

ESTANDARIZACIÓN EN EL LABORATORIO DE ENSAYOS BIOLÓGICOS (LEBi) DEL ENSAYO OECD 442B SENSIBILIDAD DÉRMICA - NODULO LINFÁTICO LOCAL (LLNA) POR BRDU-ELISA CON LA CEPA BALB/cAnNHsdANNHSD PRODUCIDA EN LA UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Edwin León Mora¹; Luis Mariano Pacheco Salazar¹; Cristina Briones Rodriguez¹, Maripaz Castro Murillo¹, Ledis Reyes Moreno^{1,2}
¹Laboratorio de Ensayos Biológicos, ²Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica

Resumen: Los ensayos de sensibilidad dérmica se han desarrollado utilizando cobayos, como la prueba de Buehler (Buehler, 1965), para predecir el potencial alérgico de los productos químicos. Un método alternativo a este es el ensayo de nódulo linfático local (LLNA), este ensayo se basa en la proliferación de células de los ganglios linfáticos después de la aplicación tópica de una sustancia química, proporcionando no solo información sobre la capacidad de una sustancia para inducir sensibilización, sino que brinda adicionalmente datos cuantitativos que permiten la evaluación de la respuesta a la dosis. Se realizó la validación del ensayo LLNA: BrdU-ELISA usando la cepa BALB/cAnNHsd en lugar de la cepa CBA/JN siguiendo las recomendaciones del ICCVAM, utilizando 7 sustancias sensibilizantes dérmicos (SI > 1,6) y 2 sustancias no sensibilizantes dérmicos (SI < 1,6). fue posible observar que un total de 6 de 9 sustancias dieron un resultado esperado, al comparar con los resultados de la validación del ICCVAM de la cepa BALB/cAnNHsd.

Palabras clave: LLNA, Sensibilización, método alternativo, toxicología

Antecedentes: Durante muchos años, las pruebas de sensibilidad dérmica se ha desarrollado con cobayos, como la prueba de Buehler (Buehler, 1965), para predecir el potencial alérgico de los productos químicos. La prueba de sensibilidad dérmica con cobayos se basa en la medición de las reacciones cutáneas inducidas. El ensayo de ganglios linfáticos locales murinos (LLNA) es un método de ensayo de sensibilización dérmica alternativo que ofrece varias ventajas en comparación con el método con cobayos, incluidos la disminución del dolor y angustia, el uso de menos animales, menos tiempo de ejecución, entre otras. En contraste al ensayo con cobayos, la actividad en el ensayo de ganglios linfáticos locales murinos (LLNA) se mide en función de proliferación de células de los ganglios linfáticos después de la aplicación tópica de una sustancia química, proporcionando no solo información sobre la capacidad de una sustancia para inducir sensibilización, sino que brinda adicionalmente datos cuantitativos que permiten la evaluación de la respuesta a la dosis (Takeyoshi et al., 2001; ICCVAM, 2009; ICCVAM, 2010; Ulker et al., 2014).

Descripción de la investigación: En este estudio de validación se utilizaron 9 sustancias de referencia, incluidos 7 sensibilizadores de LLNA y 2 no sensibilizadores de LLNA, asimismo se probaron los disolventes o vehículos, para las sustancias ensayadas. Las 9 sustancias de referencia forman parte de las 43 sustancias que se utilizaron en el estudio formal de validación ICCVAM (Comité Coordinador Interinstitucional para la Validación de Métodos Alternativos) para el LLNA: BrdU-ELISA utilizando ratones CBA/JN (ICCVAM, 2010a).

Se utilizaron 52 ratones BALB/cAnNHsdAnNHsd hembras de 8-10 semanas de edad, estos fueron divididos en 4 animales por grupo, del Área de Producción Animal del Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica. Todos los procedimientos relacionados con el uso y manejo de animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales de la Universidad de Costa Rica (CICUA-044-2019)

Resultados:

Cuadro 1. Determinación de potencial sensibilizador (SI < 1,6 No sensibilizante; SI > 1.6 sensibilizante).

