



302827 N:17
2Ej.

UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

**ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.**

**EVALUACION DE METODOS IN VITRO PARA
DETERMINAR IRRITACION OCULAR E IRRITACION
DERMICA PRIMARIA POR EL USO DE
PRODUCTOS COSMETICOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
DANIA LARISA PARRA GONZALEZ

MEXICO, D. F.,

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Página

CAPITULO I INTRODUCCION	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Objetivos	4
1.3 Hipótesis	4
CAPITULO II ANTECEDENTES	5
2.1 Descripción de la anatomía y fisiología ocular	6
2.2 Descripción de la anatomía y fisiología cutánea ...	8
2.3 Generalidades de los métodos <u>in vivo</u>	10
2.4 Generalidades de los métodos <u>in vitro</u>	13
2.4.1 Clasificación	14
2.5 Selección de los Métodos <u>in vitro</u>	18
2.6 Prueba de la Membrana Corioalantóica (HETCAM)	19
2.6.1 Fisiología de la Membrana Corioalantóica ...	19
2.7 Ensayo en Células Rojas de Sangre (RBC)	23
2.8 Análisis Químico (Sistema EYTEX)	28
2.8.1 Generalidades del Sistema EYTEX	28
2.8.2 Antecedente	27
2.8.3 Base Científica del Mecanismos del Sistema EYTEX	28
2.8.4 Configuración actual del Sistema EYTEX	32
2.8.5 Descripción de los protocolos	34
2.8.5.1 Protocolo Estándar (STD)	34
2.8.5.2 Ensayo de Partición de Membrana (MPA)	34
2.8.5.3 Ensayo Alcalino de Membrana (AMA)..	35
2.8.5.4 Ensayo Rápido de Membrana (RMA)...	36
2.8.5.5 Ensayo de Membrana Vertical (UMA)..	36
2.8.5.6 Ensayo de Alta Sensibilidad (HSA)..	37
2.8.6 Modificaciones de los Protocolos	37
2.8.7 Aplicación del Sistema EYTEX	39
2.8.8 Ventajas y Desventajas del Sistema EYTEX....	41
2.9 Análisis Químico (Sistema SKINTEX)	42
2.9.1 Generalidades sobre irritación dérmica.....	42

2.9.2	Antecedentes	43
2.9.3	Base Científica del Mecanismos del Sistema SKINTEX	44
2.9.4	Sistema de Evaluación	45
2.9.5	Configuración del Sistema SKINTEX	46
2.9.6	Descripción de los Protocolos	47
	2.9.6.1 Ensayo de Membrana Vertical (UMA)..	47
	2.9.6.2 Ensayo Alcalino de Membrana (AMA)..	47
	2.9.6.3 Ensayo de Alta Sensibilidad (ESA)..	47
	2.9.6.4 Ensayo de Respuesta Humana (HRA)..	48
2.9.7	Aplicación del Sistema SKINTEX	48
CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL		50
3.1	Diagrama de flujo de irritación ocular	50
	3.1.1 Diagrama de flujo de irritación dérmica	51
3.2	Material, Reactivos y Equipo	52
3.3	Metodología	53
	3.3.1 Pba. de la Membrana Corioalantóica (HETCAM)..	54
	3.3.2 Ensayo en Células Rojas de Sangre (RBC)	56
	3.3.3 Ensayo de Desnaturalización de Proteínas (EYTEX)	59
	3.3.3.1 Protocolo Estándar (EYTEX-STD) ...	59
	3.3.3.2 Protocolo Ensayo en Membrana de partición (EYTEX-MPA)	61
	3.3.3.3 Protocolo Ensayo en Membrana Rápida (EYTEX-RMA)	62
	3.3.4 Ensayo Membrana Reactivo (SKINTEX)	65
3.4	Análisis Estadístico	67
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION		68
4.1	Resultados de Irritación Ocular	68
	4.1.1 Resultados de la Prueba de la Membrana Corioalantóica (HET-CAM)	68

	Página
4.1.2 Resultados del Ensayo en Células Rojas de Sangre (RBC)	71
4.1.3 Resultados del Ensayo de Desnaturalización de Proteínas (BYTEX)	76
4.1.4 Análisis Estadístico	82
4.1.5 Discusiones	86
4.2 Resultados de Irritación Dérmica	87
4.2.1 Resultados del ensayo membrana reactivo (SKINTEX)	87
4.2.2 Análisis Estadístico	93
4.2.3 Discusiones	94
CAPITULO V CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFIA	97

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

El ojo es uno de los órganos sensoriales mas valioso y vulnerable y cualquier riesgo de alteración de la visión o de daño ocular, por la acción de productos químicos o agentes físicos, debe eliminarse. Consecuentemente, durante muchos años, la evaluación total de las propiedades toxicológicas de los agentes químicos han incluido la evaluación de su potencial para dañar el tejido ocular después de haber tenido un contacto directo con ellos.

Las pruebas de Draize Kelly para medir el grado de irritación de los ojos de los conejos y la irritación dérmica primaria, publicadas originalmente en 1944, han sido ampliamente usadas por los toxicólogos como un medio para evaluar el potencial de los agentes químicos de dañar el ojo y la piel humana. Sin embargo, en el contexto del debate sobre alternativas a prueba con animales, los procedimientos han recibido críticas muy fuertes por parte de científicos, agencias reguladoras y sociedades protectoras de animales. Esto ha estimulado la búsqueda de técnicas in vitro.

A su vez, la piel es una membrana externa que actúa como barrera natural del cuerpo, siendo una de sus principales funciones la de protección, para lo cual es esencial su buen funcionamiento e integridad; por lo tanto, es indispensable que los productos empleados para su cuidado o aquellos que de algún modo estén en contacto con ella no produzcan ningún tipo de irritación.

La irritación dérmica primaria es un fenómeno complejo que envuelve parámetros físico-químicos y bioquímicos. La irritación dérmica se evalúa por observación de cambios visibles que van desde el eritema y edema, hasta la corrosión y ulceración.

En los años 70s se vió incrementada la preocupación del público en general acerca del uso indiscriminado de los animales en pruebas de laboratorio para investigaciones biomédicas y pruebas de toxicidad; por ejemplo: la prueba de DL 50 y la prueba de irritación dérmica y ocular de Draize Kelly.

En 1969 se fundó **FRAME** (Fundación para el Reemplazo de Animales en Experimentos Médicos), con la creencia de que el único camino para resolver las demandas era reducir los ensayos en animales, promocionando las tres Rs (reducción, refinamiento, reemplazo), concepto de alternativas y fomentando el conveniente desarrollo, validación, evaluación y aceptación de lo que ahora se conoce como "alternativas de reemplazo", procedimientos que proporcionan información científica esencial, pero sin recurrir al empleo de animales vivos.

El concepto de alternativas es aceptado ampliamente y hay nuevas leyes en países Europeos y en la Comunidad Europea (CE); estas leyes requieren que el número de animales empleados se reduzca, que los procedimientos se refinen para que toda causa de sufrimiento pueda minimizarse y que existan técnicas alternativas que se empleen siempre que sea posible. Los científicos, las industrias y el gobierno tienen la obligación moral de buscar caminos para lograr estas metas.

Posteriormente se estableció **ERGATT** (Grupo de Investigación Europeo para Alternativas en Pruebas de Toxicidad) el cual, junto con **FRAME** y con el apoyo de la CE, ha establecido el único banco de datos, el cual intenta proporcionar información técnica de nuevos métodos en el curso de desarrollo y validación.

Desde 1981, la **CTFA** (Asociación de Cosméticos, Productos de Tocador y Fragancias), se ha enfocado a buscar alternativas para los métodos in vivo, por lo que financió la fundación del Centro Universitario John Hopkins para alternativas en pruebas animales. En 1988 anunció un nuevo programa enfocado a pruebas "In Vitro" desarrolladas o financiadas por compañías miembros de la sociedad.

Por lo tanto, la evolución de la seguridad de los productos cosméticos ha entrado a una nueva era. Las pruebas de seguridad con modelos animales han sido reemplazadas por base de datos de computación, métodos in vitro, pruebas humanas de premercado más extensas, y el fallo de científicos expertos basado en la seguridad individual de los ingredientes contenidos en productos cosméticos.

En base a todo lo anterior, resulta interesante llevar acabo evaluaciones científicas para determinar y comparar la capacidad de las pruebas in vivo de Draize con la capacidad de los métodos in vitro para predecir las respuestas humanas.

1.2 OBJETIVOS

* Llevar a cabo una evaluación de métodos in vitro para la determinación de irritación dérmica y ocular.

* Con los resultados arrojados por el estudio se procederá a efectuar un análisis de estos, comparándolos con los resultados ya establecidos por el método in vivo.

* En base al análisis de resultados, determinar si los métodos in vitro con los que se trabajó son comparables con el método in vivo.

1.3 HIPOTESIS

Comprobar que los métodos in vitro son cuantitativos y reproducibles, y que en base a esto superan las dos limitaciones científicas de los métodos in vivo y, por lo tanto, pueden ser el fundamento para un amplio programa de evaluación de la seguridad, debido a que puede realizarse una evaluación más precisa.

Hipótesis nula (H₀)

Los métodos in vitro proporcionan una evaluación más precisa en comparación con los métodos in vivo en la determinación de irritación ocular y dérmica de productos cosméticos.

C A P I T U L O I I

ANTECEDENTES

Este siglo ha visto el crecimiento rápido de la evaluación de la seguridad, en un inicio, las cosas eran "a riesgo del comprador". En 1800, empezó a aplicarse una mayor presión a las compañías para garantizar la calidad y seguridad de sus productos, primero a través de leyes estatales y posteriormente federales, inicialmente, se cubrió la seguridad en alimentos. Fue en 1938 cuando se creó la F.D.A (Food and Drug Administration) a raíz de la aparición de un tinte para pestañas hecho a base de alquitrán de carbón que provocó inicialmente ligeras intolerancias en algunos consumidores, pero posteriormente surgieron serios problemas de dermatitis alrededor de los ojos y terminó con una mujer que perdió la vista de ambos ojos y otra que, después de varias semanas de intensos dolores, finalmente murió. Estas leyes federales se aplicaron rápidamente a los medicamentos y a los cosméticos, ya que la disposición del consumidor cambió de la aceptación del "riesgo del comprador" a exigir leyes para obtener productos seguros y efectivos.

(2,31)

Con el paso del tiempo creció la preocupación por la seguridad y aumentaron simultáneamente los conocimientos científicos y la capacidad de reconocer efectos aún más sutiles en el organismo. Esta etapa de desarrollo culminó cuando se estableció una lista de pruebas para comprobar la calidad y seguridad de los productos denominada "lista de comprobación" a finales de la década de los 60 e inicio de los 70.

Posteriormente surgieron preguntas sobre el valor de las pruebas que estaban siendo efectuadas en relación con los costos, en términos de recursos animales y humanos. En este escenario nació la inquietud de la industria de cosméticos sobre el uso innecesario de animales.

(31)

2.1 DESCRIPCION DE LA ANATOMIA Y FISIOLOGIA OCULAR

En las pruebas in vivo para determinar la irritación ocular se estudian tres diferentes tejidos: la conjuntiva de los párpados, la superficie de la córnea y la estructura y funcionalidad del iris, por lo tanto nos enfocaremos a la anatomía y fisiología de dichos tejidos.

(32)

La vista es el sentido que reside en los globos oculares, alojados en las cavidades que llevan el nombre de órbitas oculares. Los glóbulos oculares están protegidos por las membranas movibles llamadas párpados, sin embargo se encuentran parcialmente expuestos a las influencias externas a través de las hendiduras palpebrales.

Forrando las partes internas de los párpados y las externas de los globos oculares se encuentra la membrana conjuntiva, que es una delgada capa de células que sirve de protección. La membrana conjuntiva recibe diferente nombre en base a la parte del ojo que cubre y protege. Así se dice:

- * Conjuntiva palpebral a la parte de dicha membrana que forra el interior del párpado.
- * Conjuntiva ocular a la parte de dicha membrana que forra el globo ocular.

En el fondo de los párpados se encuentran los fondos de saco conjuntivales, que son los sitios donde la conjuntiva palpebral se repliega para convertirse en conjuntiva ocular.

La inflamación de la conjuntiva se llama conjuntivitis y cuando ésta ocurre, los vasos sanguíneos de la conjuntiva permiten un mayor flujo sanguíneo, observándose enrojecimiento de la misma y trayectos venosos de color rojo. Las causas más frecuentes de conjuntivitis son las infecciones bacterianas, las virales, el contacto con sustancias alergénicas, traumatismos físicos y la exposición a agentes químicos.

El globo ocular está constituido por un conjunto de membranas en cuyo interior se encuentran los medios transparentes.

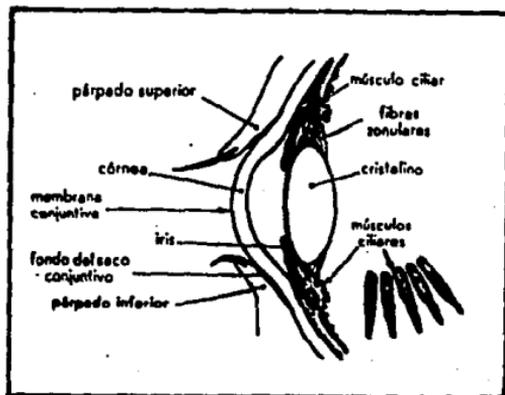
Las membranas que forman el globo ocular son tres básicamente:

1. Esclerótica (de tejido fibroso)
2. Coroides (membrana vascular)
3. Retina (membrana nerviosa)

La esclerótica es una membrana de color blanco que envuelve el globo ocular, dejando en la parte de atrás un orificio por donde pasa el nervio óptico, por delante se hace transparente y forma la córnea, la cual permite ver a través de sí misma al iris que es un disco vertical en cuyo centro se encuentra un orificio denominado pupila.

(20,46)

Fig. 1 PRINCIPALES TEJIDOS DEL OJO



2.2 DESCRIPCION DE LA ANATOMIA Y FISIOLOGIA CUTANEA

La piel es una membrana exterior que consiste en tejidos unidos estructuralmente y que sirve como frontera entre el resto del organismo y el medio exterior.

Es una membrana muy importante, ya que actúa como barrera natural del cuerpo, siendo una de sus principales funciones la de protección, pero es mucho más que eso, posee funciones de absorción, secreción, excreción, información sensorial, regulaciones térmica y glucídica, pigmentación y regulación de los procesos inmunológicos.

(46)

La piel consta de varias capas de función y estructura distintas:

- * La epidermis es la capa más externa, relativamente deshidratada y avascular. Impide la fuga de agua, electrólitos, sustancias y a su vez protege de la penetración de agua y sustancias extrañas.
- * La dermis es la zona de soporte y anclaje de la epidermis. Esta constituida por vasos sanguíneos y linfáticos, folículos pilosos, órganos nerviosos, glándulas sebáceas y sudoríparas.
- * La hipodermis posee discreta vascularización, siendo, de manera primordial, una capa grasa. Actúa como aislante térmico y absorbente mecánico de choque.

La epidermis es la capa de mayor interés, ya que representa una barrera natural que limita la penetración de químicos a la dermis.

Esta constituida por varias capas:

- * El estrato córneo es una capa formada por células aplanadas, muertas, constituidas por una cubierta de queratina que rodea a una porción central de grasa. Estas células se encuentran entrelazadas entre sí, formando escamas, las cuales se desprenden constantemente y son reemplazadas por nuevas células que provienen de las capas más internas.

- * El estrato lúcido es una capa formada por células aplanadas, sin núcleo y que llevan a cabo una gran actividad queratogénica.
- * El estrato granuloso es una capa formada por células aplanadas que presentan signos de degeneración córnea, retracción nuclear y una intensa actividad queratogénica.
- * La capa mucosa o de Malpighi esta constituida por células gruesas, columnares, unidas por fibrillas, lo cual les da cohesión, resistencia y elasticidad a las acciones del exterior.
- * La capa germinativa es la capa donde ocurre la reproducción celular y en ella se generan células que, después de pasar por una serie de cambios tales como: deshidratación, queratinización melanización y lipidación llegan al estrato córneo para remplazar a las células muertas que se desprenden durante la descamación.

(20,46)

2.3 GENERALIDADES DE LOS METODOS IN_VIVO

El desarrollo de protocolos de pruebas in_vitro proviene de observaciones clínicas a través de modelos animales para predecir irritación ocular.

(23)

Los efectos de químicos en el ojo fueron notados desde 1813 cuando G.J. Beer observó y reportó que quemaduras en el ojo causadas por ácidos no eran tan destructivas como aquellas debidas a bases. Muchos otros médicos y científicos observaron y reportaron lesiones en los ojos en el siglo XIX, describiendo un enturbiamiento de los ojos originado por la exposición accidental a químicos.

(4,21)

La aparición de keratitis diferida en hombres expuestos a varios agentes químicos durante la Primera Guerra Mundial originó el estudio de la actividad del gas de mostaza en el ojo de conejo realizado por Mann y Pullinger. En estas investigaciones se examinaron los efectos a corto plazo y respuestas retardadas en el ojo, y se procuró definir el mecanismo de acción. Los resultados fueron comparados con aquellos observados en humanos.

(29)

En 1938 Carpenter y Smyth estudiaron 180 químicos para irritación ocular, viendo los efectos al disminuir el volumen y concentración de las soluciones de prueba, todo ello usando un modelo en conejo.

(6)

En 1944, John H Draize estudió agentes ampollantes y otros compuestos químicos para la Food and Drug Administration y realizó mejoras significantes en la estandarización del modelo en conejo y simplificó el sistema de evaluación.

Las observaciones se realizan sobre la córnea y las evaluaciones se basan en el grado de opacidad, densidad, y área de la córnea involucrada. La escala para la irritación ocular total de los materiales analizados va de 0 a 100.

(9)

Esta prueba con el sistema de evaluación simplificado, ha sido usada por más de 40 años, siendo la prueba comunmente empleada para determinar el potencial de un material para causar irritación ocular y dérmica, conocida con el nombre de prueba de Draize Kelly, en la cual una sustancia se aplica directamente sobre el ojo o piel de un conejo albino.

(32)

La evaluación subjetiva del grado de enrojecimiento, hinchazón, quemosis y turbidez son los parámetros de la prueba que se usan para calcular los índices medios de irritación ocular.

En la prueba de irritación ocular se evalúan los siguientes tejidos:

1. Conjuntiva

a) Enrojecimiento

b) Quemosis:

Engrosamiento de las conjuntivas ocular y palpebral y del tejido celular subyacente, de coloración roja mas o menos acentuada según el grado de inflamación.

c) Secreción:

Producto del funcionamiento fisiológico de una glándula.

2. Córnea

a) Grado de opacidad

b) Area de opacidad

3. Iris

En la prueba de irritación dérmica se realiza la siguiente evaluación:

1. Eritema:
Enrojecimiento difuso o en manchas de la piel, producido por la congestión de los capilares, debido a diversas causas.
2. Edema:
Inflamación producida por acumulación excesiva de líquido seroalbuminoso en el tejido celular.

