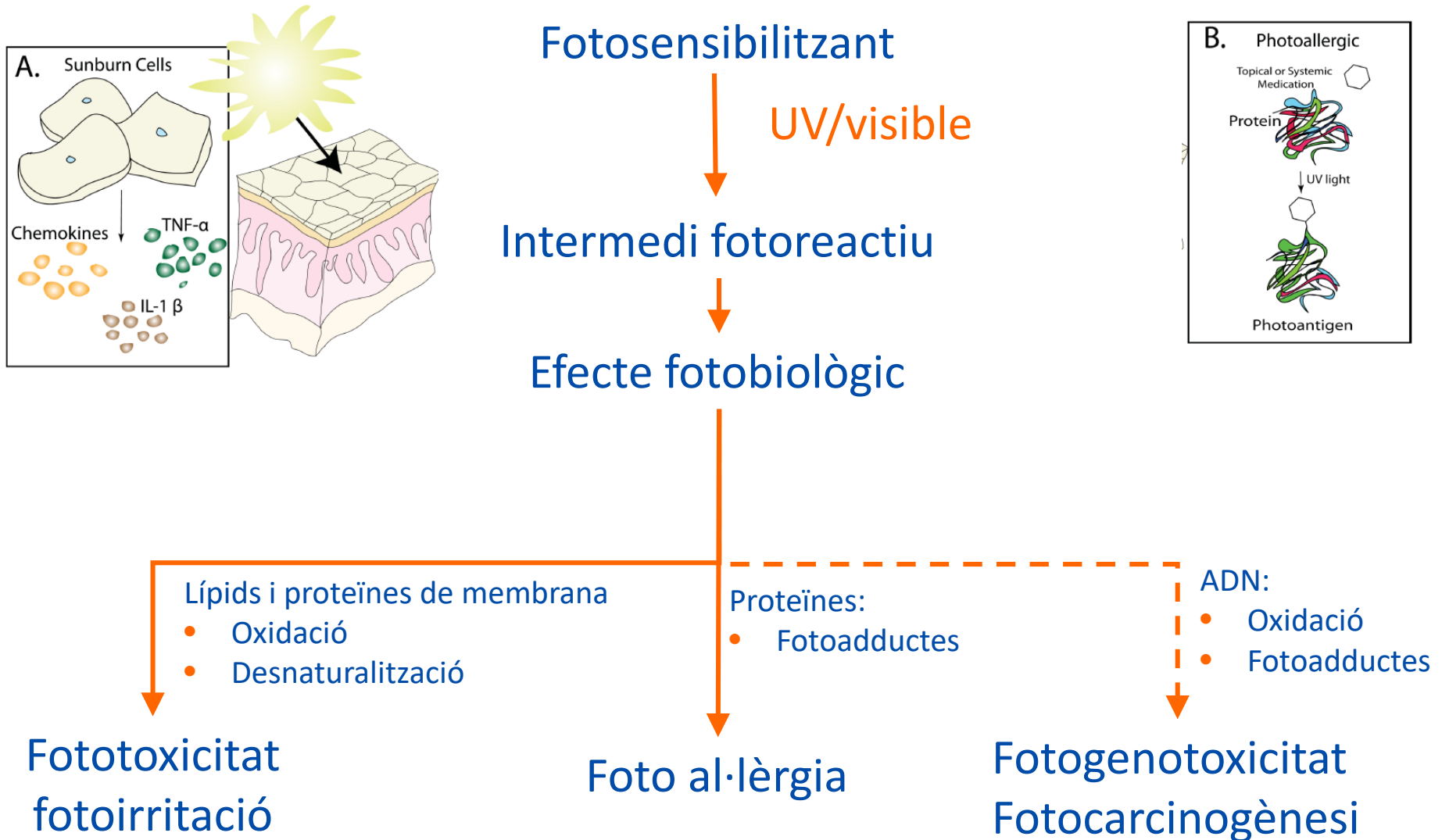
- Qualitat
- Seguretat
- Eficàcia del medicament



- Garanties de seguretat i informació al consumidor
- Composició producte cosmètic
- Avaluació de la seguretat: informe



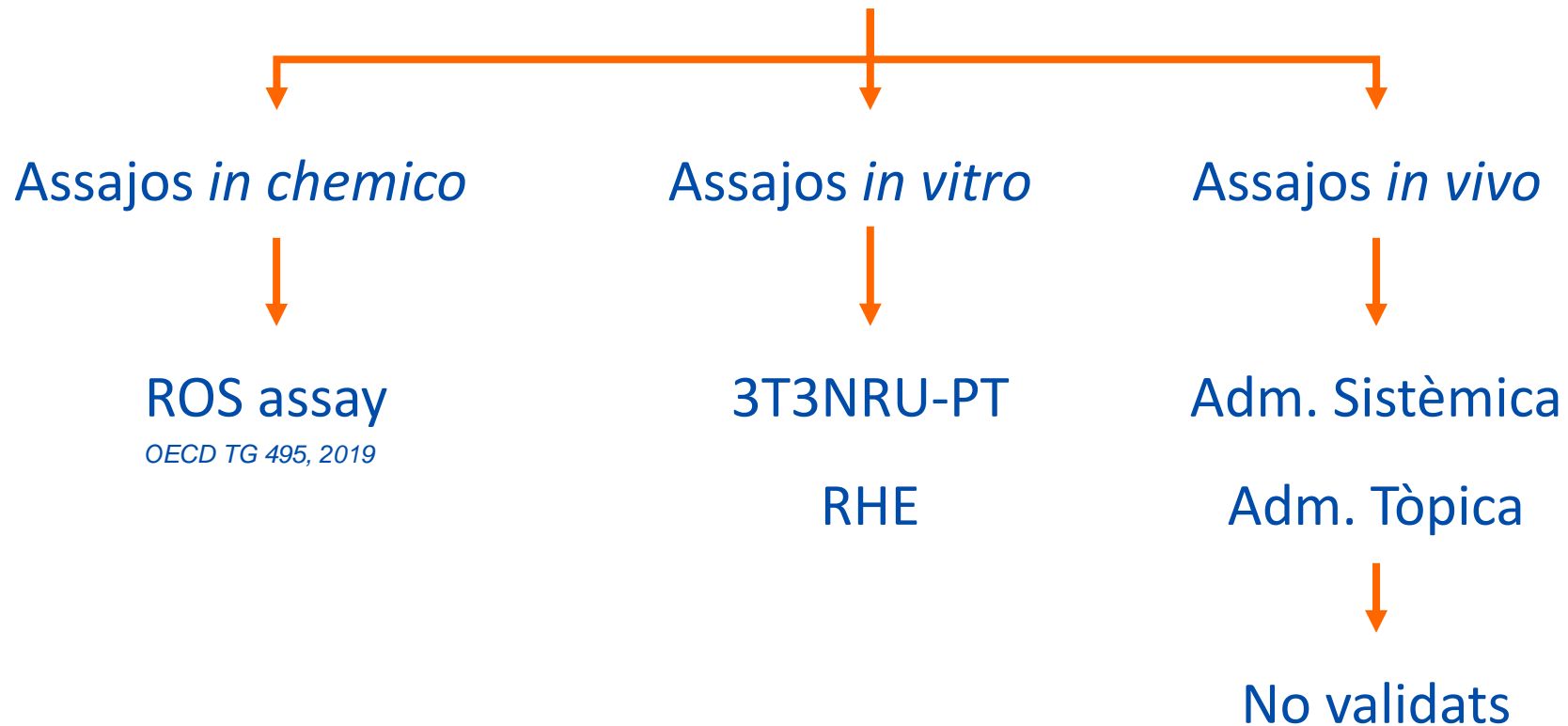
# Avaluació de la fotoseguretat: ICH S10 (2013)