Sustancia	IBdU	IBrdU Veh.	Veh.	SI exp.	SI lit.
Alcohol Cinámico (+)	0.746	0.734	AOO	1,02	>1,6
Mercaptobenzotiazol (-)	1.351	0.509	DMF	2,65	>1,6
Fenil Benzoato (+)	1,521	0.509	DMF	2,99	>1,6
Eugenol (+)	1.461	0.734	AOO	1,99	>1,6
Cloruro de cobalto (+)	1,944	0,228	DMSO	8,53	>1,6
Formaldehido (+)	0,318	0,006	ACE	51,8	>1,6
Propilenglicol 50 % (+)	0,497	0,734	AOO	0,677	>1,6
Propilenglicol 10 % (-)	0,305	0,158	AOO	1,94	<1,6
Glicerol (-)	0,128	0,509	DMF	0,250	<1,6

A OO: (acetona: aceite de oliva (4:1))

DMF: N,N Dimetilformamida

ACE: Acetonitrilo

DMSO: Dimetilsulfóxido

+: Sensibilizante

-: No sensibilizante

Es importante indicar que los resultados que no se ajustaron a lo esperado fueron principalmente en los que se utilizó la mezcla Acetona y Aceite de Oliva (AOO) esto podría deberse a la calidad del aceite de oliva utilizado que fue de calidad industrial y no grado patrón, por lo que podría ser este un factor importante por el cual no hubo congruencia en los datos esperados.

Conclusiones y discusión: Hay concordancia entre los valores obtenidos en la cepa BALB/cAnNHsd y la cepa CBA/JN para la sensibilización dérmica.

Es necesario aumentar la cantidad de sustancias no sensibilizantes para tener una validación mas robusta de la cepa.

El uso de sustancias calidad reactivo es fundamental para la reproducibilidad de los resultados

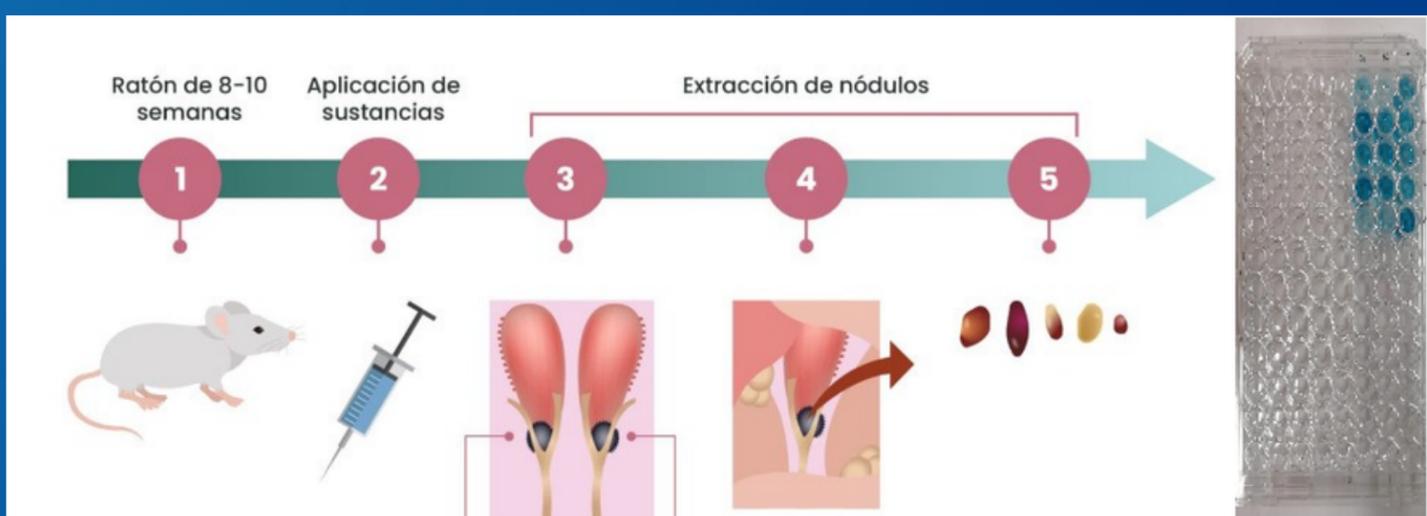


Figura 1. Resumen metodología LLNA