Para ambas pruebas existe una escala de evaluación numérica, basada en el daño sufrido por cada uno de los tejidos evaluados; de este modo, al final se obtiene un valor numérico, el cual debe encontrarse dentro de ciertos límites para que el producto analizado sea apto para uso humano.

(32)

Las principales críticas que ha recibido la prueba de Draize son las siguientes:

- * Variación entre diversos laboratorios.
- * Naturaleza subjetiva del sistema de evaluación.
- * Dificultades en la interpretación de los resultados
- * Imposibilidad de correlacionar señales de una inflamación aguda con cambios estructurales permanentes.
- * Influencia del tamaño de grupo de prueba y la longitud del período de observación para la evaluación de riesgo.
- * Discrepancia entre el ojo del conejo y el ojo humano.
- * Procedimiento de prueba inhumano, sobre todo cuando se trata de probar irritantes severos.

(1,19,23,30,33,38)

2.4 GENERALIDADES DE LOS METODOS IN VITRO

Actualmente, el empleo de pruebas in vitro para estimar la seguridad se ha incrementado notablemente en la manufactura de productos tales como cosméticos, de cuidado personal, de uso doméstico, medicamentos y agroquímicos.

(17,39)

El término in vitro viene de la palabra latina que significa "en vidrio" (como una prueba en tubo de vidrio o caja petri), y se refiere a ensayos que no involucran una dosificación de sustancias a un animal vertebrado intacto. El término in vitro se aplica también a métodos que involucran el uso de animales invertebrados intactos tales como insectos, mariscos o protozoarios.

Un punto importante a considerar es que muchas pruebas in vitro continúan dependiendo de animales vertebrados como la fuente original de células y tejidos. Por ejemplo, todos los métodos de cultivo de células mamíferas (un grupo de ensayos in vitro).

(39)

La prueba in vitro correcta debe determinar en un 100% el efecto de una sustancia cuando está es administrada intencionalmente o accidentalmente a la piel u ojo humano.

No hay método in vitro perfecto, pero tampoco existe alguna prueba animal para estimar que la seguridad de los productos sea perfecta debido a la variabilidad biológica. Por consiguiente ambas pruebas se complementarían para determinar la seguridad; pueden proporcionar confianza, pero nunca certeza, en el proceso de estimación de la seguridad de los productos.

Los métodos in vitro se han empleado en numerosas áreas de la medicina e investigación por muchos años, y son ampliamente aceptados como herramientas confiables y sensibles para pruebas y

diagnósticos. Son ejemplo de pruebas de diagnóstico in vitro las pruebas comunes de sangre y orina empleadas para determinar si una mujer se encuentra embarazada.

(5,10,39)

Se emplean muchas pruebas in vitro para estimar el potencial de toxicidad de miles de productos y evaluar cambios en la fisiología, salud o nivel de la enfermedad de animales y humanos. De la misma manera, las pruebas de toxicidad in vitro pueden emplearse para predecir, medir y comparar la potencia de irritación de los productos a consumir, como una prueba adjunta o alternativa para las pruebas en animales ó humanos.

(2,5,22,39,41)

2.4.1 CLASIFICACION

Los mejores grupos de pruebas in vitro que se han aplicado específicamente para la evaluación de irritación dérmica y ocular son:

1. Cultivo de células de vertebrados
2. Cultivo de organismos invertebrados
3. Análisis químico
4. Métodos adicionales

(39)

1. CULTIVO DE CELULAS DE VERTERRADOS

Incluyen todos los métodos que dependen de células humanas ó de animales vertebrados que se extraen a partir del organismo intacto y crecen o se mantienen bajo muchas condiciones específicas en el laboratorio.

La fuente más abundante y común de tejido humano sano y fresco es el que se descarta y desecha en las cirugías cosméticas y circuncisiones.

(34,36)

Hay dos subdivisiones del cultivo células:

a) La primera incluye aquellos sistemas en los cuales las células se obtienen frescas a partir de un animal intacto o ser humano y en el cual estas células pueden mantenerse en cultivo por un período de tiempo relativamente corto.

b) La segunda división emplea células que son esencialmente inmortales: son aquellas que pueden crecer, subdividirse y mantener un cultivo por muchos años bajo condiciones apropiadas. No es de sorprender que muchas células inmortales han sido aisladas de tumores cancerosos.

(39)

Se emplea una gran variedad de técnicas para medir la capacidad de un material para causar daño al cultivo de células. Algunas pruebas miden los niveles de las moléculas intracelulares que han salido a los alrededores de la célula: este tipo de prueba es sensible para agentes que causan daño a la membrana celular.

(39,45)

Otros ensayos están basados en la capacidad de las células sanas para acumular tintes colorados altamente específicos. Materiales que causan daño a las células interfieren con la acumulación de estos tintes, proporcionando una medida directa de la viabilidad de la célula después de ser expuesta al material de prueba en cuestión.

Ensayos basados en la acumulación de tintes vitales tales como Rojo Neutro y MTT son ejemplos de este tipo común de ensayos de cultivo de células y son la base de pruebas comerciales disponibles.

(34,45)

2. CULTIVO DE ORGANISMOS INVERTEBRADOS

Las pruebas de toxicidad in vitro también incluyen métodos que involucran animales invertebrados.

La teoría en la que se basan estas pruebas es simple: los organismos comparten muchas características biológicas comunes con los grandes animales vertebrados, de modo que un compuesto que interfiere con la función normal o estructura de un invertebrado puede también ser perjudicial para el humano.

(39)

La prueba más ampliamente empleada es el ensayo de Ames, en el cual la bacteria Salmonella typhimurium se emplea para predecir el potencial de sustancias para inducir mutagénesis y el potencial de cambios carcinogénicos para el material genético.

(47)

Existen otras pruebas como el ensayo de motilidad de la Tetrahymena thermophila (empleando una sola célula de protozoario ciliado) y el ensayo de Microtox, el cual emplea una suspensión de bacterias marinas fluorescentes; ambos ensayos han sido empleados para evaluar productos cosméticos, productos de cuidado personal y productos domésticos, incluyendo los ensayos de fototoxicidad para fragancias.

(39,40,41)

3. ANALISIS QUIMICO

Todas las interacciones de sustancias tóxicas o irritantes con sistemas vivos pueden describirse por algunas series de reacciones químicas que, en muchos casos, son muy complejas. Sin embargo, algunas de estas reacciones químicas están bien comprendidas y sirven como base para un pequeño grupo de métodos in vitro empleados para predecir la irritación dérmica y ocular.

(11,17,39)

El ensayo Eytex y Skintex son ejemplo de un sistema químico que se emplea para predecir la irritación dérmica y ocular sin depender del uso de células vivas.

Este método está basado en el potencial de una sustancia para producir la precipitación de proteínas.

Estos métodos son una herramienta valiosa para determinar la seguridad de los productos, tanto materias primas como producto terminado.

(11,14,17,23)

4. METODOS ADICIONALES

Existen otros métodos prometedores que nunca van a poder estar disponibles en el comercio en forma de equipos, como es el caso del ensayo de la membrana corioalantóica (CAM).

CAM es un ensayo que requiere de huevos de gallina fertilizados y ha mostrado que proporciona un buen modelo para predecir irritación ocular.

(28,34,39)

2.5 SELECCION DE LOS METODOS IN VITRO

Existe una gran variedad de métodos alternos in vitro para las pruebas de irritación ocular y dérmica de Draize, los cuales se han desarrollado y son estudiados en Europa y América.

Algunas de estas pruebas son:

1. Ojos enucleados de conejo
2. Córneas de bovino
3. Ileum de conejo
4. Prueba del huevo de gallina - Membrana corioalantóica
5. Pruebas fisicoquímicas (ej. Métodos EYTEX y SKINTEX, basados en la ruptura de proteínas en solución)
6. Pruebas citotóxicas (ej. Método del rojo neutro, ensayo sobre células rojas sanguíneas; basados en la integridad de la membrana y proteínas)

Algunos de estos métodos involucran animales muertos (1,2,3), empleándose animales que ya han sido usados para otros propósitos ó que se matan para el consumo de su carne.

El método de la Membrana corioalantóica (4) involucra el uso de huevos de gallina a más de la mitad del período de incubación; por tal motivo, este método en algunos países es considerado como experimento en animales.

Por lo tanto FRAME (Fundación para el remplazo de animales en experimentos médicos) esta concentrando sus esfuerzos en las pruebas fisicoquímicas (5) y citotóxicas (6).

(2,24)

En base a lo anterior, se seleccionaron cuatro métodos, que son los que resultados más prometedores han arrojado en diversos estudios realizados, procurando escoger un método de cada uno de los grupos en los que se clasifican las pruebas in vitro.

Se seleccionaron tres métodos para irritación ocular (1,2,3) y uno para irritación dérmica (4).

1. Prueba de la membrana corioalantóica (Métodos adicionales)
2. Ensayo en células rojas de sangre (Cultivo de células de vertebrados)
3. Ensayo fisicoquímico EYTEX (Análisis químico)
4. Ensayo fisicoquímico SKINTEX (Análisis químico)

2.6 PRUEBA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOICA (HETCAM)

Existen varios métodos en los cuales se usa la membrana corioalantóica, los ensayos se definen como:

- * La prueba de la membrana corioalantóica (HETCAM)
- * La prueba de la membrana corioalantóica (CAM)
- * El ensayo vascular de la membrana corioalantóica (CANVA)

Estos métodos difieren significativamente en su técnica y procedimientos de calificación.

(5,10,22,27,28,39)

El sistema del embrión de pollo es bien conocido y ha sido usado como modelo simple para pruebas de toxicidad, teratogenicidad, efectos sistémicos e inmunopatológicos del embrión. Se ha encontrado que la membrana corioalantóica en sí, es útil para los científicos para estudios de cultivos virales. Por lo tanto, el uso de la membrana corioalantóica como accesorio para investigación es un enfoque bien conocido. Su uso para la aplicación en estudios de irritación ocular es una extensión natural de esta herramienta de investigación.

(5,10,24,33)

2.6.1 FISILOGIA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOICA

La estructura de esta membrana esta formada por la fusión de dos tejidos, el corión y la alantoides. La membrana corioalantóica circunda el contenido del huevo en el interior de la membrana interna de la cáscara. Consiste de dos epitelios separados por tejido mesodérmico y crece en un tallo que nace cerca del extremo de lo que será el aparato digestivo del embrión. Las funciones de la membrana corioalantóica incluyen:

- * Respiración
- * Absorción de calcio de la cáscara
- * Transporte de agua e iones
- * Definición del depósito de desechos para el embrión en desarrollo

Lo más importante para nuestros propósitos es que se trata de una membrana bien vascularizada que, junto con sus capas epiteliales, proporciona un modelo razonable para el tejido ocular. La membrana corioalantóica no está inervada (es decir, carece de tejido neural), y por lo tanto no reacciona a los estímulos táctiles.

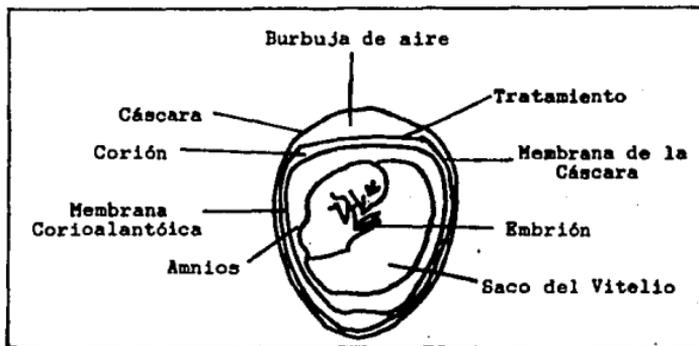
(8,27,28)

En la Figura 2 se ilustra un embrión de pollo de diez días. Es importante su uso como herramienta de ensayo, por que responde a las lesiones con un proceso inflamatorio completo, similar al que observaríamos en el tejido conjuntival de ojo de conejo. Su alta vascularización se presta como tejido ideal para estudios de irritación.

(8,28)

Fig. 2

EMBRIÓN DE POLLO - 10 DIAS



(8,28)

En la Figura 3 se muestra como es removida la membrana de la cáscara para dejar expuesta la membrana corioalantóica, sobre la cual se aplicará la muestra.

Fig. 3



Los puntos finales de este ensayo son hiperemia (que es la dilatación o inflamación del sistema de vascularización), hemorragia o sangrado incontrolable, coagulación, coágulos y opacificación. La calificación de estos efectos fisiológicos se basa en un sistema que depende del tiempo. Por ejemplo, si los efectos fisiológicos ocurren antes, se les asigna una calificación más alta.

En este método de prueba se usan cuatro huevos y dos controles de vehículo por muestra, y la calificación final es el valor promedio de los cuatro huevos.

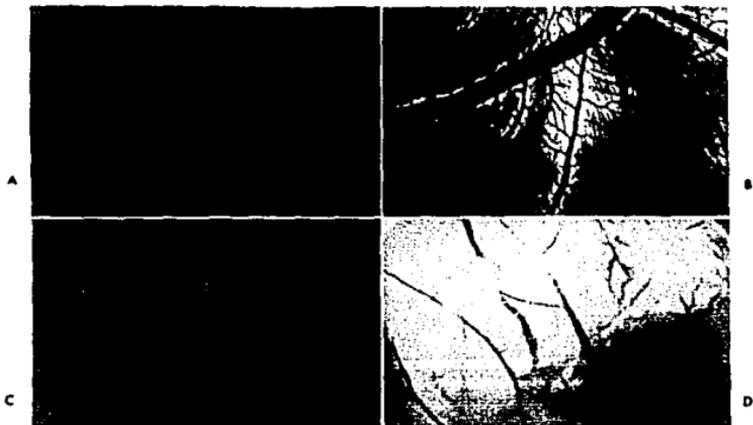
(27,28)

En la Figura 4 se observan algunas reacciones típicas de la membrana corioalantóica.

Fig. 4

- a,b Inyección vascular (clasificación: levemente irritante)
- c Hemorragia y lisis vascular (clasificación: irritante)
- d Coagulación acompañada de hemorragia y lisis vascular (clasificación: fuertemente irritante ó corrosivo)

(33)



2.7 ENSAYO EN CELULAS ROJAS DE SANGRE (RBC)

Dentro de los cultivos de células de vertebrados existen diversos métodos, uno de los cuales es el ensayo en células rojas de sangre (RBC - ASSAY).

(3,34,39)

El método en células rojas es un ensayo fotométrico, el cual permite estimar el potencial de irritación, esta estimación se basa en la diferenciación entre lisis de la membrana celular y desnaturalización de proteínas celulares, considerando ambos procesos puntos finales del ensayo.

(34,35,36,37)

Los cambios en el comportamiento óptico de la oxihemoglobina (HbO₂) se usan para monitorear ambos puntos finales y sus interrelaciones, debido a que ésta actúa como un indicador inherente, ya que la desnaturalización de oxihemoglobina es cuantificada fotométricamente por el continuo cambio de color que va de rojo claro a café rojizo produciendo un cambio en la absorción.

(33,34,35,37)

*** ERITROCITOS (RBC)**

Los eritrocitos se lisan mediante la adición de tensoactivos a nivel hemólisis H₅₀ (lisis de membrana celular y solubilización de las sustancias celulares). La liberación de oxihemoglobina (HbO₂) se usa como punto final objetivo de la integridad de la membrana. Figura 5.

*** DESNATURALIZACION**

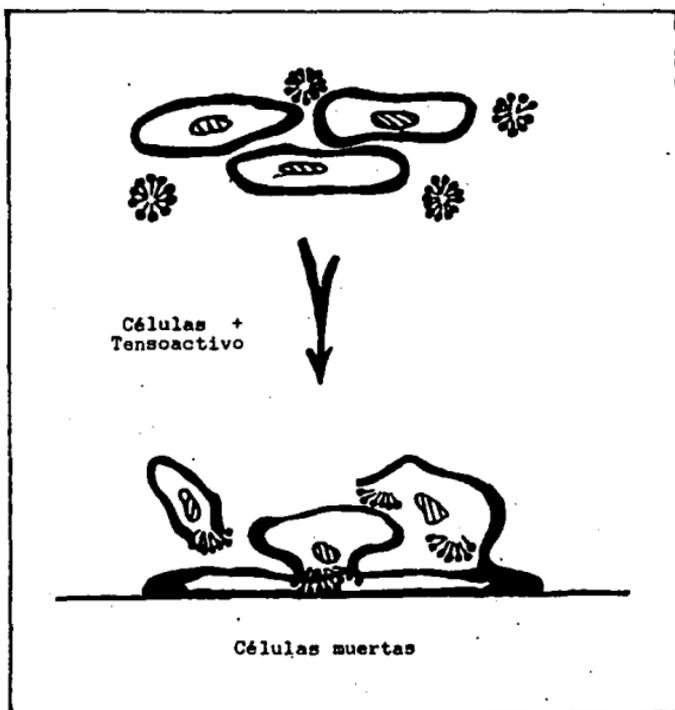
El índice de desnaturalización (DI) de las proteínas y enzimas a una concentración mayor de tensoactivo normalmente después de una hemólisis completa.

Figura 6.

Las estructuras altamente ordenadas de las proteínas son dañadas, pudiéndose cuantificar el grado de desnaturalización.

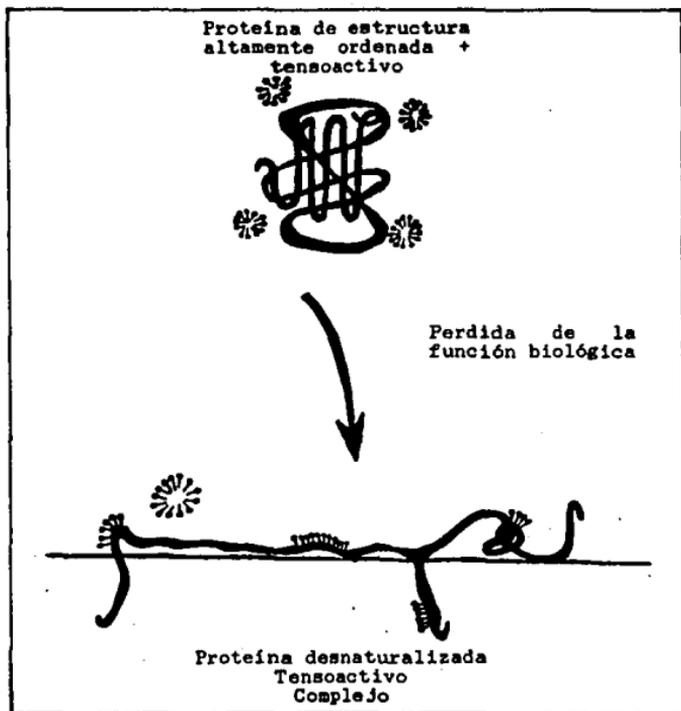
(33)

Fig. 5 LISIS CELULAR



(33)

Fig. 6 DESNATURALIZACION DE PROTEINAS



2.8 ANALISIS QUIMICO (SISTEMA EYTEX)

El método EYTEX es un ensayo bioquímico patentado, el cual se basa en el empleo de un blanco biomacromolecular para predecir respuestas de toxicidad in vivo.