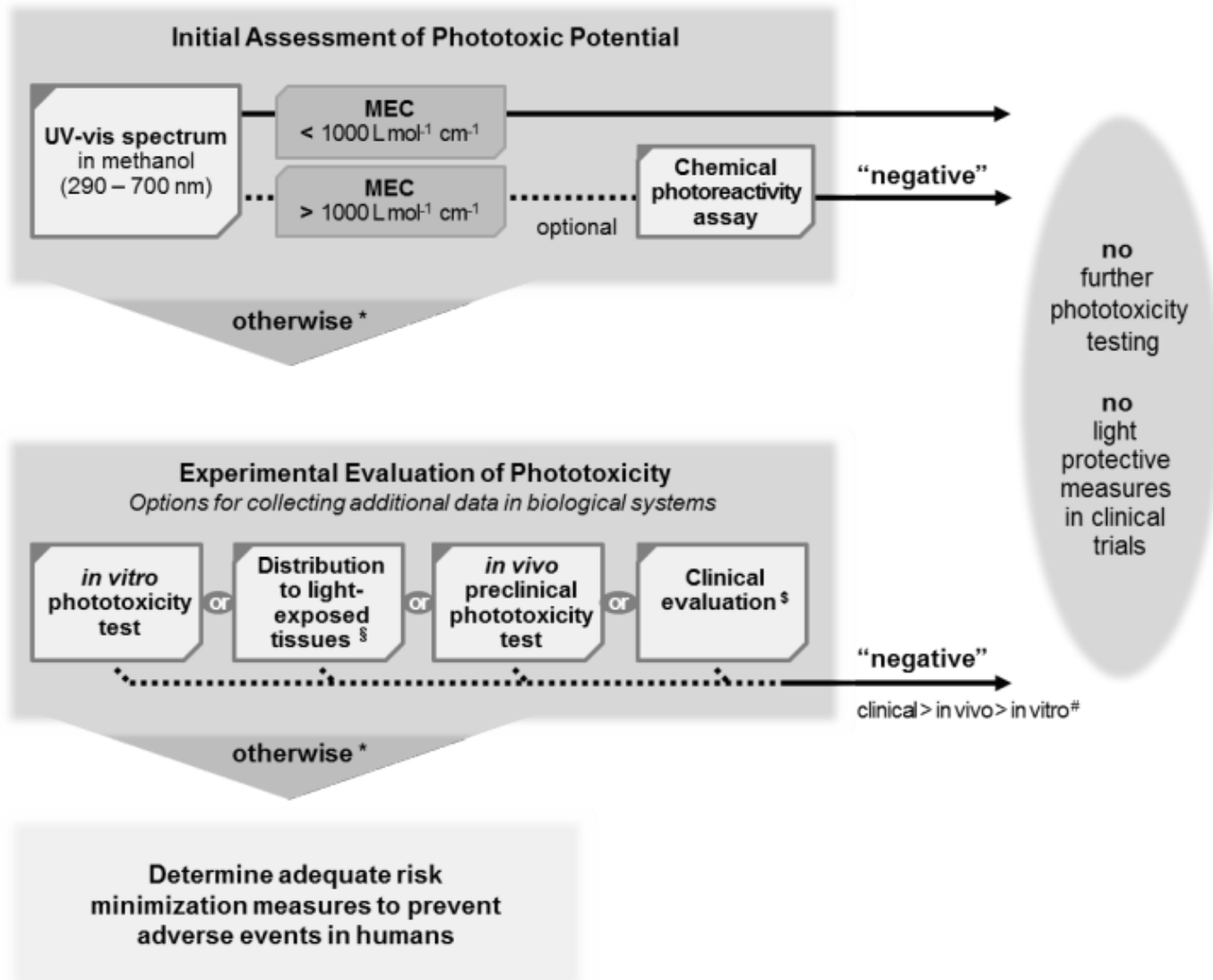


# Avaluació de la seguretat: Estudis preclínic

- Font de llum: distribució espectral, dosi i irradiació
- Dosi d'irradiació: 5-20 J/cm<sup>2</sup>



# Exemple estratègia: via dèrmica i sistèmica



ICH S10 (2013)