(12)

2.8.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA EYTEX

El sistema EYTEX es un procedimiento alterno in vitro que fue diseñado para acercarse al ensayo de irritación ocular en conejos de Draize como herramienta para la evaluación de toxicidad ocular.

(14)

La fase de investigación y desarrollo del sistema EYTEX empezó en 1981 y el método establecido primero fue el ensayo estándar, el cual se finalizó en 1985 por la National Testing Corporation, (ahora Laboratorios ROPAK). Desde el desarrollo de este protocolo inicial, el método EYTEX ha evolucionado, de manera tal que el sistema EYTEX actualmente consiste de pruebas específicas. Todos estos protocolos EYTEX se basan en el mismo reactivo sintético que se deriva totalmente de fuentes no animales.

(23,26)

El ensayo estándar (STD) que se tuvo comercialmente disponible en 1987, fue diseñado para la prueba de materiales solubles en agua y miscibles.

(14)

La aplicación del sistema EYTEX a las pruebas de tipos de productos cosméticos y de cuidados personales fue intensificada grandemente con la introducción del ensayo de partición de membrana (MPA). El cual fue diseñado para probar materiales insolubles en agua, no miscibles, opacos y pigmentados.

(15)

A lo largo de 1989 y 1990, el sistema EYTEX experimentó un crecimiento significativo por la introducción de cuatro protocolos nuevos para constituir un sistema EYTEX de la tercera generación. Estos incluyen:

- * El ensayo alcalino de membrana (AMA)
diseñado para químicos y formulaciones alcalinas
- * El ensayo rápido de membrana (RMA)
diseñado para surfactantes y formulaciones de surfactantes etoxilados y anfotéricos
- * El ensayo de membrana vertical (UMA)
diseñado en forma de ensayo MPA mejorado
- * El ensayo de alta sensibilidad (ESA)
diseñado para materiales con un bajo potencial de irritación

(12,13,17,18,26,44)

2.8.2. ANTECEDENTES

El método EYTEX se basa teóricamente en el trabajo original de Draize publicado en 1944, en el cual estableció que la opacificación o precipitación de proteínas de la córnea es el factor primordial en la calificación de irritación ocular causada por químicos.

(9,23)

La identificación de los componentes químicos de la córnea fue publicada en 1961 por Kawerau y Ott. Los diferentes componentes de las proteínas de la córnea fueron aislados y parcialmente caracterizados como una mezcla de globulinas y albumina.

(23)

En 1971, Benedek demostró que el estado transparente normal de la córnea depende del grado relativo de hidratación de las proteínas y de su organización altamente especializada.

Estudios posteriores realizados por Jedziniak en 1976 usando dispersión de luz láser *in-situ* en el cristalino humano, demostraron que la causa de la opacificación corneal era la presencia de agregados de alto peso molecular con una hidratación reducida de proteínas.

En general, una disminución en la hidratación de las proteínas conducirá a cambios en su conformación.

(17,23,26)

2.8.3 BASE CIENTIFICA DEL MECANISMO DEL SISTEMA EYTEX

Gordon y Bergman han desarrollado el sistema EYTEX, basado en un proceso que incluye las alteraciones en la hidratación y conformación de una matriz de proteínas para predecir la irritación ocular in vivo. El ensayo in vitro ha sido diseñado para ser mecánicamente análogo a la opacificación corneal in vivo.

(14,15,18,26)

Esta matriz de reactivo de proteína es derivada de polvo de semilla de nanjea (especie de haba). Una proteína oligomérica es el componente más activo del reactivo. Sin embargo, esta fórmula registrada también contiene péptidos, aminoácidos, mucopolisacáridos, etc. Tabla 1.

(23,26)

TABLA 1. COMPOSICION DE LA MATRIZ REACTIVO DE PROTEINA

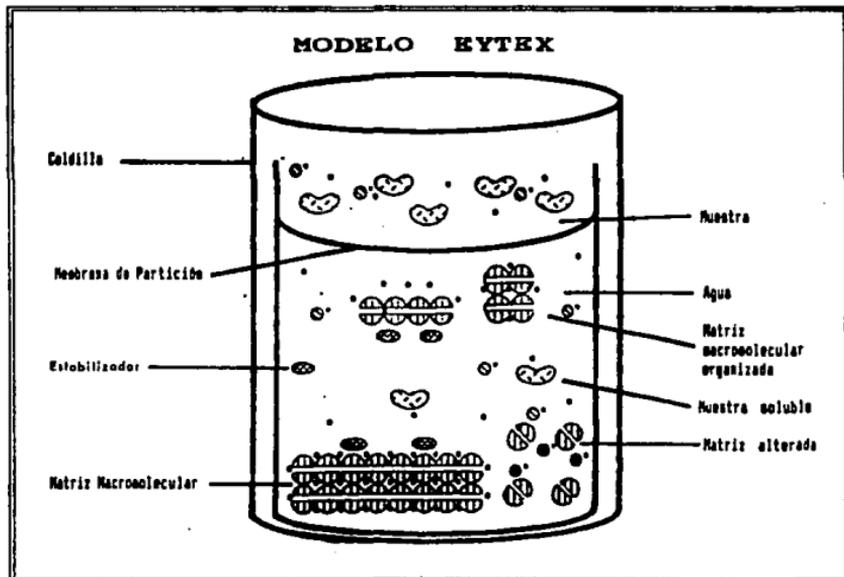
Globulinas	0.6	a	1.2	%
Albumina	0.2	a	0.5	%
Carbohidratos	0.2	a	0.3	%
Lípidos	0.1	a	0.3	%
Saponinas	0.001	a	0.01	%
Mucopolisacáridos	0.1	a	0.2	%
Cloruro de sodio	0.1	a	0.2	M
Acetato de sodio	0.05	a	0.1	M
Borato de sodio	0.1	a	0.3	%
EDTA	0.01	a	0.02	%

(17,23)

El sistema EYTEX utiliza una matriz biomacromolecular que imita la córnea en el tubo de prueba. Esta matriz esta compuesta por proteínas altamente organizadas con espacios regulares, lo cual ocasiona que la matriz sea clara. Cuando un producto químico irritante es expuesto a esta matriz, esta conformación es alterada, produciéndose turbidez la cual es medida turbidimetricamente. Figura 7.

(12)

Fig. 7 MODELO EYTEX



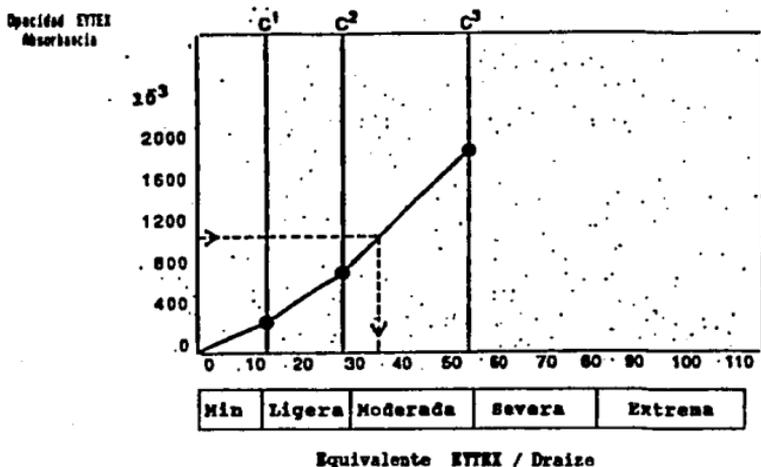
(12)

El ensayo básico de EYTEX se conduce en una probeta, en la que un irritante químico es expuesto a una solución acuosa de reactivo de proteínas en presencia de un activador, que es una substancia que activa al reactivo para el ensayo. El punto final del ensayo es la agregación de la proteína del reactivo, que ocurre mediante un proceso patentado hasta un grado proporcional al potencial de irritación de la muestra de la prueba.

(42)

La agregación de proteínas es cuantificada mediante la medición de su absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro. El potencial de irritación del agente de la prueba es evaluado aplicando los datos de la prueba a una curva de calibración obtenida con irritantes estándares conocidos. Figura 8.

Fig. 8 CURVA DE CALIBRACION PARA LA EVALUACION DEL POTENCIAL DE IRRITACION



(C1-3 Define los cortes para la clasificación de irritación, así como la localización de la tabla para tres puntos de datos del calibrador.)

Esta curva es trazada relacionando la absorbancia con una escala del equivalente de EYTEX/Draize (EDE). La escala del equivalente de EYTEX/Draize se representa por una calificación numérica y por un sistema de clasificación para juzgar la irritación.

La escala del Equivalente EYTEX/Draize para una muestra de la prueba puede obtenerse gráficamente identificando un punto en la curva de calibración que se relacione con la absorbancia de la muestra y dejando caer una línea en la escala del Equivalente de EYTEX/Draize.

La escala EDE fue diseñada para ser una aproximación de la respuesta de irritación ocular máxima aguda, y representa más estrechamente la calificación total promedio de 24 horas de Draize.

Los cortes numéricos definen la escala del EDE en las categorías de Juicio de irritación, y estos cortes reflejan la variabilidad inherente de los ensayos in vivo e in vitro. Los valores del corte difieren para los diferentes protocolos de EYTEX, y generalmente se usan como estructura para trazar la curva de calibración.

Los protocolos EYTEX tienen la habilidad de asignar las siguientes clasificaciones para juzgar la irritación: no irritante, irritante mínimo, ligero, moderado y severo. Sin embargo, únicamente el ensayo de alta sensibilidad (HSA) puede asignar adecuadamente una clasificación no irritante.

(42)

El ensayo EYTEX es un método in vitro que mide solo la irritación química, este no estima otros factores que contribuyan a otras irritaciones in vivo, tales como mecanismos físicos, alergias, o la capacidad de sanar después de la irritación.

El método EYTEX, sin embargo, puede ser apropiado para controlar y monitorear ingredientes nuevos y formulaciones de uso doméstico, cosméticos y productos de cuidado personal.

(17)

2.8.4 CONFIGURACION ACTUAL DEL SISTEMA EYTEX

El sistema EYTEX se a desarrollado para proporcionar protocolos y parámetros de control de calidad, los cuales incrementan la precisión y expansión para la aplicación de este sistema.

(12)

En la Figura 9 se puede observar la evolución del sistema EYTEX.

Fig. 9 EVALUACION DEL SISTEMA EYTEX

> 1985	Protocolo estándar (STD) Materiales solubles y miscibles
> 1986 - 1987	Protocolo membrana de partición (MP A) Materiales insolubles, inmiscib les, opacos y pigmentados
> 1989 - 1990	Protocolo alcalino de membrana (AMA) Formulaciones y químicos alcalinos
	Protocolo rápido de membrana (RMA) Surfactantes etoxilados, anfotéricos y formulaciones que los contienen
	Protocolo de alta sensibilidad (HSA) Materiales de baja irritación
	Protocolo de membrana vertical (VMA) Ensayo MP A mejorado

(13)

Los seis protocolos del sistema EYTEX difieren no únicamente en la modalidad de aplicación, sino también en su estructura física. Estas diferencias se detallan en la Tabla 2.

TABLA 2. DIFERENCIAS ENTRE LOS PROTOCOLOS DEL SISTEMA EYTEX

PROTOCOLO	TIPO DE MUESTRA	APLICACION DE LA MUESTRA	FORMA DEL ENSAYO	TIEMPO (hr)	ACTIVADOR (conc)
STD	- Soluble - Miscible	En diluyente	Vertical	1	1 x
NPA	- Insoluble - Inmiscible - NI en STD	En membrana	Invertido	24	1 x
AMA	- pH > 8	En membrana (bala)	Vertical	24	Ninguno
NMA	- NI en STD y NPA - Surfactantes	En membrana (bala)	Vertical	5	3 x
LMA	- Igual al NPA - Baja tensión superficial	En membrana (bala)	Vertical	24	1 x
HSA	- Baja irritación	En membrana (bala)	Vertical	24	1 x

(13)

Los seis protocolos se enfocan individualmente en una aplicación diferente, sin embargo técnicamente muestran mucha uniformidad. Todos los protocolos usan el mismo reactivo de proteínas, activador, y tipo de probeta. En los protocolos con formato de membrana, el diseño de la membrana puede diferir, pero el material de la membrana es el mismo, es decir, celulosa especialmente tratada. Además, los calibradores que sirven para generar la curva de referencia para las evaluaciones del potencial de irritación, son específicos para cada protocolo. Cada uno de los protocolos requiere del uso de un juego único de calibradores y los algoritmos respectivos para el análisis. El protocolo del ensayo de membrana vertical (UMA) está diseñado para usar los mismos calibradores y algoritmos del RMA.

(7,13)

2.8.5 DESCRIPCIÓN DE LOS PROTOCOLOS

2.8.5.1 PROTOCOLO ESTÁNDAR (STD)

El ensayo estándar está diseñado para materiales miscibles solubles en agua, por lo que se requiere que la muestra sea colocada directamente en la solución del reactivo activado. Por esta razón, generalmente se ha encontrado que el protocolo STD es muy útil para químicos purificados o ingredientes no elaborados, y menos útil para formulaciones de productos.

El activador se usa en una concentración de 1x. La forma del ensayo es vertical, lo que significa que la probeta permanece en posición vertical durante el tiempo requerido del ensayo.

(14)

2.8.5.2 ENSAYO DE PARTICIÓN DE MEMBRANA (MPA)

El ensayo de partición de membrana MPA está diseñado para materiales que son insolubles en agua, inmiscibles, opacos, pigmentados o que no califican para el protocolo STD. Este protocolo es único en cuanto a que la muestra es insertada en una copa de membrana semipermeable moldeada conocida como "floppy".

Esta copa de muestreo se instala en el extremo superior de una probeta que contiene el reactivo activado, y la probeta se tapa. El activador se usa a una concentración de 1x.

Una característica distintiva de este ensayo es que se efectúa con la probeta en posición invertida para maximizar el contacto del reactivo con la superficie de la copa de membrana. El ensayo se desarrolla a lo largo del tiempo prescrito de 24 horas a través de interacciones entre los componentes del reactivo activado y la muestra de la prueba, que ocurren a lo largo de la barrera de membrana semipermeable.

Un problema reconocido en este protocolo ocurre en la prueba de agentes con una baja tensión superficial. Esta característica puede permitir que la muestra suba a los lados de la copa de membrana con posibles fugas en la probeta. Sin embargo, los protocolos alternos de EYTEX poseen modificaciones técnicas que corrigen este problema.

(15,44)

2.8.5.3 ENSAYO ALCALINO DE MEMBRANA (AMA)

El ensayo alcalino de membrana AMA está diseñado para pruebas de agentes que tienen un pH > 8.0. El desarrollo de este protocolo se basó en el descubrimiento de que las muestras alcalinas, como los productos empleados para realizar permanentes o alaciar cabello y jabones, no calificarían en el Sistema EYTEX, a menos que se omitiera del ensayo el reactivo activador. La única mejora dentro del protocolo del AMA es que no se usa activador. Las razones de este enfoque son que el activador representa una solución amortiguada ácida (pH 3), que por naturaleza disminuirá la alcalinidad del sistema del ensayo producida por la muestra alcalina de prueba. Sin embargo, la alcalinidad de una substancia es considerada como un componente de su potencial de irritación ocular. Para un análisis in vitro exacto y representativo, es deseable que el sistema de prueba retenga la máxima sensibilidad al alto pH de la muestra. Por lo tanto, la omisión del activador del sistema produce un análisis más relevante, así como una mejor calificación del ensayo.

(13)

Como características adicionales de este protocolo tenemos que la muestra de la prueba es contenida en una copa de membrana, y que el ensayo es efectuado durante 24 horas con la probeta en posición vertical. La posición vertical se hace posible mediante el uso de una copa de membrana semipermeable modificada, conocida como "bala". La bala está hecha de dos anillos de plástico, entre los que se sostiene la membrana y abajo de los cuales se coloca la copa de membrana. Los anillos de bala sirven como barrera contra el arrastre ascendente de la muestra, y como plataforma para colocar la membrana en la probeta. La bala se sitúa en la probeta de forma tal que la copa de membrana con la muestra sea sumergida en el reactivo líquido de prueba.

(42)

2.8.5.4 ENSAYO RAPIDO DE MEMBRANA (RMA)

El ensayo rápido de membrana RMA fue diseñado para analizar los surfactantes etoxilados o anfotéricos y formulaciones que contienen estos tipos de surfactantes. Las muestras de prueba de este tipo han tendido a ser asociadas con curvas de respuestas de dosis no calificadas en el protocolo del MPA.

(17,18)

El RMA produce respuestas de dosis calificadas usando un reactivo altamente activado para probar estas muestras problema. Se tiene una mayor reactividad mediante el uso del activador a una concentración de 3x. Este ensayo se lleva a cabo en forma vertical durante 5 horas, usándose la membrana de bala para contener la muestra de la prueba.

(7,17,18)

2.8.5.5 ENSAYO DE MEMBRANA VERTICAL (UMA)

El ensayo de membrana vertical UMA representa un protocolo del MPA mejorado. Es similar al MPA en cuanto al procedimiento, y a los tipos de muestras para cuya evaluación fue diseñado. El UMA se corre durante 24 horas, y la concentración usada es de 1x. Las principales alteraciones del UMA son el uso de una bala de membrana para la muestra, la forma vertical del ensayo, y el uso de diferentes calibradores. El uso de la bala permite menos dificultades técnicas en relación al manejo, y elimina los problemas del arrastre ascendente y fugas de la membrana.

En general, el UMA tiene características para ser usado como protocolo de un rango amplio. El uso de los protocolos del UMA y del RMA puede ser suficiente para cubrir pruebas de la mayoría de los químicos y formulaciones del sistema EYTEX.

(7)

2.8.5.6 ENSAYO DE ALTA SENSIBILIDAD (HSA)

El ensayo de alta sensibilidad HSA es un protocolo especializado que está diseñado para probar muestras asociadas con un potencial de irritación bajo, es decir, una calificación de Draize de 0 a 16. El HSA es un ensayo vertical que usa una bala modificada para la muestra, y que se corre durante 24 horas usando una concentración del activador de 1x.

La variabilidad inherente de los demás protocolos de EYTEX es tal, que los resultados de no irritante e irritantes mínimos frecuentemente representan sobrestimaciones. El HSA es el único protocolo de EYTEX que puede clasificar una muestra como no irritante.

El HSA no está diseñado para probar muestras que tengan altas concentraciones de surfactantes, pH bajo y alto, o solventes reactivos.

(7.13.42)

2.8.6 MODIFICACIONES DE LOS PROTOCOLOS

El sistema EYTEX representa un procedimiento flexible como alternativa de pruebas in vitro en relación a la diversidad de tipos de productos que pueden ser evaluados por sus seis protocolos. Se cuenta con flexibilidad al usar este sistema mediante las modificaciones documentadas del protocolo, que pueden ser aplicadas para cubrir los problemas específicos encontrados durante las pruebas de las muestras.

En la Tabla 3 se señalan estas modificaciones.

(42)

TABLA 3. MODIFICACIONES DE LOS PROTOCOLOS EYTEX

PROBLEMA	MODIFICACION
* Inhibición del STD	STD 3x, 5x
* Blancos de muestras intensamente coloreadas	Cambio de la longitud de onda de la luz
* La muestra reacciona con la probeta del STD	Ensayo STD en probetas de vidrio
* La muestra rompe la probeta del MPA	Ensayo RMA
* La muestra reacciona con el activador	Usar activador en los blancos
* La muestra no califica	Concentración más alta calificada (HQC)
* La muestra no califica	Análisis Diluido

(42)

* Cuando se obtiene inhibición en el protocolo STD, un método adicional para calificar la muestra es aumentar la reactividad del sistema usando concentraciones del activador de 3x ó 5x.

* Algunas veces el color de las muestras pigmentadas puede interferir produciendo blancos del ensayo coloreados que puede ocasionar su descalificación. Un medio para corregir este problema es leer el ensayo no con la longitud de onda estándar de la luz de 400 nm, sino con una longitud de onda alterna que reduzca la interferencia del color.

* Si la muestra de la prueba reacciona de alguna forma con la probeta de poliestireno en el protocolo STD, entonces el STD puede ser conducido en tubos de vidrio.

* En caso de que la muestra esté asociada con gases en expansión que rompan la probeta del MPA, entonces el ensayo puede ser efectuado usando el protocolo RMA, en el que la probeta se cubre con Parafilm.

* Puede ocurrir alteración en el ensayo si la muestra reacciona químicamente con el activador. Esta situación con frecuencia se corrige si el activador se usa en los blancos a la misma concentración de las probetas de la prueba.

* Si una muestra no califica en el RMA usando los volúmenes de muestra estándar (es decir, 30, 50 y 100 ul o mg), se tienen medios alternos para obtener resultados calificados para evaluación, usando ya sea la concentración más alta calificada (HQC), o el procedimiento de análisis diluido.

La concentración más alta calificada es aquella en la que el volumen de la muestra de la prueba aplicado en el sistema del análisis se disminuye a una cantidad menor. Los volúmenes de 5 y 10 ul o mg, serían los límites inferiores razonables con este procedimiento.

El análisis diluido es aquél en el que la muestra de la prueba aplicada al sistema de análisis representa una forma diluida del material de la muestra concentrada original, y esta dilución se hace usando un solvente apropiado.

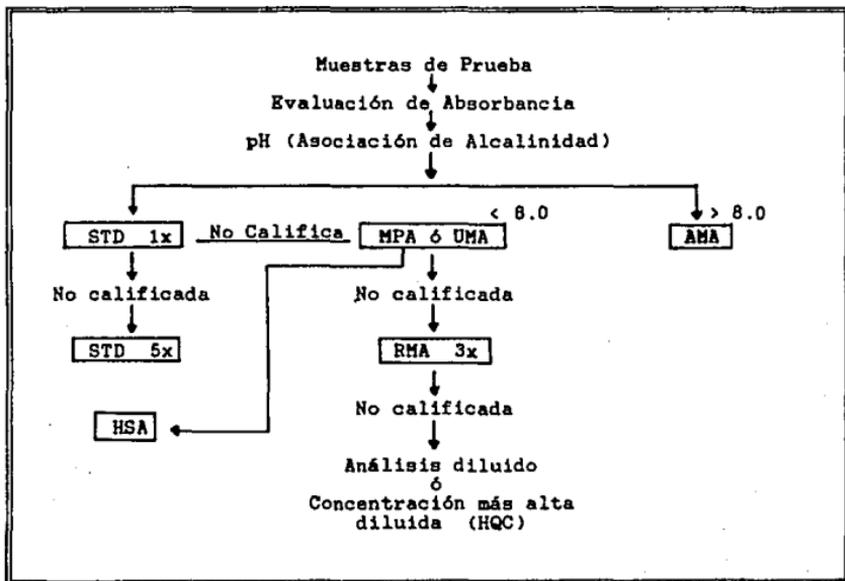
(42)

2.8.7 APLICACION DEL SISTEMA EYTEX

La complejidad relativa del sistema EYTEX no constituye un impedimento para su aplicación efectiva. Esto se debe a que se pueden aplicar sistemáticamente numerosos protocolos y modificaciones para la evaluación de muestras cuyo carácter o irritación se desconoce. El esquema de uso del protocolo recomendado por Laboratorios BOPAK para los protocolos de EYTEX de la tercer generación, se describe en el árbol de decisiones de la Figura 10. Aquí las muestras de prueba son primero sometidas a una evaluación de pH para definir el uso del AMA con muestras con un $\text{pH} > 8$, o el UMA o STD con muestras con un $\text{pH} < 8$.

Una muestra no calificada en el STD 1x puede ser evaluada con un STD 5x o sujeta a análisis con el UMA. Las muestras que se considere están siendo sobrestimadas por el UMA, pueden ser evaluadas adicionalmente con el HSA. Las muestras no calificadas en el RMA pueden ser analizadas más aún usando el RMA con el procedimiento de análisis diluido o un HQC.

Fig. 10 ESQUEMA GENERAL PARA LA EVALUACION DE MUESTRAS EN EL SISTEMA EYTEX



(13, 42)

2.6.8 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL SISTEMA EYTEX

Para un uso eficiente del sistema EYTEX para las pruebas in vitro se requiere que el usuario tenga una perspectiva de las limitaciones de estos procedimientos. En la Tabla 4 se incluye una lista de las ventajas y desventajas del uso del sistema EYTEX como alternativa in vitro del procedimiento de Draize.

TABLA 4.

DESVENTAJAS	VENTAJAS
* No califican sustancias específicas	* Alta correlación con la irritación ocular <u>in vivo</u>
* No mide: - Irritantes mecánicos - Mecanismos de recuperación - Contribuciones por penetrabilidad o respuestas inmunológicas	* Se relaciona con la calificación de 24 horas de Draize * Mide la irritación química
* La información de evaluación disponible es insuficiente para la aplicación de la muestra: modalidad volumen frecuencia	* Amplia compatibilidad de muestras * Procedimiento rápido y simple * Cuantitativo y portable
* No distingue fácilmente entre irritantes severos y extremos	* Efectivo en costos * Puede reducir las pruebas en animales

Se ha observado que algunas sustancias no califican en el ensayo de EYTEX debido a su incompatibilidad inherente con los componentes del sistema. Dichos agentes que han sido reconocidos a la fecha son: urea, violeta de manganeso, cloruro de plata, y altas concentraciones de tipos específicos de materiales etoxilados y anfolitos.

(13,42)

2.9 ANALISIS QUIMICO (SISTEMA SKINTEX)

El método skintex es un ensayo bioquímico patentado, el cual se basa en un modelo físico - químico de dos compartimentos para predecir respuestas de toxicidad in vivo.

(12)

2.9.1 GENERALIDADES SOBRE IRRITACION DERMICA

La irritación dérmica primario in vivo es un fenómeno complejo que involucra múltiples parámetros físico - químicos interrelacionados. Los animales han sido usados para asegurar la irritación dérmica por observación de cambios visibles que van desde el eritema y edema hasta la corrosión y ulceración.

(9)

La irritación dérmica es producida por diversos y complejos mecanismos. Los eventos identificados en la irritación dérmica incluyen:

- * Interacción con el estrato corneo
- * Desnaturalización de proteínas
- * Lisis de células de la epidermis
- * Citotoxicidad
- * Producción de antígenos y citoquinas epidermicos
- * Desgranulación de células de apoyo

En la piel el estrato corneo, una capa delgada de células muertas con keratina cornificada, actúa como una barrera limitando la penetración de químicos a la epidermis y dermis. Las propiedades y eventos que ocurren en esta barrera son esenciales para su función e integridad. Los eventos clave incluyen pérdida de agua, desnaturalización de keratina y lisis.

(16)

2.9.2 ANTECEDENTES

El proceso de irritación puede ser visto como absorción o penetración a través de una superficie externa de una matriz de queratina (semejante al estrato corneo) hacia una superficie interna tal como la epidermis.

Este concepto fue la base para un modelo físico químico de dos compartimentos para irritación dérmica, el cual incorpora una matriz barrera y un reactivo sensible para analizar químicos irritantes. Este es llamado la matriz barrera/sistema reactivo.

Usando membranas aisladas de epidermis, Schueplein y Ross investigaron los efectos de solventes que poseen enlaces hidrógeno, solventes lipídicos y surfactantes aniónicos sobre el estrato corneo y su permeabilidad. Los solventes que poseen enlaces hidrógeno tal como el DMSO afectaron la barrera produciendo expansión de la matriz. Los surfactantes aniónicos también produjeron expansión de la matriz por interacción proteica. Los solventes lipídicos tuvieron poco efecto sobre la estructura del estrato corneo, pero redujeron la capacidad que tiene el estrato corneo para retener agua.

Los procesos de absorción del estrato corneo han sido investigados a fondo por Imokawa, estableciendo que la absorción es el paso más importante en la iniciación de la irritación dérmica y tal vez el más importante parámetro físico químico en la toxicidad dérmica de surfactantes aniónicos.

La integridad del estrato corneo es el segundo parámetro más importante en la iniciación de la irritación. Pemberton y Oliver monitorearon la resistencia eléctrica en zonas de piel como una medición de la integridad de la barrera y por lo tanto como un indicador del potencial de corrosión de químicos.

La desnaturalización de proteínas ha sido cuantificada como cambios en la rotación específica de una solución de proteínas o más recientemente en estudios por Kligman como cambios en el pH.

(18)

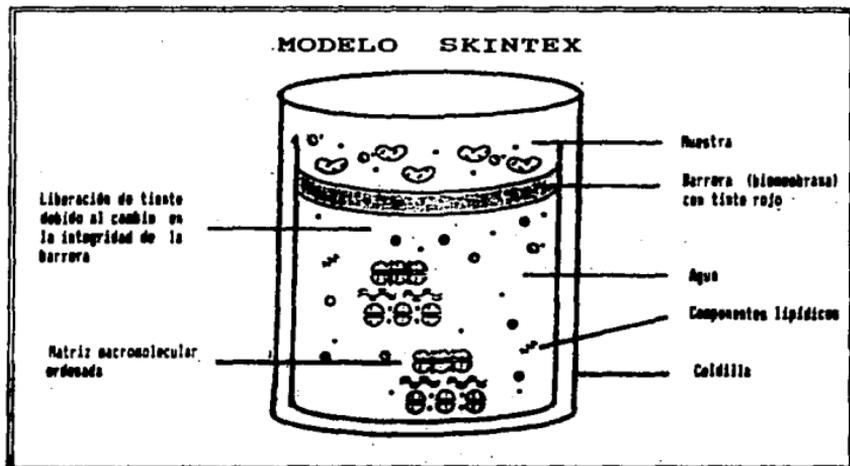
2.9.3 BASE CIENTIFICA DEL MECANISMO DEL SISTEMA SKINTEX

El modelo SKINTEX fue desarrollado para proporcionar un método alternativo a la prueba de Draize en conejo. Este método está basado en un modelo físico - químico de dos compartimentos que incluyen una biomembrana de barrera en el compartimento uno y una matriz macromolecular en el compartimento dos.

La muestra a analizar se absorbe ó penetra a través de una barrera de biomembrana constituida por keratina/colágeno y posteriormente reacciona directamente con la matriz de macromoléculas organizadas (reactivo sensible de proteínas). Los cambios en la integridad de la barrera liberan un tinte indicador, y los cambios en la matriz pueden alterar la transparencia del reactivo. La suma de estas dos respuestas es leída espectrofotométricamente a 470 nm.

Figura 11.

Fig. 11 MODELO SKINTEX



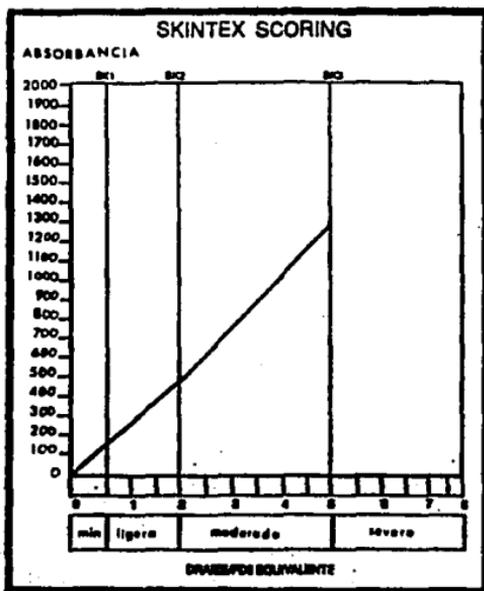
2.9.4 SISTEMA DE VALUACION

Un sistema de calibración basado en la irritación de controles conocidos (PD II) es empleado para establecer el sistema de evaluación.

Tres calibradores con PD II *in vivo* conocido son analizados en cada ensayo. Una curva de calibración es dibujada relacionando la absorbancia para el índice de irritación dérmica primaria (PD II). La absorbancia de la muestra es leída en el eje Y y el equivalente SKINTEX / PD II es leído como el valor correspondiente en el eje X. En la Figura 12 se muestra la Evaluación SKINTEX.

(16,43)

Fig. 12 EVALUACION SKINTEX



2.9.5 CONFIGURACION DEL SISTEMA SKINTEX

El sistema SKINTEX se ha desarrollado para proporcionar protocolos de control de calidad, los cuales incrementan la precisión y expansión para la aplicación de este sistema.

(12)

El protocolo final consiste en 5 pasos los cuales se presentan en la Figura 13.

Fig. 13 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

PRUEBA DE IRRITACION DERMICA SKINTEX

- * Muestras:
líquidos, sólidos, los materiales insolubles pueden ser estudiados sin diluir
- * Aplicación:
el material de prueba se coloca sin diluir sobre la matriz barrera con la ayuda de discos circulares
- * Procedimiento:
la matriz barrera se inserta dentro del sistema reactivo, todo el sistema se incuba a 25 °C
- * Medición:
la absorbancia se lee espectrofotométricamente.
- * Calibración y Evaluación:
la calibración se realiza con irritantes conocidos, calculando el equivalente SKINTEX / PD II

(16)

El sistema SKINTEX consiste en cuatro protocolos: ensayo de membrana vertical (UMA), ensayo alcalino de membrana (AMA), ensayo de alta sensibilidad (HSA), ensayo de respuesta humana (HRA).

Los cuatro protocolos se enfocan individualmente en una aplicación diferente, emplean la misma matriz barrera y sistema reactivo. Los calibradores que se emplean para generar la curva de referencia para las evaluaciones del potencial de irritación son específicas para cada protocolo.

(12,43)

2.9.6 DESCRIPCION DE LOS PROTOCOLOS

2.9.6.1 ENSAYO DE MEMBRANA VERTICAL (UMA)

El ensayo de membrana vertical UMA está diseñado para analizar materiales y formulaciones que poseen un $\text{pH} < 9.0$.

2.9.6.2 ENSAYO ALCALINO DE MEMBRANA (AMA)

El ensayo alcalino de membrana AMA está diseñado para pruebas de agentes que tienen un $\text{pH} > 9.0$.

(12)

2.9.6.3 ENSAYO DE ALTA SENSIBILIDAD (HSA)

El ensayo de alta sensibilidad HSA es un protocolo especializado diseñado para probar materiales y formulaciones con un valor PD II de 0 a 1.2.

Este protocolo se desarrolló para amplificar los cambios en ambos compartimentos del modelo y proporcionar una medición más exacta de estos cambios.

(12,43)

2.9.6.4 ENSAYO DE RESPUESTA HUMANA (HRA)

El ensayo de respuesta humana fue desarrollado para evaluar las predicciones del modelo SKINTEX con respecto a la irritación humana. Este protocolo ha sido optimizado basándose en diferencias de penetración y respuestas de irritación entre humanos y conejos.

(12)

2.9.7 APLICACION DEL SISTEMA SKINTEX

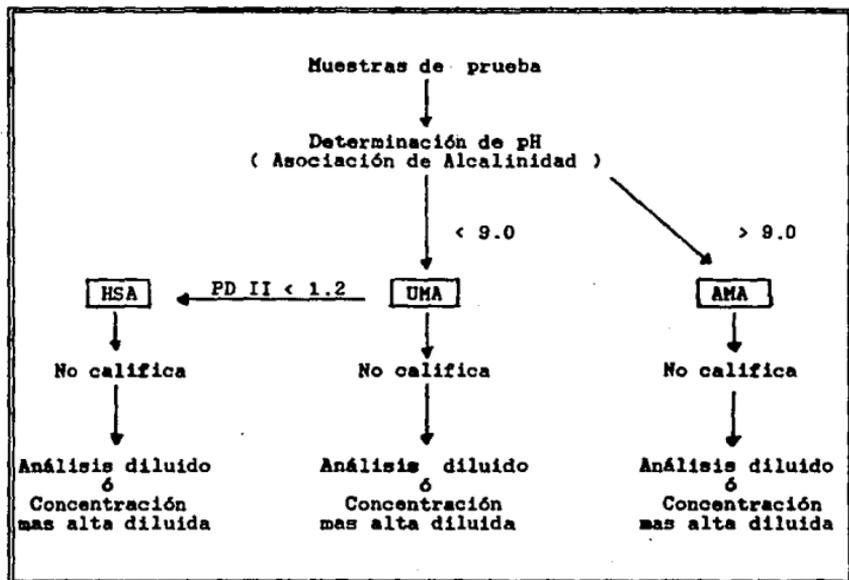
El esquema de uso del protocolo recomendado por Laboratorios ROPAK para los protocolos SKINTEX se describe en el árbol de decisiones de la Figura 14.

Las muestras de prueba son primero sometidas a una evaluación de pH para determinar el uso del AMA con muestras con un pH > 9.0 o el UMA con muestras con un pH < 9.0, si el valor PD II es menor de 1.2 se emplea el HSA.

Si las muestras no califican se realiza un análisis diluido ó la concentración mas alta diluida (HQC).