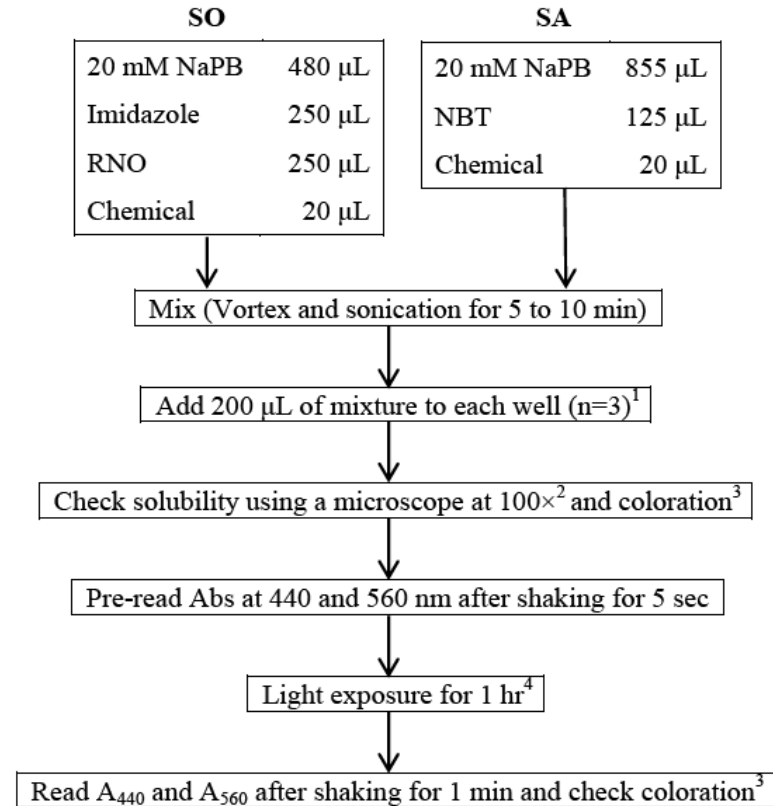
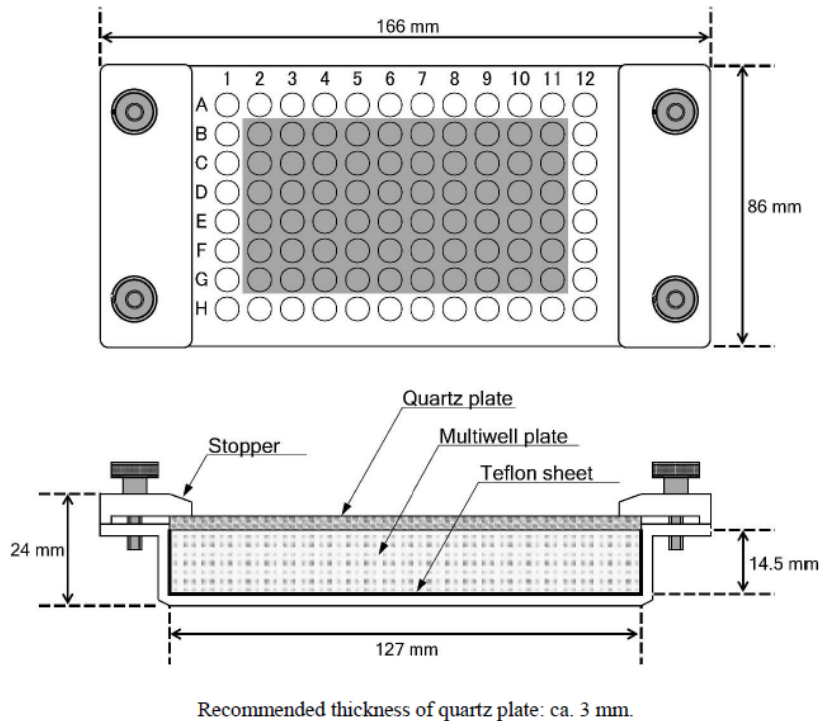
# Mètodes *in vivo* per a avaluar fotoirritació

Model Animal	Tipus d'exposició	Làmpada	Dosi (J/cm <sup>2</sup> )
Ratolí	Intraperitoneal	Llum negra, fluorescents	51,8
	Epidèrmica	Vapor de mercuri	136
	Oral	Xenó	2
		Halur metàl·lic	5-40
		Diverses	6-30
Conill	Epidèrmica	Hanovia	3,6-5,4
Humà			7,2
Rata	Epidèrmica	Monocromàtica	10,8
	Oral		
Cobai	Epidèrmica	Diverses	10

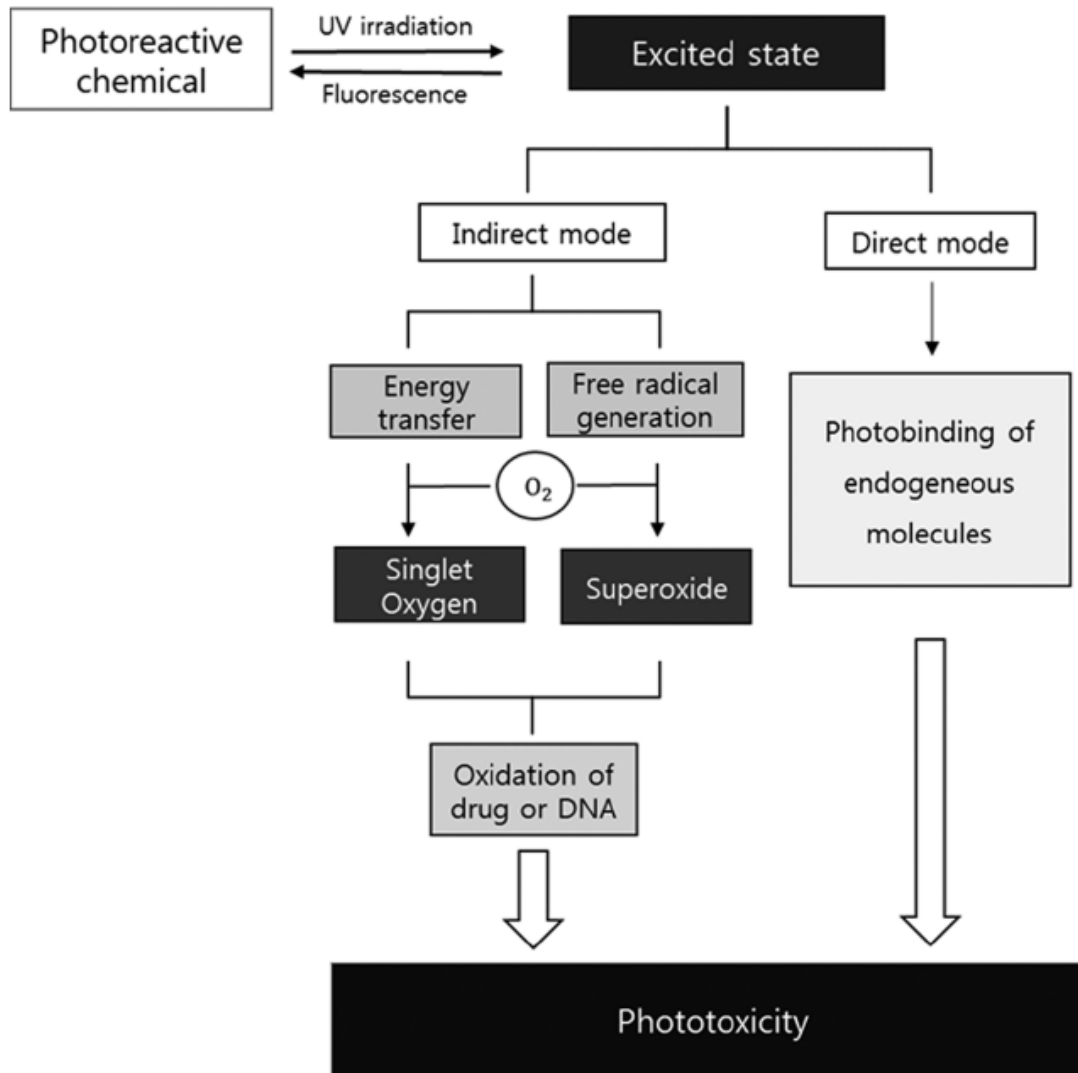
*Spielman et al., ATLA, 22: 314-348, 1994*

# Assaig de detecció de ROS

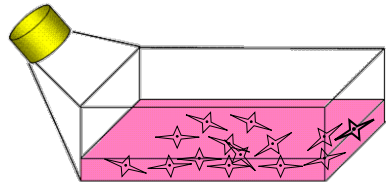
- Fotoreactivitat directa del producte: anió superòxid (SA) i oxigen singlet (SO)



# Assaig de detecció de ROS



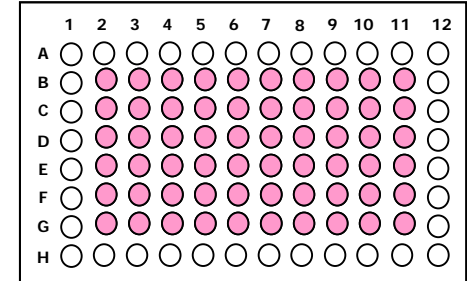
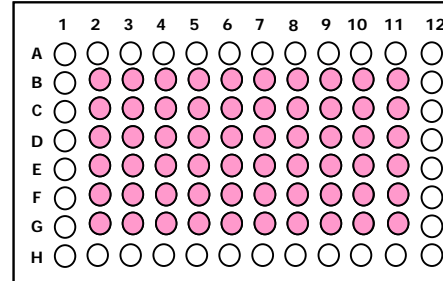
# Assaig de fototoxicitat: 3T3 NRU PT



Línia Balb c/3T3

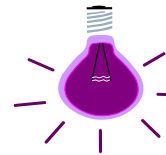
$1 \times 10^4$ /pou

24 h; 37°C; 5% CO<sub>2</sub>

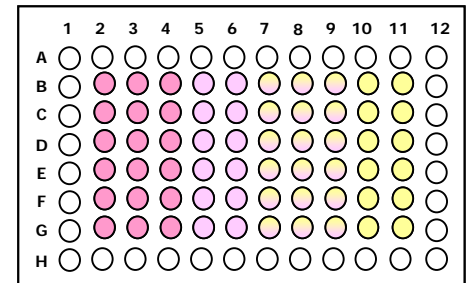
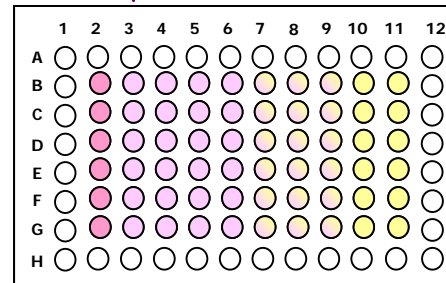


8-9 [ ]s 100 μL

60 min; 37°C; 5% CO<sub>2</sub>



5 J/cm<sup>2</sup>



Rentats; DMEM

Overnight  
37°C; 5% CO<sub>2</sub>

Làmpades:

- Simulador solar
- Filtre UVB

$$t \text{ (min)} = \frac{\text{irradiation dose (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiance (mW/cm}^2\text{)} \times 60}$$

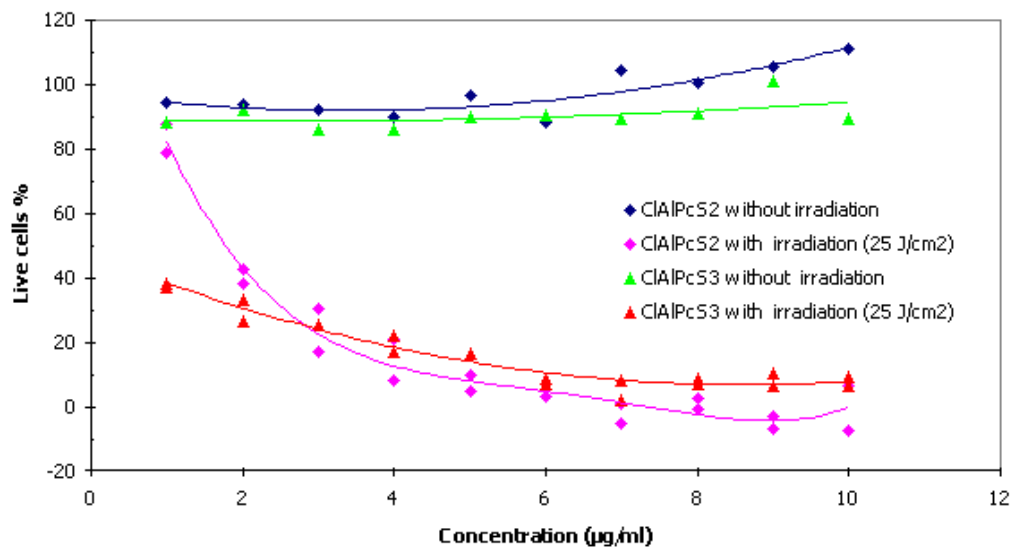
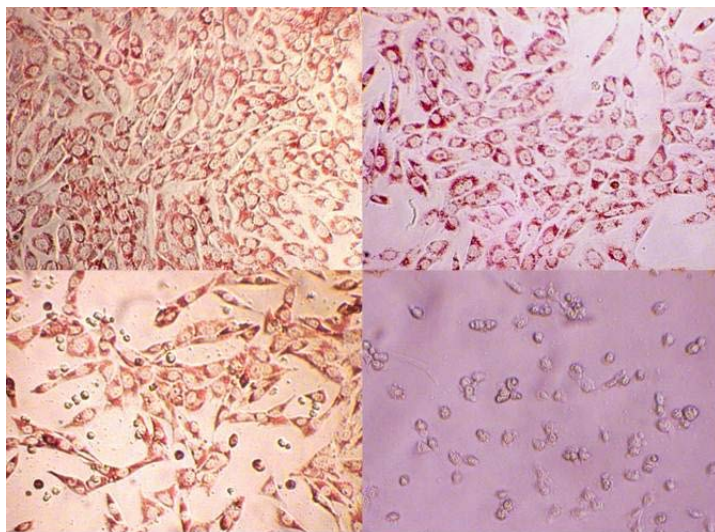
OECD TG 432, 2019