(43)

Fig. 14 ESQUEMA GENERAL PARA LA EVALUACION DE MUESTRAS EN EL SISTEMA SKINTEX

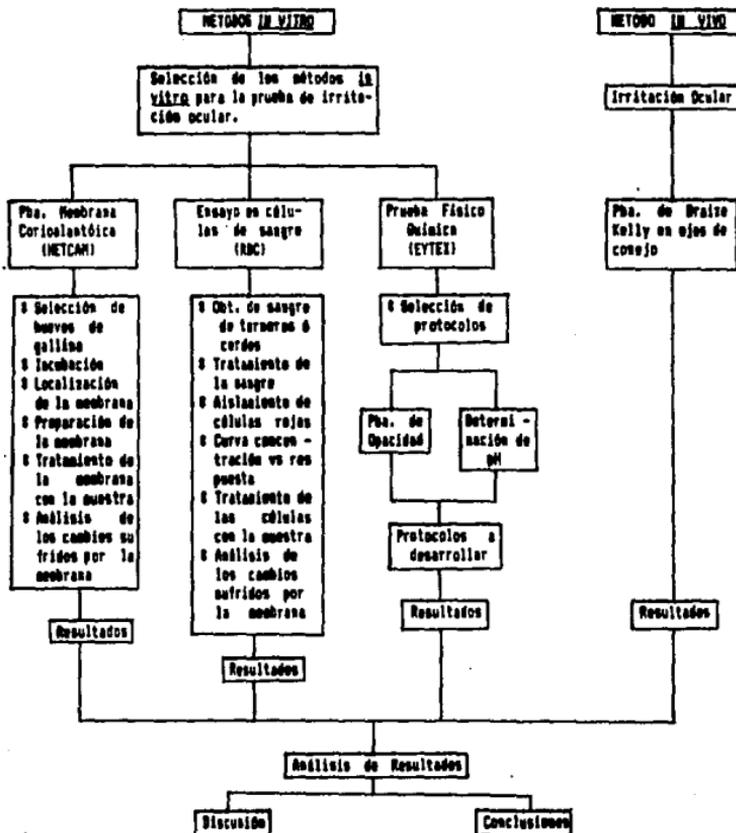


(12,25,43)

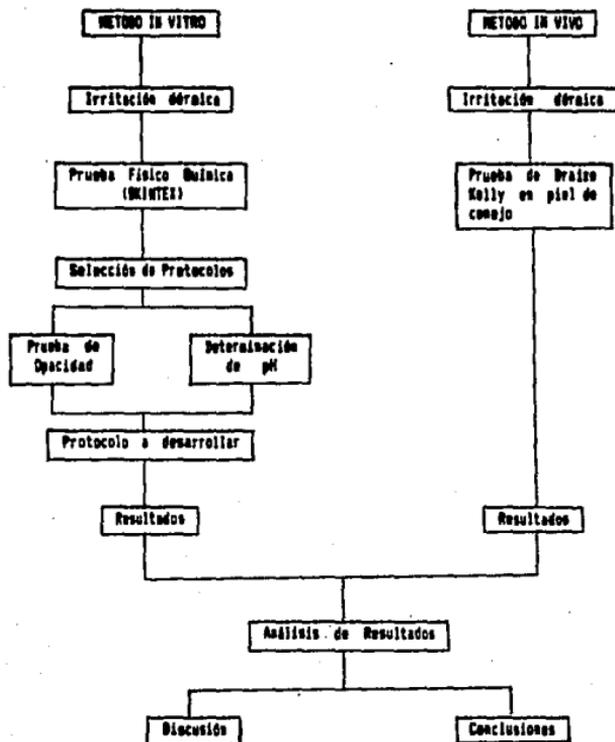
C A P I T U L O I I I

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO DE IRRITACION OCULAR



3.1.1 DIAGRAMA DE FLOJO DE IRRITACION DERMICA



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Huevos fertilizados frescos de gallinas seleccionadas blancas Lohman del tipo Leghorn con un peso promedio de 50 a 60 g. por huevo.
- Células rojas de sangre de terneros o cerdos recién sacrificados.

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos de ensayo
- Matraces Erlenmeyer
- Frascos pequeños de polietileno
- Micropipetas de 20 a 200 μ l
- Soportes para celdillas
- Papel filtro de 8" de diámetro
- Embudo de gran capacidad
- Cilindro graduado
- Papel pH
- Espátulas
- Puntas de micropipeta de 30, 50 y 100 μ l
- Membrana proteica de queratina y colágeno SKINTEX
- Soporte de anillo (disco)
- Celdillas
- Equipo de artículos EYTEX que contiene:
 - a. 3 paquetes con 100 celdillas cada uno de 1.5 ml
 - b. 3 paquetes con puntas de micropipetas de 1.5 ml
 - c. 2 paquetes con puntas de micropipeta de 12.5 ml
 - d. 1 paquete con membranas
 - e. 1 paquete con membranas (bala)
 - f. Tapas de plástico para las celdillas

3.2.3 REACTIVOS

- Solución salina isotónica
- Dodecil Sulfato de Sodio Merck (Estándar Interno)
- Lauril Sulfato de Sodio Merck (Estándar Interno)
- Solución amortiguadora de citratos (citrate de sodio y ác. cítrico 66:44 mmol/ml)
- Reactivo de globulinas y colágeno en polvo SKINTEX
- Agua SKINTEX
- Colorante rojo básico No. 2 SKINTEX
- Equipo de reactivos EYTEX que contiene:
 - a. 6 calibradores numerados (1-6)
 - b. 4 calibradores: Cm0, Cm1, Cm2, Cm3
 - c. 4 calibradores: CR1, CR1, CR2, CR3
 - d. Reactivo en polvo EYTEX
 - e. Diluyente
 - f. Activador
 - g. Vial EYTEX
 - h. Control negativo (Comprobación de inhibición)
 - i. 2 controles de calidad: QC1 y QC2

3.2.4 EQUIPO

- Incubadora con charolas de rotado automático
- Fresa dental con rotor de baja velocidad (12000 a 15000 rpm)
- Estereomicroscopio de alta magnificación
- Centrifuga (Eppendorf type 5415) 10000 rpm
- Espectrofotómetro con filtros para mediciones a 500, 530, 540, 560 y 575 nm, de doble rayo
- Incubadora (Scientific Products)
- Dosificador con micropipetas de 250 µl a 1 ml con incrementos de 250 µl (Eppendorf)
- Pipeta de rocío (Eppendorf)
- Fotocolorímetro (Jenway PC1 6060)

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 PRUEBA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOICA (HETCAM)

a) El día cero, los huevos son recibidos y colocados en incubadora con charolas de rotación automática, en un ambiente controlado de 37.5 +/- 0.5 °C y una humedad relativa de 62 +/- 5 %.

b) El día nueve, son examinados a trasluz para determinar su viabilidad y son colocados nuevamente en la incubadora.

c) El día diez, se abren los huevos en su extremo más ancho, donde se localiza la burbuja de aire, empleando una sierra rotatoria de dentista.

d) La membrana de la cáscara, que descansa directamente sobre la membrana corioalantóica es retirada cuidadosamente humedeciéndola con solución isotónica para facilitar la remoción mecánica, una vez removida, la membrana corioalantóica esta lista para analizar productos.

e) Aplicar el material de prueba en la membrana corioalantóica en forma de una capa delgada (0.1 g si es sólido y 100 microlitros si se trata de un líquido).

f) Realizar las observaciones a simple vista ó usando un estereomicroscopio con mayor amplificación par observar también las reacciones más ligeras.

g) Se registran los tiempos de aparición de hemorragias, lisis vascular y coagulación y se utilizan para calcular los índices de irritación dentro de los 5 minutos siguientes.

h) Evaluación de los datos:

REACCION	CALIFICACION
Vasos capilares más inyectados de lo normal	1
Enrojecimiento con los vasos difícilmente distinguibles	2
Enrojecimiento difuso intenso	3
Enrojecimiento difuso intenso con inflamación	4
Hemorragia generalizada	5

Lisis (destrucción de vasos)	7
Coagulación (desnaturalización proteica con trombosis, decoloración, opacidad y turbidez intra y extra celular)	9

i) Cálculo del índice de irritación:

El tiempo de la primera aparición (en segundos) de las diferentes reacciones fue lo que se registró para calcular el índice de irritación (potencial). El tiempo de prueba es de 5 minutos o 300 segundos.

Índice de irritación:

$$\frac{[(5)(301 \text{ hemorragias})] + [(7)(301 \text{ lisis})] + [(9)(\text{coagulación})]}{300}$$

El índice máximo de irritación: $5+7+9 = 21$ si las reacciones se observan inmediatamente después de la aplicación del producto.

j) Emplear cuatro huevos y dos controles de vehículo por muestra, la calificación final es el valor promedio de los cuatro huevos.

k) Interpretación de los resultados:

INDICE	CLASIFICACION
de 0.0 a 0.9	No irritante
de 1.0 a 4.9	Ligeramente irritante
de 5.0 a 8.9	Moderadamente irritante
de 9.0 a 21.0	Severamente irritante

3.3.2 ENSAYO EN CELULAS ROJAS DE SANGRE (RBC)

1. PREPARACION DE LAS CELULAS ROJAS DE SANGRE

a) Las muestras de sangre se recolectan en frascos de polietileno que contienen una solución amortiguadora de citratos, 50 ml de esta solución se agitan con 450 ml de muestra de sangre para llegar a una concentración final de 1:10 citrato:sangre. Las muestras se mantienen en cajas precalentadas a 21 ó 22 °C durante su transportación al laboratorio (de 20 a 30 minutos).

b) Centrifugar las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Del residuo se elimina el plasma de la superficie por succión, posteriormente se lava varias veces con solución salina amortiguadora de fosfatos para eliminar todo rastro de plasma y células blancas.

c) Las células rojas se mantienen en refrigeración a 4 °C hasta que se necesiten para los ensayos.

2. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

A. HEMOLISIS

a) Tomar alícuotas de la suspensión de células rojas a una concentración de 0.125 mmol/l de oxihemoglobina y preparar diluciones de dodecil sulfato de sodio a partir de una solución de 1000 ppm.

b) Mezclar cada alícuota de células rojas con las diluciones de dodecil sulfato de sodio e incubarlas por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto.

c) El sobrenadante se lee fotométricamente para hemólisis a 530 ó 560 nm al igual que el blanco y control para evitar traslaparse con desnaturalización de proteínas.

d) La liberación total de hemoglobina de las células rojas de sangre se determina al 100 %, la liberación fraccional causada por cada muestra será expresada en porcentaje relativo a la liberación máxima de hemoglobina.

e) La concentración media máxima efectiva (H50) se calcula a partir de las curvas concentración vs respuesta y definidas como la concentración a la cual 50 % de células rojas son dañadas para producir hemólisis.

f) Preparar al menos 8 concentraciones equidistantes de dodecil sulfato de sodio (en ppm) y de las muestras, incubando con células rojas de sangre por triplicado.

B. DESNATURALIZACION DE PROTEINAS

a) Preparar soluciones de dodecil sulfato de sodio y de las muestras a una concentración final de 1 % e incubarlas a temperatura ambiente por 10 minutos con una alícuota de células rojas de sangre ajustada a la concentración de oxihemoglobina previamente descrita.

b) Agitar vigorosamente y centrifugar a 10000 rpm, el sobrenadante se lee a 540 y 575 nm. La absorbancia medida a 575 nm se divide entre la absorbancia medida a 540 nm para obtener el llamado / - radio, el cual se usa para caracterizar el índice de desnaturalización de proteínas (DI).

c) Para la oxihemoglobina, el radio (R_1) fue de 1.05, mientras que el estándar interno (dodecil sulfato de sodio) a 3.47 mmol/l como concentración final, da el radio (R_2). La diferencia entre R_1 y R_2 es definida como igual al 100 % de desnaturalización de oxihemoglobina, y es usado para calcular el potencial de desnaturalización individual de las muestras de acuerdo a la siguiente formula:

$$DI = 100 (R_1 - R_2) / (R_1 - R_2) \quad (\%)$$

Donde R_i es el radio obtenido de la muestra en estudio.

d) El resultado del índice de desnaturalización se usa para comparar con el valor de irritación ocular de la evaluación in vivo.

e) La relación entre hemólisis (H_{50}) e índice de desnaturalización (DI) se define como cociente lisis / desnaturalización (L/D), calculado para cada muestra y también usado para comparar con el efecto irritante in vivo.

3. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

<u>IRRITACION OCULAR</u> <u>IN VIVO</u>	<u>VALOR L/D</u> <u>IN VITRO</u>
No irritante	> 100
Ligeramente irritante	> 10
Moderadamente irritante	> 1
Irritante	> 0.3
Muy irritante	< 0.3
Severamente irritante	< 0.1

3.3.3 ENSAYO DE DESNATURALIZACION DE PROTEINAS (EYTEX)

3.3.3.1 PROTOCOLO ESTANDAR EYTEX-STD

a) Para determinar si este es el protocolo adecuado, se deberá desarrollar lo siguiente: Se colocan 100 μ l ó 100 mg de la muestra en 1 ml de disolvente en una celdilla. Se ajusta el colorímetro a cero con una celdilla blanco Bo que contenga sólo disolvente, después se lee la muestra a 400 nm, si la absorbancia es mayor de 0.5 se deberá optar por la técnica de membrana de partición (EYTEX-MPA).

b) Determinar el pH de la muestra diluida, si éste es mayor de 8 se lleva a cabo una modificación del protocolo STD y MPA, que indican que no se debe emplear activador, o bien, emplear el protocolo AMA específico para este tipo de muestras.

c) Preparar una solución del reactivo proteico añadiendo la mitad del agua al reactivo en polvo, agitar vigorosamente hasta la disolución del polvo. Adicionar la otra mitad del agua al reactivo. Filtrar y transferir el reactivo empleando una pieza de papel filtro ajustada al embudo, dejar filtrar lentamente, recibir el filtrado en el vial vacío, etiquetar con la fecha de elaboración. El reactivo es estable por 30 días almacenado de 4 a 8 $^{\circ}$ C.

d) Para activar el reactivo añadir el activador en proporciones 1X, 3X y 5X. Si el pH es menor de 8 se adiciona 1X, es decir 0.5 ml de activador a 25 ml de reactivo preparado (la activación se efectúa antes de cada ensayo), si se va a hacer en proporción 3X se adicionan 1.5 ml de activador y si es 5X, 2.5 ml de activador. Si el pH es mayor de 8 no se activa el reactivo.

e) Analizar las muestras a tres concentraciones: 100, 50 y 30 μ l.

f) Aplicar los reactivos y muestras como se indica en la Tabla No. 1

g) Tapar todas las celdillas y agitar cada una vigorosamente por 10 segundos. Incubar por 1 hr a 25 $^{\circ}$ C. Agitar todas las celdillas vigorosamente después de la incubación. Tener cuidado de que la superficie de cada celdilla este limpia.

h) Tomar las lecturas en el fotocolorímetro. Ajustar el equipo a cero con la celdilla blanco del diluyente Bo. Leer la celdilla blanco del reactivo So y ajustar el equipo nuevamente a cero. Leer cada una de las celdillas que contienen los calibradores y muestras.

i) Si la lectura del blanco es mayor de 500 el resultado no califica. Analizar la muestra con el protocolo EYTEX-MPA.

TABLA No. 1
APLICACION DE LOS REACTIVOS DEL PROTOCOLO STD

CELDA/DILUYENTE	CALIBRACIONES						REACTIVO	MUESTRA CONTROL	MUESTRA
	1	2	3	4	5	6			
B0	1 ml								
S0	100 µl						1 ml		
C1		100 µl					1 ml		
C2			100 µl				1 ml		
C3				100 µl			1 ml		
C4					100 µl		1 ml		
C5						100 µl	1 ml		
C6							100 µl	1 ml	
QC1								100 µl	
QC2								100 µl	
MC1								100 µl	
MC2								100 µl	
S100	1 ml								100 µl
S50	1 ml								50 µl
S30	1 ml								30 µl
S100							1 ml		100 µl
S50							1 ml		50 µl
S30							1 ml		30 µl

j) Calcular el valor EYTEX delta: lectura de la muestra - lectura del blanco = valor EYTEX delta.

k) Si el valor EYTEX delta es menor de -15 el resultado no califica. Analizar la muestra con el protocolo MPA.

l) Si el valor EYTEX delta de la muestra es inferior al valor de C4, comprobar inhibición:

* Adicionar 100 µl del control negativo en la celdilla de la muestra, mezclar vigorosamente e incubar por 10 minutos a 25 °C.

* Ajustar el equipo a cero con la celdilla blanco del reactivo S0 y leer la celdilla de la muestra.

* Si la lectura es menor que C4 la muestra es inhibida y el resultado no califica. La muestra puede ser analizada empleando el activador del protocolo STD en una proporción de 3X y si no califica emplear el activador 5X.

m) Clasificar los resultados de cada muestra que calificó. Trazar la curva de calibración con las anotaciones escritas en el reporte y localizar los puntos. Posteriormente leer la opacidad de cada dosis de muestra sobre la curva de calibración y realizar una línea vertical. Determinar la equivalencia EYTEX/DRAIZE para cada dosis.

3.3.3.2 PROTOCOLO ENSAYO EN MEMBRANA DE PARTICION EYTEX-MPA

- a) Determinar el pH y preparar el reactivo como se indica en los incisos b y c del protocolo STD.
- b) Analizar las muestras a tres concentraciones: 100,50 y 30 µl. Si la muestra es sólida colocar 100,50 y 30 mg.
- c) Aplicar el reactivo y diluyente como se indica en la Tabla No. 2

TABLA No. 2
APLICACION DE LOS REACTIVOS DEL PROTOCOLO MPA

CÉLULA	DILUYENTE	C ALUMINUMOS			REACTIVO	MUESTRA CENTRAL	MUESTRA
		1	2	3			
Ro	1 ml				1 ml		
CRo		100 µl			1 ml		
CR1			100 µl		1 ml		
CR2				100 µl	1 ml		
CC1					1 ml	100 µl	
CC2					1 ml	100 µl	
CC3	1 ml						
CC4	1 ml						
CC5	1 ml					100 µl	
CC6	1 ml					30 µl	
CC7	1 ml					30 µl	
CC8	1 ml					30 µl	
CC9					1 ml	100 µl	
CC10					1 ml	30 µl	
CC11					1 ml	30 µl	

d) Inserción de la membrana:

- * Limpiar la punta de un marcador con alcohol, enjuagar con agua destilada y dejar secar.
- * Colocar la membrana en la punta limpia e insertarla dentro de la celdilla hasta el fondo y retirar el marcador.
- * Asegurarse de que las esquinas de la membrana estén extendidas mas allá de la orilla de la celdilla en todas direcciones.
- * Mantener las membranas dentro de su bolsa de plástico en un refrigerador con temperatura de 4 a 8 °C.

e) Aplicar los calibradores y muestras como se indica en la Tabla No. 2

f) Tapar las celdillas lentamente, dar un golpecito a cada una en posición invertida para asegurar que cierre herméticamente. Incubar las celdillas en posición invertida por 24 hr a 25 °C.

g) Después de la incubación, agitar todas las celdillas 15 seg. y colocarlas en el soporte en posición normal.

h) Realizar las mediciones en el fotocolorímetro. Ajustar el equipo con la celdilla blanco del diluyente Bo, leer la celdilla blanco del reactivo CMo y ajustar nuevamente a cero. Leer cada uno de los calibradores y muestras.

i) Inspeccionar cada membrana, si ésta se encuentra dañada la muestra debe ser repetida y el resultado no califica.

j) Si la muestra blanco da una lectura mayor de 500, la muestra debe realizarse a menor concentración y el resultado no califica.

k) Calcular el valor EYTEX delta inciso j protocolo STD, si este valor es menor de -15 el resultado no califica. Analizar la muestra con el protocolo MPA 3X.

l) Si el valor EYTEX delta es inferior al valor de CM2, comprobar inhibición, inciso l protocolo STD.