# 3T3 NRU PT: avaluació citotoxicitat

- Observació microscòpica
- Assaig del roig neutre: IC<sub>50</sub> irradiació i no irradiació
- Factor de fotoirritació

$$PIF = \frac{IC_{50} \text{ Foscor}}{IC_{50} \text{ UV}}$$

- PIF < 2 No fototòxic
- PIF > 2 i < 5 Ambigu
- PIF > 5 Fototòxic





# Limitacions de l'assaig 3T3 NRU PT

- Productes insolubles i formulacions
- Influència de la funció de barrera
- Falsos positius (>50%)

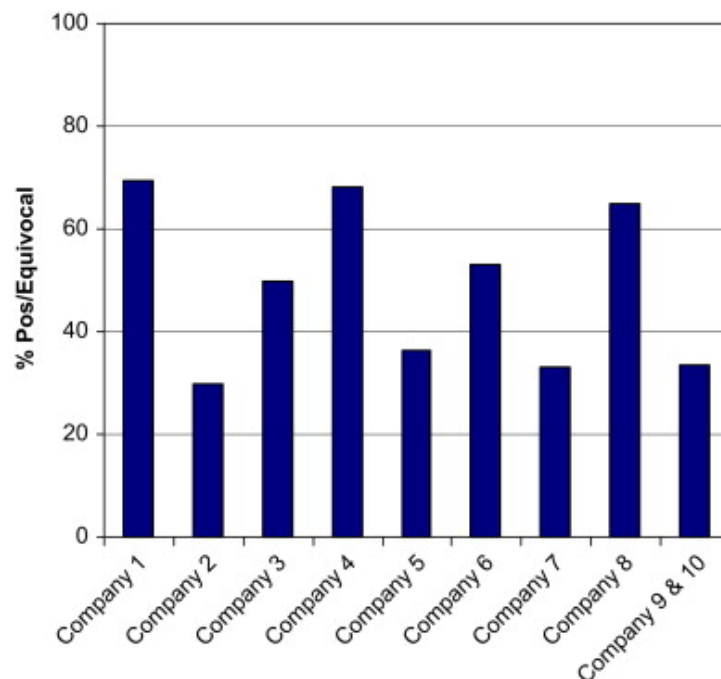
↓

Hipersensibilitat i sobrepredicció

↓

Whorshop ECVAM-EFPIA, 2012

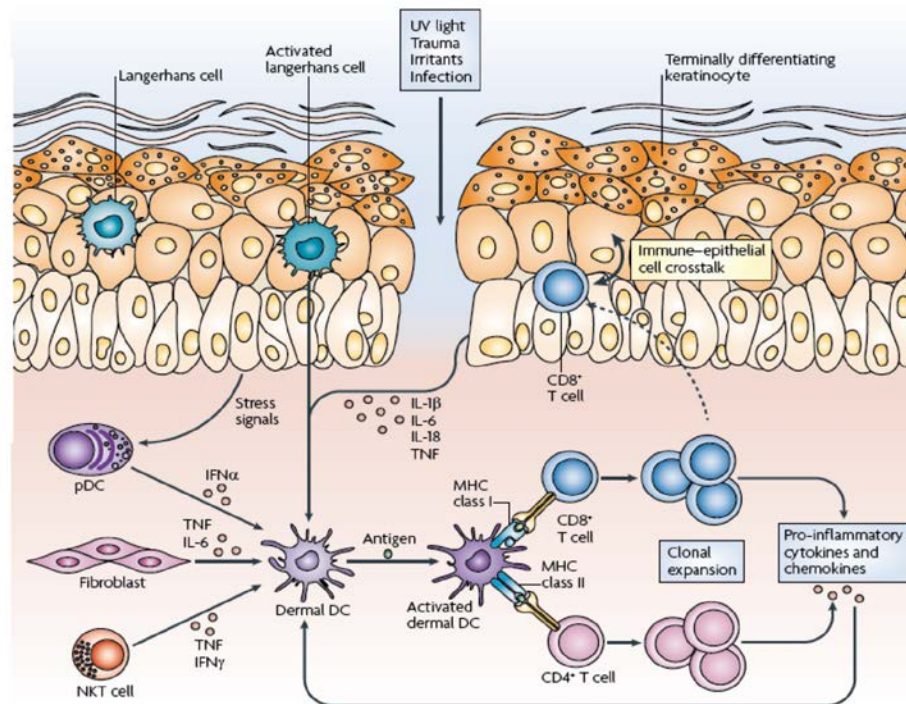
- ↓
- Màxima [ ] a assajar 100 µg/mL.
  - Resultats negatius si PIF < 5



*Lynch and Wilcox, (2011) Exp. Tox. Path.*

# Estratègies per solucionar limitacions

- Utilitzar modificacions o altres línies cel·lulars.
- Models d'epidermis reconstituïda (3D).
- Altres mètodes bastats en els mecanismes de la fototoxicitat.



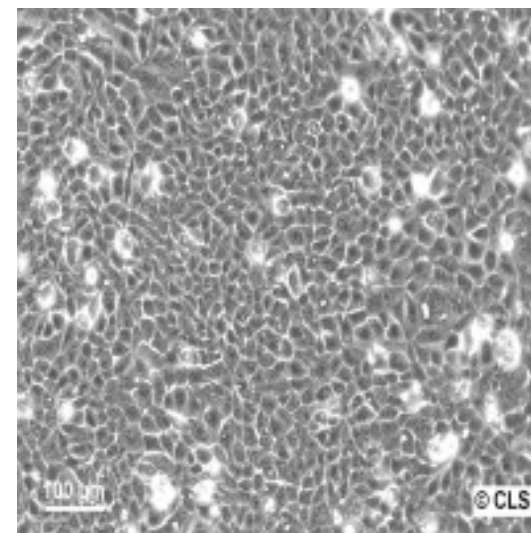
# Modificacions i altres línies

- Toyota et al., 2017: 3T3 NRU PT i DMSO com a solvent



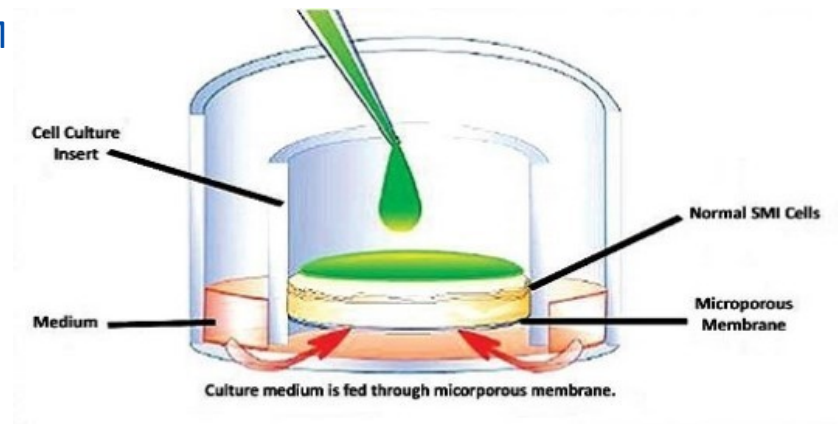
- Queratinòcits:

- Cèl·lula majoritària epidermis
- Nombrosos estudis per citotoxicitat
- Més reproductibilitat
- Avantatges tècnics
- UVB

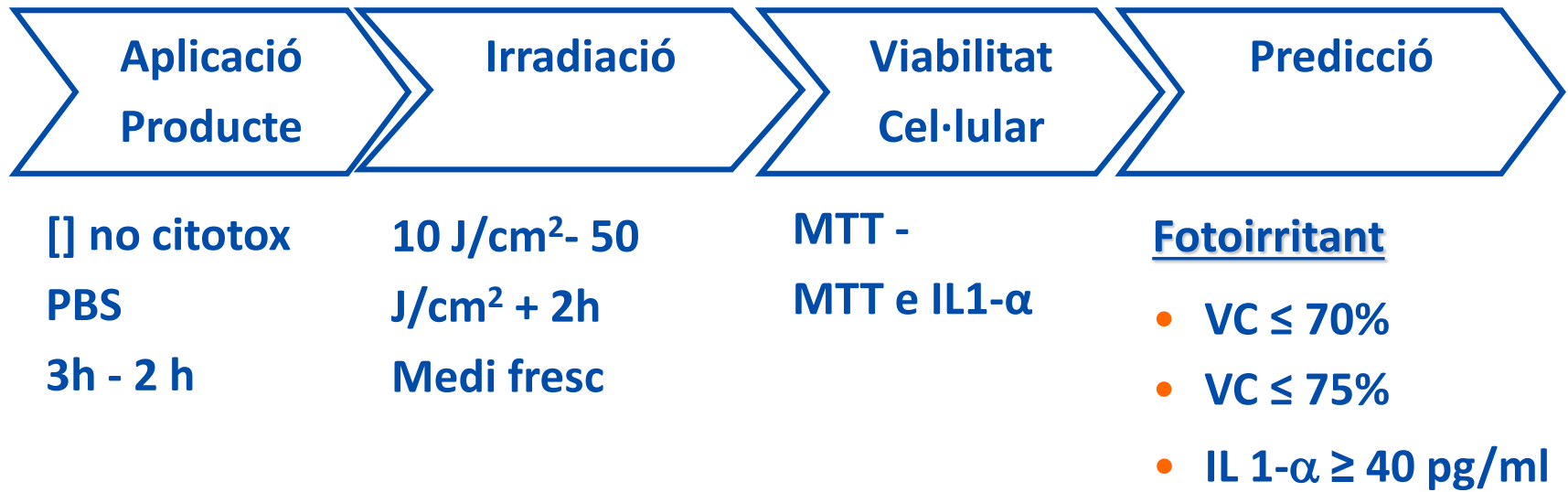


# Epidermis reconstituïda: avantatges

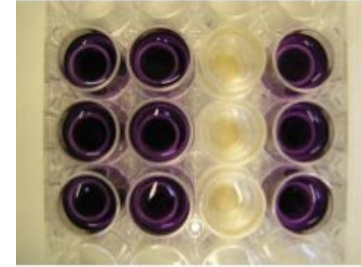
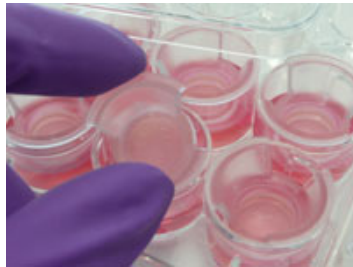
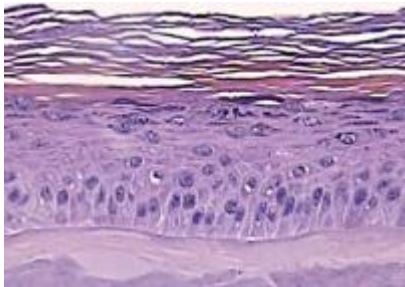
- Estrat corni
- Funció de barrera
- Aplicació tòpica
- Metabolisme
- Assaig de segon nivell
- Assajos prevalidació: Epiderm™