3.3.3.3 PROTOCOLO ENSAYO EN MEMBRANA RAPIDA EYTEX-RMA

a) Preparar el reactivo como indica el inciso c protocolo STD. El reactivo se activa empleando la proporción 1X.

b) Aplicar los reactivos y muestras como se indica en la Tabla No. 3. Si la muestra a analizar es sólida se emplean mg en lugar de µl.

TABLA No. 3
APLICACION DE LOS REACTIVOS DEL PROTOCOLO RMA

CELDILLA DILUYENTE	C ALIBRACIONES			REACTIVO	MUESTRA CONTROL	MUESTRA
	1	2	3			
Bo	1 ml			100 µl		
CRo				1 ml		
CR1		100 µl		1 ml		
CR2		100 µl		1 ml		
CR3			100 µl	1 ml		
QC1				1 ml	100 µl	
QC2				1 ml	100 µl	
BC1	1 ml					
BC2	1 ml					
B100						100 µl
B50						50 µl
B30						30 µl
S100				1 ml		100 µl
S50				1 ml		50 µl
S30				1 ml		30 µl

c) Tapar las celdillas lentamente e incubarlas por 4 hr a 25 °C.

d) Después del período de incubación remover las balas de membrana y revisar si se encuentran lesionadas. Si la membrana resultó dañada se repite el ensayo y el resultado no califica.

e) Realizar las mediciones en el fotocolorímetro, ajustando el equipo a cero con las celdillas blanco de diluyente Bo y blanco del reactivo CRo.

f) Realizar lo indica en los incisos j y k protocolo STD.

g) Si el valor EYTEX delta es menor de -15 el resultado no califica. Si el valor EYTEX delta de la muestra es inferior al valor de CR2, comprobar inhibición, inciso l protocolo STD.

h) Trazar una curva como se indica en el inciso m protocolo STD.

1) Interpretación de los resultados:

La clasificación de irritación In Vitro corresponde con la In Vivo extrapolada de la curva y debe leerse así:

DRAIZE

RANGO	CLASIFICACION
0	No Irritante
0.1 - 2.9	NI / Mínimo
3.0 - 15.0	Mínimo Irritante
15.1 - 25.0	Ligeramente Irritante
25.1 - 50.0	Moderadamente Irritante
50.1 - 80.0	Severamente Irritante
80.1 - 110.0	Extremadamente Irritante

RYTEX

RANGO	CLASIFICACION
0.0 - 3.0	No Irritante
3.1 - 12.0	Mínimo Irritante
12.1 - 16.0	Mínimo / Ligero
16.1 - 28.0	Ligeramente Irritante
28.1 - 54.0	Moderadamente Irritante
> 54	Severamente Irritante

3.3.4 ENSAYO MEMBRANA REACTIVO (SKINTEX)

1. PREPARACION DE LAS MATRICES

a) Preparar una solución salina estabilizada a pH 8.0 de 10% de queratina, 1% de colágeno, 0.1% de glutaraldehído y acetato de celulosa suficiente; dejar a 25 °C durante 1 hr, a esta preparación, se le adiciona colorante rojo básico No. 2 y se deja 10 minutos a 25 °C.

b) Las películas que se forman se lavan exhaustivamente con agua destilada, se cortan en círculos y se montan en soportes de disco guardándose en recipientes de plástico a 4 °C, conservándose así hasta 180 días.

2. PREPARACION DEL REACTIVO

a) El polvo liofilizado de globulinas, colágeno, glicosamiglicanos, ácidos grasos libres, aminoácidos, fosfolípidos y sales amortiguadoras se rehidrata y se conserva a 4 °C. El reactivo rehidratado se conserva estable por 15 días.

3. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

a) Emplear tres calibradores con PD II in vivo conocido en cada ensayo. Trazar una curva de calibración relacionando la absorbancia para el índice de irritación dérmica primaria (PD II). La absorbancia de la muestra es leída en el eje Y y el equivalente SKINTEX / PD II es leído como el valor correspondiente en el eje X.

b) Preparar las muestras a dosis de 30, 50 y 100 µl y aplicarlas directamente en la barrera, luego ésta se inserta en el reactivo y se incuba por 3 hr a 25 °C.

c) Determinar la absorbancia a 470 nm en un fotocolorímetro, extrapolar en la curva de dosis vs respuesta y leer como el equivalente de la prueba in vitro y el índice de irritación dérmica in vivo.

d) Interpretación de los resultados:

La clasificación de irritación dérmica in vitro corresponde directamente con la clasificación in vivo (en piel de conejo), así:

PRUEBA IN VIVO	PRUEBA IN VITRO	CALIFICACION IN VIVO	CALIFICACION IN VITRO
0.0 a 0.5	0.0 a 0.5	No irritante	Minimo irritante
0.5 a 1.5	0.5 a 1.5	Ligeramente irritante	Levemente irritante
1.5 a 3.0	1.5 a 2.0	Levemente irritante	Levemente irritante
	2.0 a 3.0	Levemente irritante	Moderadamente irritante
3.0 a 5.0	3.0 a 5.0	Moderadamente irritante	Moderadamente irritante
5.0 o más	5.0 o más	Severamente irritante	Severamente irritante

3.4 ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados serán analizados estadísticamente, para lo cual se aplicará el método estadístico que incluye la prueba de distribución normal, lo cual permitirá aceptar la hipótesis nula siguiente:

Hipótesis nula (H₀)

Los métodos in vitro proporcionan una evaluación mas precisa en comparación con los métodos in vivo en la determinación de irritación ocular y dérmica de productos cosméticos.

1. Calcular con los datos obtenidos a través de los métodos in vivo e in vitro la siguiente medida de tendencia central y dispersión:

* Medida de tendencia central (Media)

$$\bar{X} = \frac{\sum m_i \cdot f_i}{\sum f_i}$$

* Medida de dispersión (Desviación estándar)

$$S = \sqrt{\frac{\sum (m_i - \bar{x})^2 \cdot f_i}{\sum f_i - 1}}$$

2. Distribución normal.

Con frecuencia a esta distribución se le nombra distribución gaussiana. La densidad normal está dada por la expresión:

$$Z = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-(y-\mu)^2 / 2}$$

En ella Z indica la altura de la ordenada de la curva, que representa la densidad. Es la variable dependiente de la expresión, siendo función de la variable.

C A P I T U L O I V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 RESULTADOS DE IRRITACION OCULAR

Para realizar las pruebas de irritación ocular se emplearon cinco productos cosméticos, cada uno de los cuales se analizó diez veces por cada métodos in vitro.

A continuación se enlistan los productos cosméticos analizados, y posteriormente los resultados obtenidos por cada uno de los métodos.

1. Removedor de maquillaje para ojos
2. Crema limpiadora (gel jabonoso)
3. Shampoo
4. Máscara
5. Shampoo para el cuerpo

4.1.1 PRUEBA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOICA (HET-CAM)

Los resultados de la prueba de la membrana corioalantóica se reportan en la Tabla I, y son el promedio de los cuatro huevos empleados por análisis.

TABLE I

COMPARACION DE LOS VALORES OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOICA CON LOS VALORES DE IRRITACION IN VIVO

MUESTRA		IRRITACION <u>IN VITRO</u>	CLASIFICACION	IRRITACION <u>IN VIVO</u>	CLASIFICACION
Removedor de maquillaje para ojos	1	2.7	Lig	2.0	NI / Min
	2	2.5	Lig	1.6	NI / Min
	3	2.6	Lig	2.4	NI / Min
	4	2.8	Lig	2.8	NI / Min
	5	2.7	Lig	2.0	NI / Min
	6	2.7	Lig	1.2	NI / Min
	7	2.6	Lig	2.4	NI / Min
	8	2.6	Lig	2.1	NI / Min
	9	2.7	Lig	2.4	NI / Min
	10	2.6	Lig	1.7	NI / Min
Crema limpiadora (removedor de maquillaje gel jabonoso)	1	3.6	Lig	15.1	Lig
	2	3.7	Lig	15.5	Lig
	3	3.3	Lig	15.0	Lig
	4	3.8	Lig	14.9	Lig
	5	3.5	Lig	15.5	Lig
	6	3.6	Lig	15.8	Lig
	7	3.5	Lig	14.6	Lig
	8	3.4	Lig	15.8	Lig
	9	3.5	Lig	16.2	Lig
	10	3.5	Lig	15.0	Lig
Shampoo	1	4.9	Lig / Mod	25.0	Lig / Mod
	2	5.1	Lig / Mod	24.7	Lig / Mod
	3	5.0	Lig / Mod	25.0	Lig / Mod
	4	5.2	Lig / Mod	25.0	Lig / Mod
	5	5.1	Lig / Mod	24.9	Lig / Mod
	6	5.0	Lig / Mod	25.0	Lig / Mod
	7	5.3	Lig / Mod	25.1	Lig / Mod
	8	5.1	Lig / Mod	24.9	Lig / Mod
	9	5.2	Lig / Mod	24.4	Lig / Mod
	10	5.1	Lig / Mod	25.2	Lig / Mod

TABLA I
CONTINUACION

MUESTRA		IRRITACION <u>IN VITRO</u>	CLASIFICACION	IRRITACION <u>IN VIVO</u>	CLASIFICACION
Máscara	1	0.5	NI	0.5	NI
	2	0.3	NI	0.7	NI
	3	0.3	NI	0.3	NI
	4	0.4	NI	0.0	NI
	5	0.3	NI	0.5	NI
	6	0.2	NI	0.8	NI
	7	0.4	NI	0.7	NI
	8	0.1	NI	0.3	NI
	9	0.2	NI	1.0	NI
	10	0.3	NI	0.5	NI
Shampoo para el cuerpo	1	4.0	Lig	22.7	Lig
	2	3.8	Lig	22.4	Lig
	3	4.1	Lig	21.8	Lig
	4	3.9	Lig	22.1	Lig
	5	3.8	Lig	22.7	Lig
	6	4.0	Lig	23.1	Lig
	7	4.1	Lig	22.6	Lig
	8	3.8	Lig	22.4	Lig
	9	3.9	Lig	22.9	Lig
	10	3.9	Lig	22.1	Lig

NI = No Irritante; Min = Mínimo Irritante; Lig = Ligeramente Irritante;
Mod = Moderadamente Irritante.

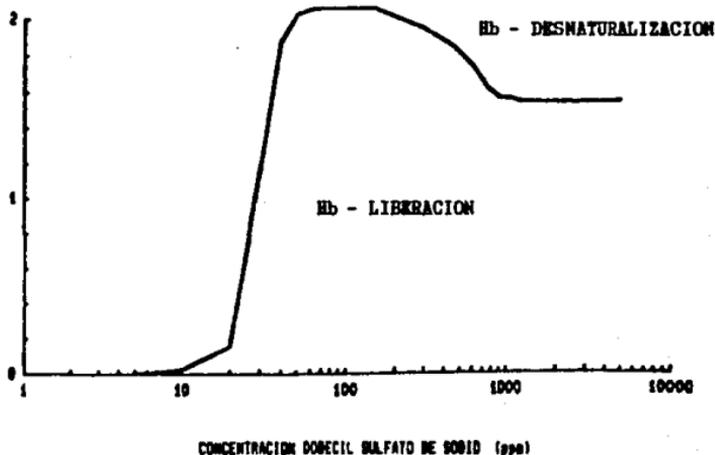
4.1.2 ENSAYO EN CELULAS ROJAS DE SANGRE (RBC - ASSAY)

La curva de concentración vs respuesta para la hemólisis y para la actividad desnaturizante de la hemoglobina del dodecil sulfato de sodio (SDS) al ser incubadas con alícuotas de células rojas de sangre (RBC) de ternera se muestran en la Gráfica I.

GRAFICA I

INFLUENCIA DEL INCREMENTO EN LA CONCENTRACION DE DODECIL SULFATO DE SODIO EN LA DENSIDAD OPTICA DE CELULAS ROJAS DE TERNERA IN_VITRO

ABSORBANCIA A 540 m



En los valores de concentración de 1 a 10 ppm, el SDS no tiene efecto hemolítico sobre los RBC, pero las concentraciones entre 10 y 60 ppm provocan un aumento en la actividad óptica, lo que crea una fuerte pendiente en la curva concentración vs respuesta.

La incubación de RBC con concentraciones superiores a 100 ppm no originan un aumento en la hemólisis total medida a 540 nm sino que, por el contrario, la saturación con SDS origina una disminución típica de la densidad óptica debido a la desnaturalización de la hemoglobina oxigenada original.

Como la liberación de hemoglobina causada por la hemólisis a bajas concentraciones del surfactante se sobrepone con el inicio de la desnaturalización de la hemoglobina, se observaron dos patrones de absorbancia a 540 nm y 575 nm respectivamente.

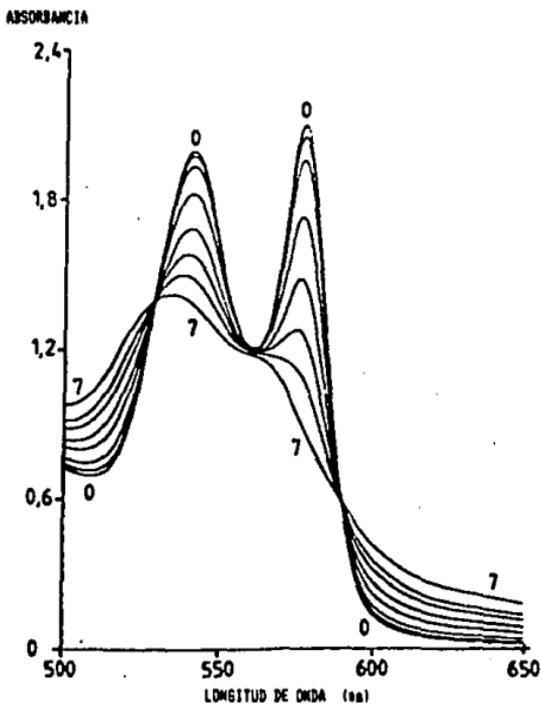
En la Gráfica II se muestran siete espectros correspondientes registrados entre las longitudes de onda de 500 a 650 nm después de la incubación con concentraciones adecuadas de SDS.

Los respectivos valores de absorbancia medidos a 540 y 575 nm se usaron para calcular las relaciones alfa - beta de los que se derivó el índice de desnaturalización.

Para el estándar interno SDS, se calculó la mitad de la concentración máxima para causar hemólisis a 2.0×10^8 RBC/ml con un valor de 0.10 ± 0.012 mmol/l o 29 ppm; el índice de desnaturalización de 100 % se detectó a una concentración de 3.47 mmol/l de SDS.

GRAFICA II

CAMBIOS ESPECTROFOTOMETRICOS DE LA ABSORBANCIA DE HEMOGLOBINA



Basándose en los resultados obtenidos con el SDS, se investigó el potencial hemolítico y desnaturalizante de cinco productos cosméticos. Los resultados aparecen en la Tabla II, siendo estos los promedios del análisis por triplicado.

TABLA II

COMPARACION DE LOS VALORES DE HEMOLISIS (H₅₀) E INDICE DE DESNATURALIZACION (ID) EVALUADOS EN EL ENSAYO RBC CON LOS VALORES DE IRRITACION OCULAR IN VIVO

NUESTRA	H ₅₀ (ppm)	ID	L/D RADIO	CLASIFICACION IN VITRO	CLASIFICACION IN VIVO	
Removedor de maquillaje para ojos	1	120	10	12.0	Lig	NI / Min
	2	121	10	12.1	Lig	NI / Min
	3	120	10	12.0	Lig	NI / Min
	4	121	10	12.1	Lig	NI / Min
	5	120	10	12.0	Lig	NI / Min
	6	121	10	12.1	Lig	NI / Min
	7	121	10	12.1	Lig	NI / Min
	8	120	10	12.0	Lig	NI / Min
	9	121	10	12.1	Lig	NI / Min
	10	120	10	12.0	Lig	NI / Min
Crema limpiadora (removedor de maquillaje gel jabonoso)	1	130	8	16.2	Lig	Lig
	2	131	8	16.3	Lig	Lig
	3	130	8	16.2	Lig	Lig
	4	131	8	16.3	Lig	Lig
	5	130	8	16.2	Lig	Lig
	6	129	8	16.1	Lig	Lig
	7	129	8	16.1	Lig	Lig
	8	131	8	16.3	Lig	Lig
	9	130	8	16.2	Lig	Lig
	10	130	8	16.2	Lig	Lig
Shampoo	1	75	9	8.3	Lig / Mod	Lig / Mod
	2	75	9	8.3	Lig / Mod	Lig / Mod
	3	74	9	8.2	Lig / Mod	Lig / Mod
	4	75	9	8.3	Lig / Mod	Lig / Mod
	5	74	9	8.2	Lig / Mod	Lig / Mod
	6	75	10	7.5	Lig / Mod	Lig / Mod
	7	74	9	8.2	Lig / Mod	Lig / Mod
	8	74	9	8.2	Lig / Mod	Lig / Mod
	9	74	9	8.2	Lig / Mod	Lig / Mod
	10	74	9	8.2	Lig / Mod	Lig / Mod

TABLA II
CONTINUACION

NUESTRA	NSO	ID	L/D	CLASIFICACION	CLASIFICACION	
	(ppm)		RADIO	IN VITRO	IN VIVO	
Mascara	1	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	2	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	3	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	4	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	5	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	6	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	7	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	8	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	9	No Lisis	< 1	---	NI	NI
	10	No Lisis	< 1	---	NI	NI
Shampoo para cuerpo	1	180	7	25.7	Lig	Lig
	2	182	7	26.0	Lig	Lig
	3	180	7	25.7	Lig	Lig
	4	181	7	25.8	Lig	Lig
	5	180	7	25.7	Lig	Lig
	6	181	7	25.8	Lig	Lig
	7	180	7	25.7	Lig	Lig
	8	180	7	25.7	Lig	Lig
	9	181	7	25.8	Lig	Lig
	10	180	7	25.7	Lig	Lig

NI = No Irritante; Min = Minimo Irritante; Lig = Ligeramente Irritante;
Mod = Moderadamente Irritante.