# Exemple de protocol



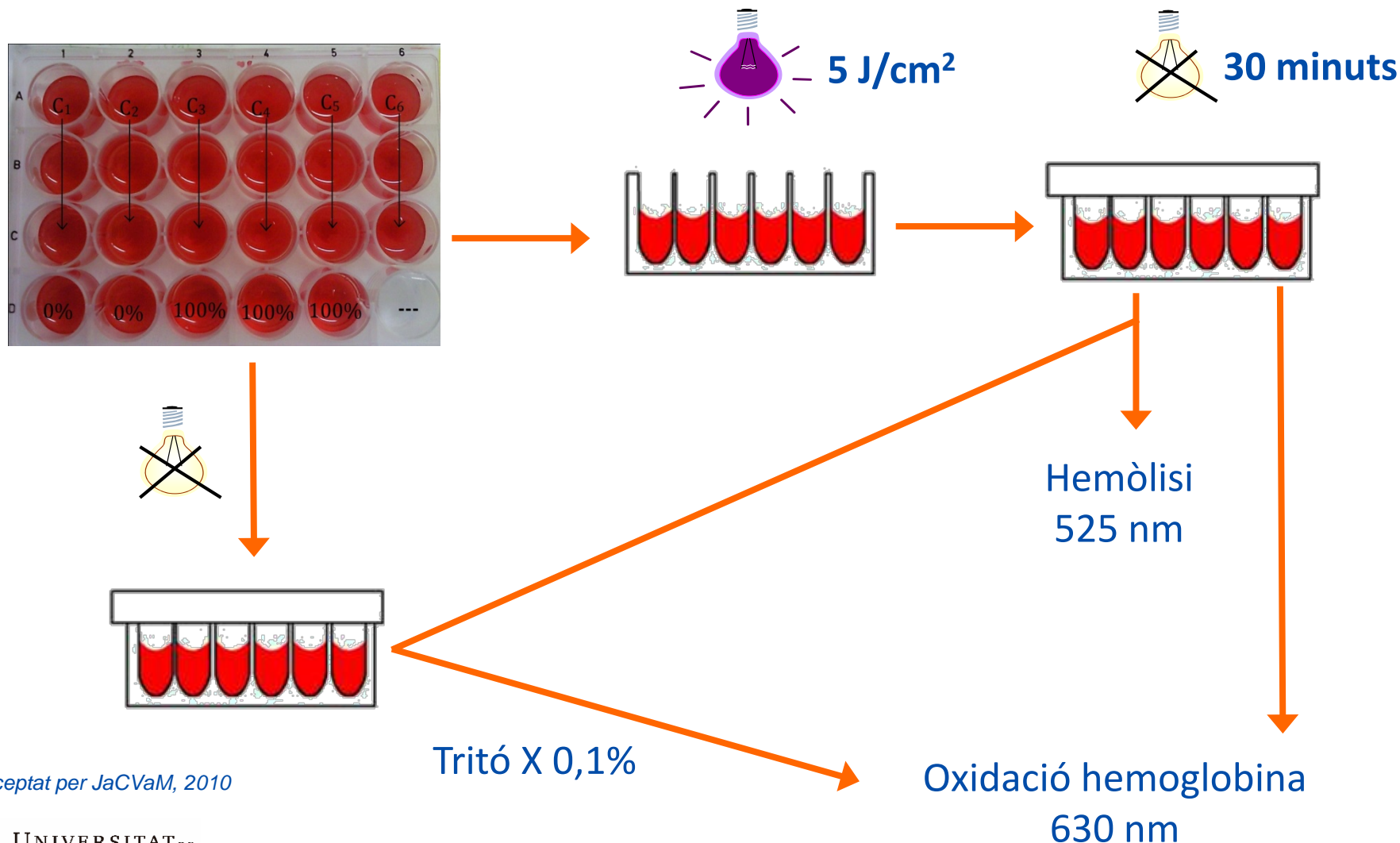
- EpidermTM (SOP procedure, 2006)
- EpiSkin<sup>LM</sup> (Lelièvre et al., Toxicol. In vitro, 2007): EPA





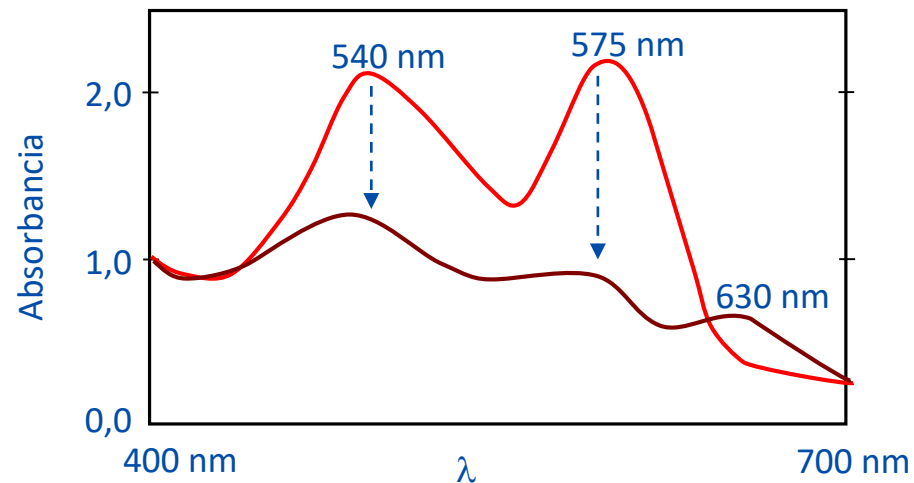
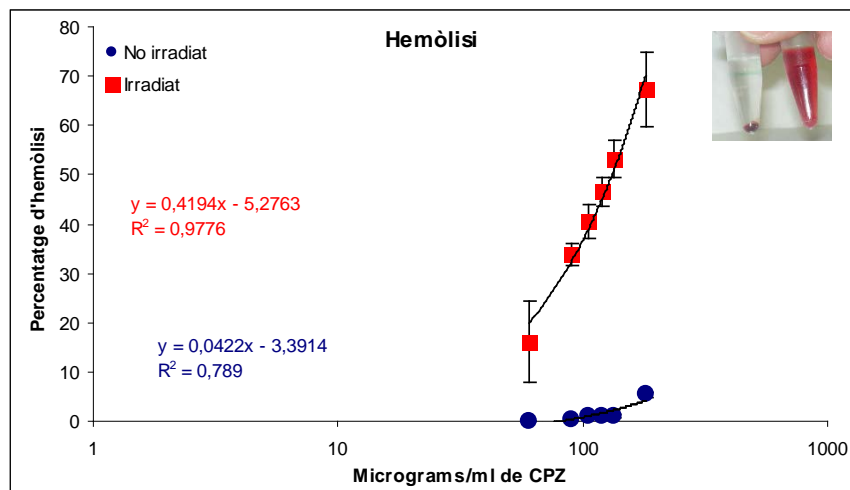
# Fotohemòlisi: membrana i proteïna