4.1.3 ENSAYO DE DESNATURALIZACION DE PROTEINAS (EYTEX)

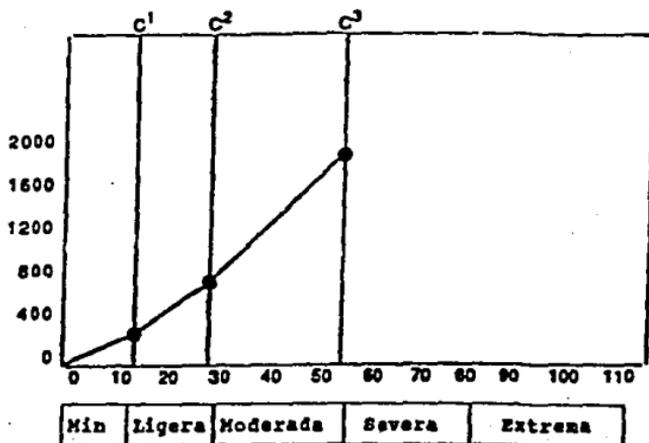
La agregación de proteínas en el método EYTEX se cuantificó mediante la medición de la absorbancia a 400 nm; el potencial de irritación de las muestras se evaluó aplicando los datos a una curva de calibración realizada con calibradores específicos para cada protocolo.

A continuación se muestran las curvas de calibración efectuadas. Gráficas III y IV.

GRAFICA III

CURVA DE CALIBRACION PARA LA EVALUACION DEL POTENCIAL DE IRRITACION

ABSORBANCIA $\times 10^3$

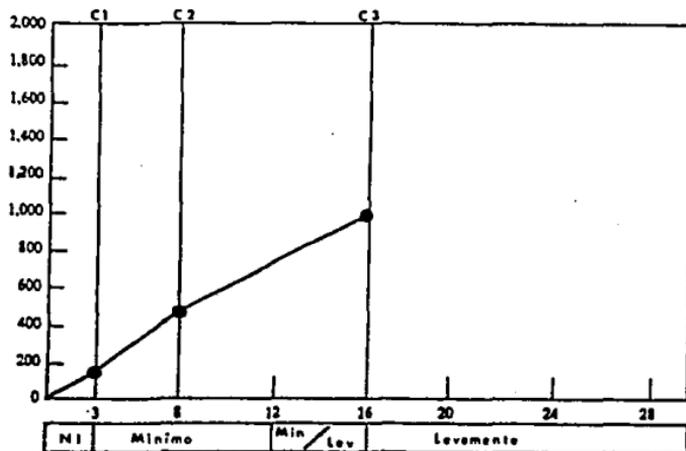


EQUIVALENTE DE EYTEX / DRAIZE

GRAFICA IV

CURVA DE CALIBRACION PARA LA EVALUACION DE MUESTRAS ASOCIADAS CON UN POTENCIAL DE IRRITACION BAJO (CALIFICACION DRAIZE DE 0 A 16)

ABSORBANCIA = 10^3



EQUIVALENTE DE EYTEX / DRAIZE

Los calibradores, blancos y dosis de muestras que conforman el método EYTEX fueron leídas fotométricamente, anotándose los resultados en hojas de reporte especiales para el método; posteriormente fue leída la opacidad de cada dosis de muestra sobre la curva de calibración y se realizó una línea vertical para determinar el equivalente EYTEX / Draize para cada dosis. Un ejemplo se muestra en la Figura 1.

Figura 1

ACONTINUACION SE MUESTRA EL REPORTE DE UNO DE LOS ANALISIS REALIZADOS AL SHAMPOO.

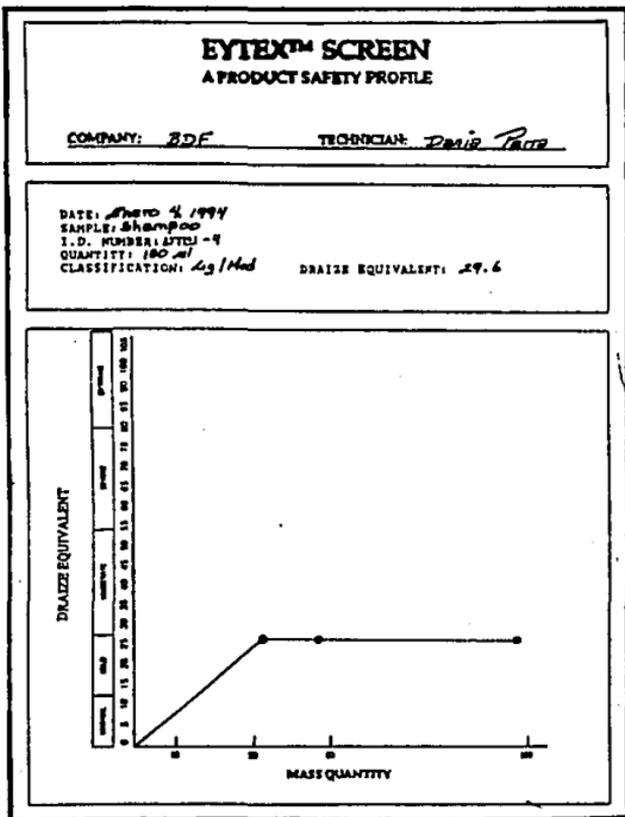
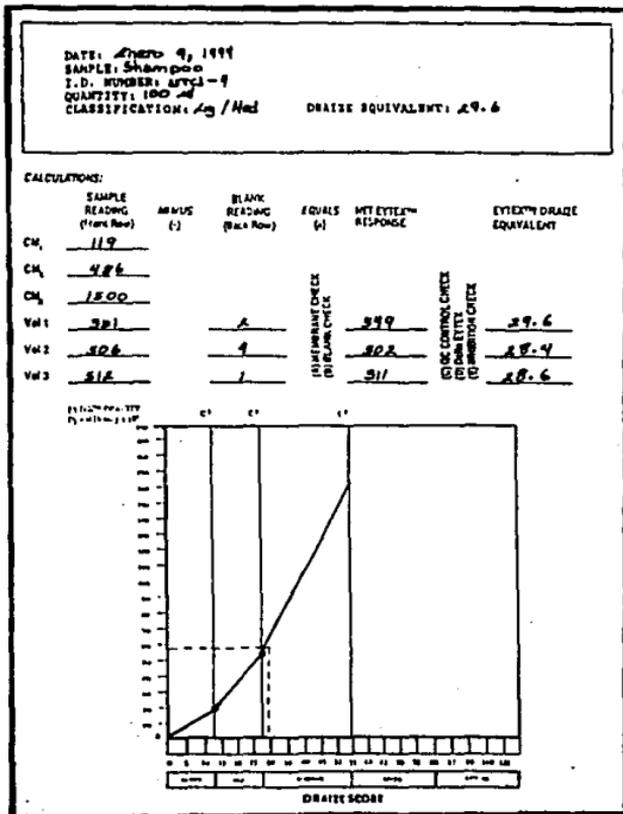


Figura 1
CONTINUACION



Los resultados obtenidos por el método EYTEX se muestran en la Tabla III.

TABLA III

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO EYTEX CON LOS RESULTADOS IN VIVO

MUESTRA		EYTEX			DRAIZE
		PROTOCOLO	RIE	CLASIFICACION	CLASIFICACION
Removedor de maquillaje para ojos	1	MPA, HSA	3.5	NI / Min	NI / Min
	2		3.5	NI / Min	NI / Min
	3		3.5	NI / Min	NI / Min
	4		3.6	NI / Min	NI / Min
	5		3.5	NI / Min	NI / Min
	6		3.4	NI / Min	NI / Min
	7		3.5	NI / Min	NI / Min
	8		3.5	NI / Min	NI / Min
	9		3.4	NI / Min	NI / Min
	10		3.5	NI / Min	NI / Min
Crema limpiadora (removedor de maquillaje gel jabonoso)	1	STD, RMA	19.8	Lig	Lig
	2		19.8	Lig	Lig
	3		19.9	Lig	Lig
	4		19.9	Lig	Lig
	5		20.0	Lig	Lig
	6		19.7	Lig	Lig
	7		20.0	Lig	Lig
	8		19.9	Lig	Lig
	9		19.9	Lig	Lig
	10		19.9	Lig	Lig

TABLA III
CONTINUACION

MUESTRA		EYTEX			DRAIZE
		PROTOCOLO	RIE	CLASIFICACION	CLASIFICACION
Shampoo	1	STD, RMA	29.6	Lig / Mod	Lig / Mod
	2		29.5	Lig / Mod	Lig / Mod
	3		29.5	Lig / Mod	Lig / Mod
	4		29.7	Lig / Mod	Lig / Mod
	5		29.5	Lig / Mod	Lig / Mod
	6		29.6	Lig / Mod	Lig / Mod
	7		29.5	Lig / Mod	Lig / Mod
	8		29.6	Lig / Mod	Lig / Mod
	9		29.4	Lig / Mod	Lig / Mod
	10		29.5	Lig / Mod	Lig / Mod
Máscara	1	HSA	1.1	NI	NI
	2		1.0	NI	NI
	3		1.1	NI	NI
	4		1.1	NI	NI
	5		1.0	NI	NI
	6		1.1	NI	NI
	7		1.0	NI	NI
	8		1.1	NI	NI
	9		1.1	NI	NI
	10		1.1	NI	NI
Shampoo para cuerpo	1	MPA, RMA	21.1	Lig	Lig
	2		21.0	Lig	Lig
	3		21.0	Lig	Lig
	4		21.2	Lig	Lig
	5		21.1	Lig	Lig
	6		21.1	Lig	Lig
	7		21.0	Lig	Lig
	8		21.0	Lig	Lig
	9		21.1	Lig	Lig
	10		21.1	Lig	Lig

NI = No Irritante; Min = Mínimo Irritante; Lig = Ligeramente Irritante; Mod = Moderadamente Irritante; RIE = Equivalente de Irritación Eytex.

4.1.4 ANALISIS ESTADISTICO

Una vez comparados en las tablas anteriores los valores y clasificaciones obtenidas de las muestras por cada uno de los métodos in vitro en relación con los valores y clasificaciones in vivo, se procederá a comparar las desviaciones estándar de los cuatro métodos y así, determinar la reproducibilidad de estos. Tabla IV.

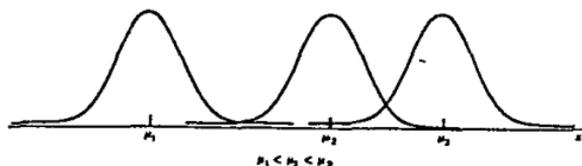
TABLA IV
COMPARACION DE LAS DESVIACIONES ESTANDAR DE LOS TRES METODOS
ALTERNATIVOS IN VITRO Y EL METODO IN VIVO

MUESTRA	METODOS IN VITRO			METODO IN VIVO
	PBA. MEMBRANA CORIONALANTOICA	ENSAYO EN CELULAS ROJAS DE SANGRE	METODO EYTEX	PRUEBA DE BRAIZE KELLY
Reoventor de maquillaje para ojos	0.00	0.05	0.05	0.47
Crema limpiadora (remo- dor de maquillaje gel jabonoso)	0.11	0.07	0.09	0.5
Shampoo	0.11	0.17	0.08	0.41
Mascara	0.11	---	0.04	0.29
Shampoo para el cuerpo	0.11	0.09	0.06	0.41

La distribución normal está determinada completamente por los parámetros μ y σ (media y desviación estándar). En otras palabras, se especifica una distribución normal distinta para cada valor distinto de μ y σ . Los valores distintos de μ trasladan la gráfica de la distribución a lo largo del eje de las x , y los diferentes valores de σ determinan el grado de aplanamiento o levantamiento de la gráfica de la distribución. Figura 2.

Figura 2

- a) 3 distribuciones normales con 3 diferentes medias
- b) 3 distribuciones normales con 3 diferentes desviaciones estándar



a)



b)

Las gráficas de la distribución normal de los datos obtenidos por el análisis in vivo presentan en general una curva amplia y aplanada, lo cual se debe a que la desviación estándar es mayor en comparación a los valores obtenidos in vitro. En la Gráfica V se ejemplifica la curva de distribución normal de una de las muestras analizadas.

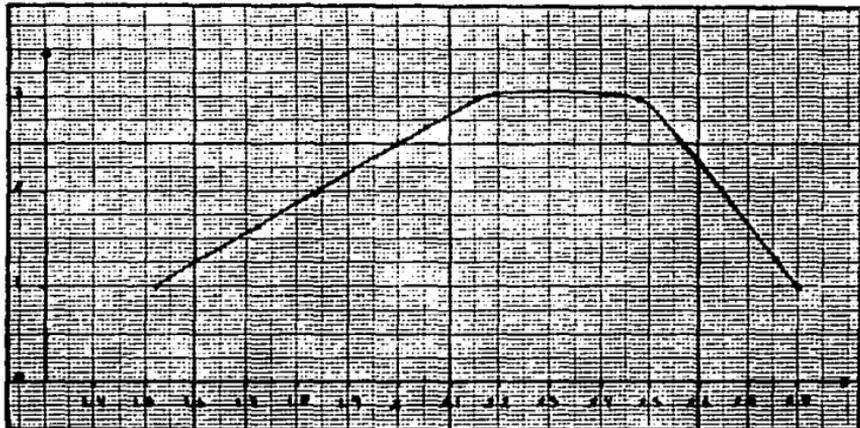
GRAFICA V

GRAFICA DE DISTRIBUCION NORMAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO HET-CAM DE LA MUESTRA CORRESPONDIENTE A REMOVEDOR DE MAQUILLAJE PARA OJOS

Datos:

x	f	LRS	LRI	f	Rango = 1.60	Ancho = 0.32
1.2	1	2.0	2.48	1		
1.6	1	2.48	2.16	3		
1.7	1	2.16	1.84	3		
2.0	2	1.84	1.52	2		
2.1	1	1.52	1.20	1		
2.4	3					
2.8	1					

FRECUENCIA



LIMITE REAL SUPERIOR

Las gráficas de la distribución normal de los datos obtenidos por los métodos in vitro presentan en general una curva muy levantada, debido a que los valores de desviación estándar son inferiores en comparación a los valores obtenidos in vivo. En la Gráfica VI se ejemplifica la curva de distribución normal de una de las muestras analizadas.

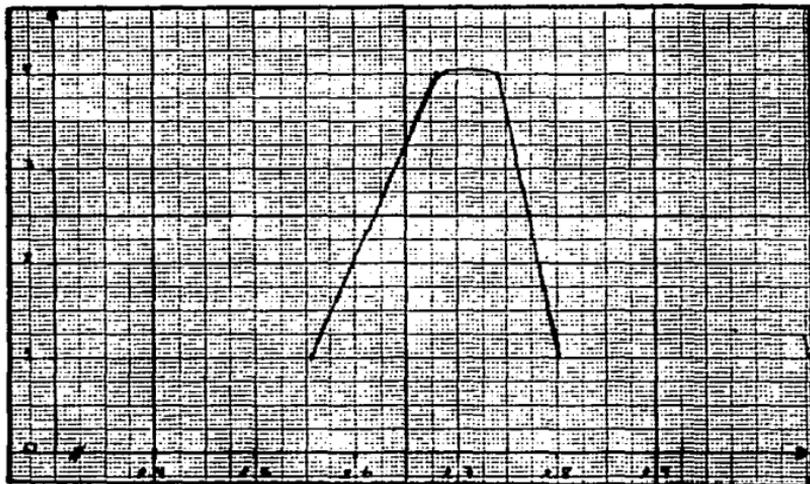
GRAFICA VI

GRAFICA DE DISTRIBUCION NORMAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO HET-CAM DE LA MUESTRA CORRESPONDIENTE A REHVEDOR DE MAQUILLAJE PARA OJOS

Datos:

x	f	LRS	LRI	f	Rango = 0.3	Ancho = 0.06
2.5	1	2.8	2.74	1		
2.6	4	2.74	2.68	4		
2.7	4	2.68	2.56	4		
2.8	1	2.56	2.50	1		

FRECUENCIA



LIMITE REAL SUPERIOR

4.1.5 DISCUSIONES

Los datos obtenidos en el estudio muestran que las tres pruebas alternativas son eficientes en la identificación de irritantes conocidos.

La Prueba de la Membrana Corioalantóica (HET-CAM) presenta una alta correlación en cuatro de las cinco muestras; la muestra que difiere se debe a las diferencias existentes en las escalas de clasificación de ambos métodos, ya que la clasificación in vivo incluye en su escala un rango de valores clasificado como No Irritante / Mínimo y la prueba HET-CAM va directamente del rango No Irritante al Ligeramente Irritante, por tal motivo la diferencia es de un rango de clasificación, sin embargo, esta no es una variación significativa.

En el Ensayo en Células Rojas de Sangre (RBC), se presenta la misma situación que en la prueba HET-CAM con la misma muestra, debido a la misma diferencia en las escalas de clasificación antes mencionadas.

El ensayo de desnaturalización de proteínas (EYTEX) presenta un alto grado de correlación con la prueba in vivo, las cinco muestras y cada uno de sus análisis corresponden adecuadamente.

Con respecto a la comparación de los valores obtenidos por las desviaciones estándar de los métodos, se observa que los tres métodos alternativos in vitro presentan valores de desviación inferiores a los valores in vivo en todas las muestras, lo cual indica que las pruebas in vitro empleadas son reproducibles en mayor grado que la prueba in vivo. Por otra parte, no existe diferencia significativa en cuanto a la desviación de las tres pruebas in vitro, por lo tanto cualquiera de los tres métodos puede ser empleado satisfactoriamente.

Las curvas de distribución normal del ensayo RBC y de la prueba HET-CAM se observaron en la gráfica VI, las curvas obtenidas por el método EYTEX difieren un poco, ya que los valores de desviación estándar son muy pequeños y por tal motivo la curva es menos amplia y mas elevada.

4.2 RESULTADOS DE IRRITACION DERMICA

Se emplearon diez productos cosméticos para la realización de la prueba de irritación dérmica, los cuales se analizaron diez veces por el método in vitro SKINTEX.

A continuación se enlistan los productos cosméticos analizados, y posteriormente los resultados obtenidos.