## Assaig de fotohemòlisi i oxidació de l'hemoglobina



Acceptat per JaCVaM, 2010

# Criteris de classificació del RBC PT



$$FH = \frac{CH_{50} \text{ No Irradiat}}{CH_{50} \text{ Irradiat}}$$

$$\Delta Abs = [Abs(+)-Blanc] - [Abs(-)-Blanc]$$



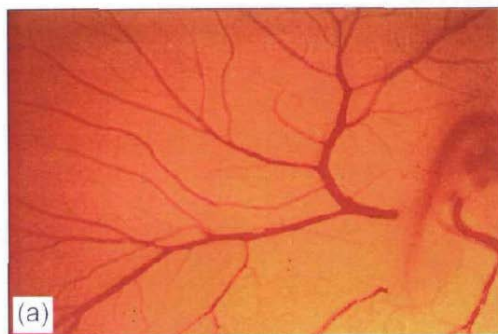


# Avantatges i limitacions

- Fàcil obtenció i manipulació de les cèl·lules
- Cribratge
- Mecanisme
- Informació sobre reaccions fotodinàmiques (I i II)
- Ràpid i fàcil
- Resistència a UVB
- Assaig vàlid
  
- Només informació a nivell de membrana



# Photo hen's egg test (Neuman et al., 1997)



Control



Prometazina

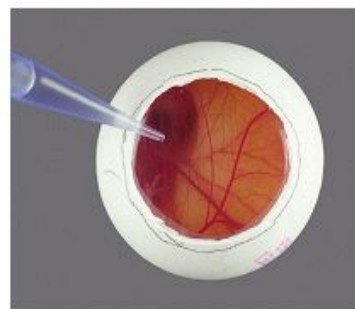


8-Metoxypsoralen

Neuman et al., *B. J. Dermatol.*, (1997).

Table 2. Photo hen's egg test. Classification of membrane discoloration and haemorrhage

Level 0 (no)	No visible membrane discoloration/haemorrhage
Level 1 (slight)	Just visible membrane discoloration/haemorrhage
Level 2 (moderate)	Visible membrane discoloration/haemorrhage, structures are covered partially
Level 3 (severe)	Visible membrane discoloration/haemorrhage, structures are covered totally

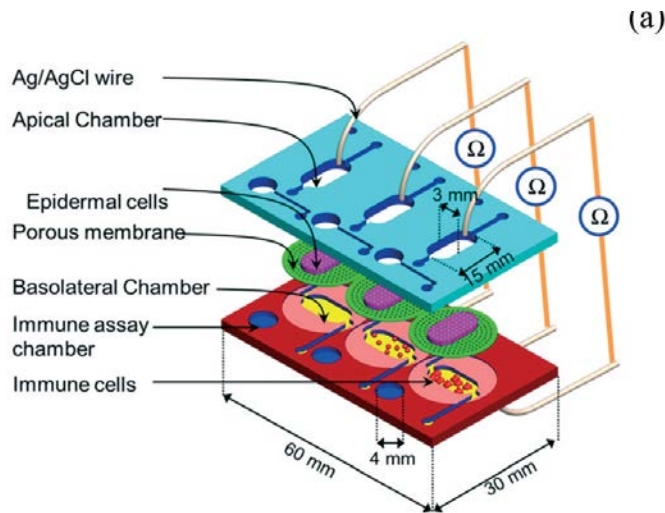
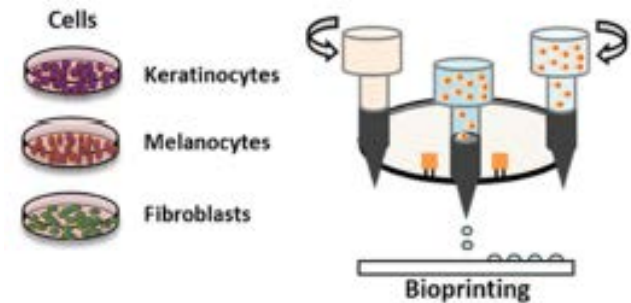


5 J/cm<sup>2</sup> UVA

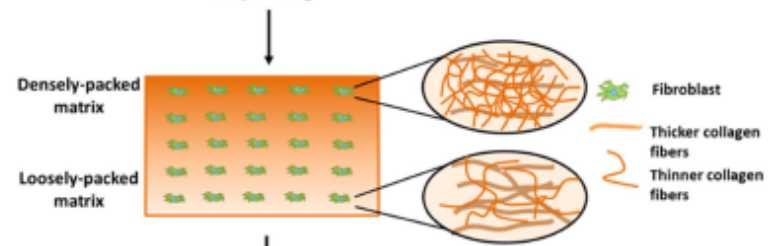
24 h

# Perspectives

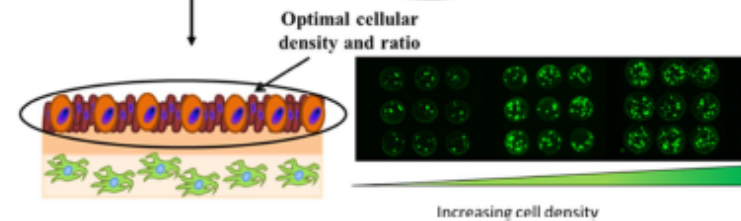
- Models 3D amb tots els tipus cel·lulars
- Utilització de noves tècniques
  - Impressió 3D
  - Skin on a chip



**Fabrication of biomimetic dermal region**



**Patterning of keratinocytes and melanocytes**



# Gràcies por l'atenció

---