1. Crema para el contorno de los ojos
2. Crema hidratante (cutis sensible)
3. Antitranspirante
4. Shampoo para el cuerpo
5. Crema corporal (piel normal)
6. Jabón en barra
7. Crema corporal con protección solar
8. Mascarilla hidratante
9. Crema limpiadora (removedor de maquillaje gel jabonoso)
10. Crema facial nutritiva

4.2.1 ENSAYO MEMBRANA REACTIVO (SKINTEX)

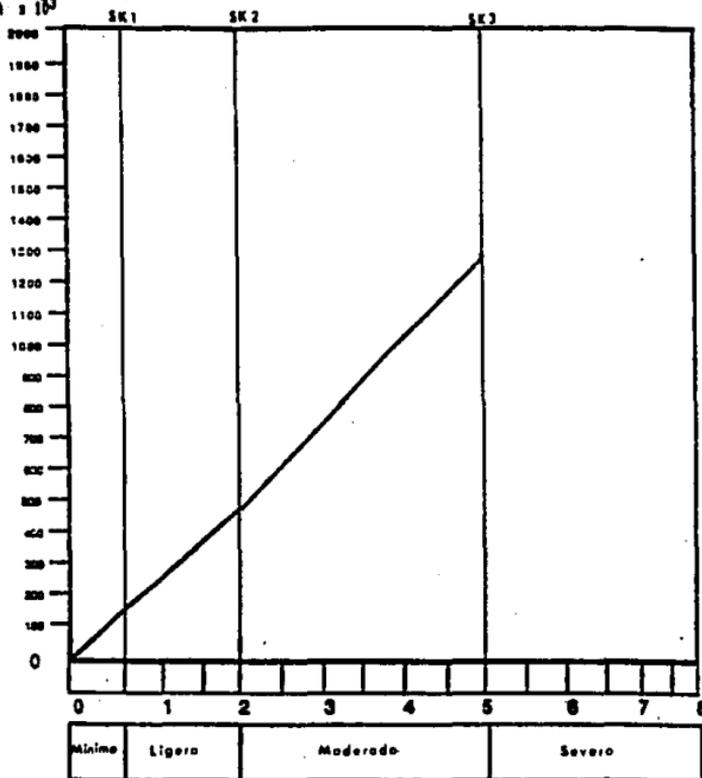
Los cambios en la integridad de la barrera (biomembrana constituida por queratina/colágeno) que producen la liberación del tinte indicador y los cambios en la matriz de macromoléculas que alteran la transparencia del reactivo fueron leídos a 470 nm; el potencial de irritación de las muestras se evaluó aplicando los datos a una curva de calibración efectuada con controles conocidos, relacionando la absorbancia para el índice de irritación dérmica primaria (PD II).

A continuación se muestra la curva de calibración realizada para establecer el sistema de evaluación. Gráfica V.

GRAFICA VII

CURVA DE CALIBRACION PARA LA EVALUACION DEL POTENCIAL DE IRRITACION DERMICA

OPACIDAD SKINTEX
ABSORBANCIA $\times 10^3$



EMULSIONE D1A11E / PD II

Las absorbancias de las muestras fueron leídas en la curva de calibración en el eje Y y el equivalente Draize / PD II fue leído como el valor correspondiente en el eje X.

Los resultados obtenidos por el método Skintex se muestran en la TABLA V y VI.

TABLA V
COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO SKINTEX
CON LOS RESULTADOS IN VIVO

MUESTRA	SKINTEX			DRAIZE	
		PD II	CLASIFICACION	PD II	CLASIFICACION
Crema para el contorno de los ojos	1	0.0	NI	0.4	NI
	2	0.0	NI	0.2	NI
	3	0.1	NI	0.3	NI
	4	0.0	NI	0.0	NI
	5	0.2	NI	0.1	NI
	6	0.1	NI	0.0	NI
	7	0.0	NI	0.2	NI
	8	0.1	NI	0.2	NI
	9	0.0	NI	0.3	NI
	10	0.0	NI	0.2	NI
Crema hidratante (cutis sensible)	1	0.2	NI	0.2	NI
	2	0.1	NI	0.5	NI
	3	0.2	NI	0.3	NI
	4	0.2	NI	0.5	NI
	5	0.1	NI	0.2	NI
	6	0.2	NI	0.3	NI
	7	0.2	NI	0.3	NI
	8	0.1	NI	0.2	NI
	9	0.2	NI	0.3	NI
	10	0.2	NI	0.3	NI

TABLA V
CONTINUACION

MUESTRA	SKINTEX			DRAIZE	
	PD II	CLASIFICACION		PD II	CLASIFICACION
Antitranspirante	1	2.7	Mod	4.0	Mod
	2	2.9	Mod	3.8	Mod
	3	3.0	Mod	4.2	Mod
	4	2.9	Mod	4.1	Mod
	5	2.9	Mod	4.1	Mod
	6	2.9	Mod	3.9	Mod
	7	2.9	Mod	4.1	Mod
	8	2.9	Mod	3.7	Mod
	9	3.0	Mod	4.1	Mod
	10	2.9	Mod	4.1	Mod
Shampoo para el cuerpo	1	2.0	Lig	2.1	Lig
	2	2.0	Lig	2.1	Lig
	3	2.0	Lig	1.8	Lig
	4	1.9	Lig	2.0	Lig
	5	2.0	Lig	1.9	Lig
	6	2.1	Lig	2.1	Lig
	7	2.0	Lig	2.0	Lig
	8	2.0	Lig	2.2	Lig
	9	2.1	Lig	2.3	Lig
	10	2.0	Lig	1.9	Lig
Crema corporal (piel normal)	1	0.2	NI	0.4	NI
	2	0.2	NI	0.1	NI
	3	0.3	NI	0.5	NI
	4	0.2	NI	0.3	NI
	5	0.1	NI	0.4	NI
	6	0.2	NI	0.4	NI
	7	0.2	NI	0.4	NI
	8	0.2	NI	0.2	NI
	9	0.2	NI	0.5	NI
	10	0.2	NI	0.3	NI

TABLA V
CONTINUACION

MUESTRA	SKINTEX		DRAIZE		
	PD II	CLASIFICACION	PD II	CLASIFICACION	
Jabón barra	1	2.0	Lig	2.4	Lig
	2	1.8	Lig	2.1	Lig
	3	2.0	Lig	2.0	Lig
	4	2.0	Lig	2.1	Lig
	5	1.9	Lig	2.5	Lig
	6	2.0	Lig	2.3	Lig
	7	2.0	Lig	2.1	Lig
	8	2.0	Lig	2.3	Lig
	9	1.9	Lig	2.1	Lig
	10	2.0	Lig	2.2	Lig
Crema corporal con protección solar	1	0.2	NI	0.2	NI
	2	0.1	NI	0.1	NI
	3	0.1	NI	0.3	NI
	4	0.2	NI	0.1	NI
	5	0.1	NI	0.4	NI
	6	0.1	NI	0.3	NI
	7	0.2	NI	0.0	NI
	8	0.1	NI	0.2	NI
	9	0.1	NI	0.3	NI
	10	0.2	NI	0.3	NI
Mascarilla (purificante)	1	0.4	NI	0.3	NI
	2	0.5	NI	0.5	NI
	3	0.4	NI	0.2	NI
	4	0.4	NI	0.3	NI
	5	0.4	NI	0.4	NI
	6	0.3	NI	0.2	NI
	7	0.4	NI	0.3	NI
	8	0.4	NI	0.5	NI
	9	0.4	NI	0.4	NI
	10	0.3	NI	0.1	NI

TABLA V
CONTINUACION

MUESTRA	SKINTEX			DRAIZ	
	PD II	CLASIFICACION		PD II	CLASIFICACION
Crema limpiadora (removedor de maquillaje gel jabonoso)	1	0.9	Lig	1.2	Lev
	2	1.0	Lig	1.0	Lev
	3	1.0	Lig	1.1	Lev
	4	1.0	Lig	1.4	Lev
	5	0.9	Lig	1.3	Lev
	6	1.0	Lig	1.2	Lev
	7	1.0	Lig	1.4	Lev
	8	1.0	Lig	1.2	Lev
	9	1.0	Lig	1.1	Lev
	10	1.0	Lig	1.2	Lev
Crema facial nutritiva	1	0.2	NI	0.3	NI
	2	0.2	NI	0.4	NI
	3	0.2	NI	0.2	NI
	4	0.2	NI	0.1	NI
	5	0.2	NI	0.3	NI
	6	0.2	NI	0.1	NI
	7	0.1	NI	0.2	NI
	8	0.2	NI	0.3	NI
	9	0.2	NI	0.3	NI
	10	0.2	NI	0.5	NI

NI = No Irritante; Lev = Levemente Irritante; Lig = Ligeramente Irritante;
Mod = Moderadamente Irritante

4.2.2 ANALISIS ESTADISTICO

Una vez comparados en las tablas anteriores los valores y clasificaciones obtenidas de las muestras por el método in vitro en relación con los valores y clasificaciones in vivo, se procedera a comparar las desviaciones estándar de los dos métodos y así, determinar la reproducibilidad del método. Tabla VI.

TABLA VI
COMPARACION DE LAS DESVIACIONES ESTANDAR DEL METODO
ALTERNATIVO IN VITRO Y EL METODO IN VIVO

MUESTRAS	METODO IN VITRO	METODO IN VIVO
	SKINTEX	DRAIZE
Crema para el contorno de ojos	0.07	0.13
Crema hidratante (cutis sensible)	0.04	0.11
Antitranspirante	0.08	0.16
Shampoo para el cuerpo	0.05	0.15
Crema corporal (piel normal)	0.04	0.12
Jabón barra	0.07	0.16
Crema corporal con protección solar	0.05	0.12
Mascarilla (purificante)	0.05	0.13
Crema limpiadora (removedor de maquillaje gel jabonoso)	0.04	0.13
Crema facial nutritiva	0.03	0.12

Las gráficas de distribución normal tanto de los datos obtenidos por el análisis in vivo como los obtenidos por el análisis in vitro son iguales a las que se muestran en las gráficas V y VI.

4.2.2 DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio muestran que existe una gran correlación entre el método in vitro e in vivo, las diez muestras analizadas corresponden adecuadamente, por lo tanto, se comprobó la capacidad de esta prueba alternativa para predecir el potencial de irritación dérmica primaria.

Las desviaciones estándar del método in vitro son inferiores a los valores in vivo en todas las muestras, por lo tanto, las curvas de distribución normal son menos amplias y mucho más elevadas que las curvas obtenidas por los resultados in vivo, lo que indica que la prueba in vitro es reproducible en mayor grado que la prueba in vivo.

C A P I T U L O V

CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis nula; ya que el estudio estadístico demostró que los métodos in vitro proporcionan una evaluación precisa en comparación con los métodos in vivo en la determinación de irritación ocular y dérmica de productos cosméticos.

La prueba de la membrana corioalantóica (HET-CAM) como una prueba alternativa para pruebas de irritación proporciona información con respecto a las reacciones del sistema vascular.

En el ensayo en células rojas (RBC) los puntos finales de hemólisis y desnaturalización son confiables y reproducibles, ya que corresponden a daños a la membrana y a la proteína.

El método de desnaturalización de proteínas (EYTEX) considera las consecuencias de los resultados falsos negativos, posee la capacidad para identificar y descalificar sustancias que interfieren mediante diversas variaciones enfocadas individualmente en una aplicación diferente, permitiendo satisfacer las necesidades particulares de cada muestra.

El ensayo membrana reactivo (SKINTEX) como una prueba alternativa para pruebas de irritación dérmica posee al igual que el sistema Eytex una serie de variaciones para satisfacer las diversas necesidades de las muestras proporcionando un medio útil para estimar el potencial de irritación dérmica de productos cosméticos.

Los resultados de los métodos in vitro presentaron una alta correlación con los resultados de los métodos in vivo debido a que la cuantificación y reproducibilidad de los primeros conducen a una prueba y resultados más uniformes, lo cual se debe a que no existe variabilidad biológica.

Los métodos alternativos in vitro permiten la sustitución de las pruebas in vivo de Draize, pero no la desplaza en su totalidad. Sin embargo reducen el número de pruebas y con ello el número de animales involucrados, resultando en una reducción de costos al mismo tiempo que se proporciona un producto seguro.

Muchos países Europeos y Estados Unidos emplean algunos de los diversos métodos alternativos in vitro. Tomando en cuenta la economía de México, el método más recomendable es el de la prueba de la membrana corioalantóica, debido a que los huevos son un material biológico barato, fácil de conseguir, no se requiere de equipo especializado y puede ser realizado por una persona adecuadamente capacitada.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Arthur BH., Effects of Anesthetic Pretreatment and Low Volume Dosage on Ocular Irritancy Potential of Cosmetic. J. Toxicol. Cut Ocular Toxicol., 5(3):227, (1986).
- (2) Balls M., Ingredient Safety: Developing Alternatives to Animal Testing - A European View., Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME), Department of Human Morphology., Nottingham NG7 2UH UK., (1986).
- (3) Bartnik GF., Künstler K., Lüpke NP., Sterzel W., Wallat S., Possible Replacement of Animal Experiments In Local Tolerance Testing on Skin and Mucous Membranes. In Alternatives to Animal Experiments in Risk Assessment., Schering, pp 111-129, (1988).
- (4) Beer GJ., Lehre Von Den Augen kran kheiten., Vienna: Camesina, Heubner and Volke, (1913).
- (5) Borenfreund E., Babich H., Proceedings, Symposium on Alternatives to Animal Experiments, Schering AG, Berlin, (1986).
- (6) Carpenter CP., Smyth HF., Chemical Burns of the Rabbit Cornea. Am. J. Ophthalmol., 29:1363, (1946).
- (7) Dickens MS., Kruszewski FH., Hearn LH., Smith KT., Teal JJ., Gordon VC., Application of the EYTEX System to the Evaluation of Cosmetic Products, EYTEX Users Symposium, New Jersey, (1990).
- (8) Dimitrov DS., Jain RK., Membrane Stability. Biochim Biophys Acta, 779:437-468, (1984).
- (9) Draize JH., Woodard G., Calvery HO., Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. J. Pharmacol Exp Ther., 82:377, (1944).
- (10) Frazier JM., Gad SC., Goldberg AM., McCulley JP., A Critical Evaluation of Alternative Test. Alternative Methods in Toxicology, Vol. 4, pp 45-75, (1987).

- (11) Gordon VC., An In Vitro Dermal Safety Test, Eytex Division, Ropak Corp. Printed from Drug & Cosmetic Industry, March (1990).
- (12) Gordon VC., EYTEX and SKINTEX Update, Ropak Laboratories, (1991).
- (13) Gordon VC., EYTEX Third Generation. In Alternative Methods in Toxicology. In Vitro Toxicology: Mechanism and New Technology, pp 241-251, (1991).
- (14) Gordon VC., Bergman HC., Eytex, An In Vitro Method for Evaluation of Ocular Irritancy. In Vitro Toxicology, Vol. 5:293-302, (1987).
- (15) Gordon VC., Bergman HC., The EYTEX-MPA System : An In Vitro Method for The Evaluation of Ocular Safety. In Alternative Methods in Toxicology. In Vitro Toxicology, Vol. 6, (1988).
- (16) Gordon VC., Kelly CP., Bergman HC., Evaluation of Skintex An In Vitro Method to Determine Dermal Irritation, Ropak Laboratories, (1991).
- (17) Gordon VC., Kelly CP., An In Vitro Method for Determinig Ocular Irritation. Cosmetic & Toiletries, 104:87, (1989).
- (18) Gordon VC., Kelly CP., Validation of An In Vitro Method for Determinig Ocular Irritation of Cosmetic Ingredients and Products. Cosmetic & Toiletries, October, 104:70, (1989).
- (19) Griffith JF., Dose-Response Studies with Chemical Irritants for Predicting Hazard to the Human Eye. Toxicol. Appl. Pharm. 55:501, (1980).
- (20) Helman José., FARMACOTECNIA TEORICA Y PRACTICA., Tomo VI Y VII, Ed. CECSA., México, (1984).
- (21) Hughes WF., Alkali Burns of The Eye. Review of the Literature and Summary of Present Knowledge. Arch Ophthalmol. 35:423, (1946).

(22) Kalweit S., Gerner I., Spielmann H., Validation Project of Alternatives for the Draize Eye Test. Molecular Toxicology, 1:597-603, (1987).

(23) Kelly CP., Eytex, An In Vitro Method of Predicting Ocular Safety. United States Pharmacopial Forum, Jan/Feb, pp 4815-4824, (1989).

(24) Knox P., Uphill PF., Fry JR., Beaford J., Ball M., The FRAME Multicenter Project on In Vitro Citotoxicology. Food Chem. Toxicol, 24:457-463, (1986).

(25) Kruszewski FH., Dickens MS., Gordon VC., Renskers KJ., Application of the Skintex System to the evaluation of Cosmetic Products. In Vitro Toxicology, (1991).

(26) Kruszewski FH., Hearn LH., Smith KT., Teal JJ., Gordon VC., Dickens MS., Application of the EYTEX System to the Evaluation of Cosmetic Products and their Ingredients. In Vitro Toxicology, 20:146-163, (1992).

(27) Leighton J. Nassauer J., Tchao R., Chorioallantoic Membrane Test. Food Chem. Toxicol., Vol. 23, No. 2 : 293-298, (1985).

(28) Lüpke NP., Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potential. Food Chem. Toxicol., Vol. 23, No. 2 : 287-291, (1985).

(29) Mann I., Pullinger BD., A Study of Mustard Gas Lesions of the Eyes of Rabbits and Men. Proc. R. Soc. Med., 35:229, (1942).

(30) Marzuli FN., Ruggles DI., J. AM. Assoc. Anal. Chem., 56:905, (1973).

(31) McEwen GN., Jr. Ph. D., The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association., Washington, D.C. 20036., September, (1990).

(32) Norma Oficial Mexicana., Secretaria de Salud.

(33) Pape WJW., In Vitro Toxicity Testing of Surfactants and Tensioactive Cosmetic Products. In Vitro Toxicology, February, (1988).

(34) Pape WJW., Hoppe U., In Vitro Methods for The Assessment of Primary Local Effects of Topically Applied Preparations. Skin Pharmacol., 4:205-212, (1991).

(35) Pape WJW., Hoppe U., Second World Surfactants Congress, Paris, Evaluation of Acute Irritation Potentials of Tensides Using The In Vitro Alternative Red Blood Cell Test System. Proceeding, Vol. IV, 414-428, (1988).

(36) Pape WJW., Hoppe U., Standarization of An In Vitro Red Blood Cell Test for Evaluating The Accute Citotoxic Potential of Tensides. Drug Res., 40:498-502, (1990).

(37) Pape WJW., Pfannenbecker U., Hoppe U., Validation of The Red Blood Cell Test System as In Vitro Assay for the Rapid Screening of Irritation Potential of Surfactants. Molecular Toxicology, 1:525-536, (1987).

(38) Seifried HE., J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol., 5(2):89, (1988).

(39) Silber PM., Selection and Utilization of In Vitro Toxicity Test, In Vitro Alternatives, Inc., Carrollton, Texas. Cosmetic & Toiletries, Vol. 106 : 55-62, April, (1991).

(40) Silverman JS., Pennisis C., Evaluation of Tetrahymena Thermophila as An In Vitro Alternative to Ocular Irritation Studies in Rabbits. J. Toxicol. Cut. & Ocular Toxicol., 6(1), 33-42, (1987).

(41) Teal JJ., Ph. D., A New Era Begings, Avon Products, Inc., Suffern, New York. Cosmetic & Toiletries, Vol. 104:61-66, November, (1989).

(42) The EYTEX System. Reagents for Evaluation of Ocular Safety. Directions for Use. Ropak Laboratories, Irvine, CA., 92714. (1980).

(43) The SKINTEX System. Directions for Use. Ropak Laboratories, Irvine, CA., (1991).

(44) Thompson MA., Dickens MS., Gordon VC., Evaluation of the EYTEX Biochemical Assay for Use in Determining Cosmetic Product Ocular Irritancy. In Vitro Toxicology, April 4, (1989).

(45) Thompson MA., Hearn LA., Smith KT., Teal JJ., Dickens MS., Evaluation of The Neutral Red Citotoxicity Assay as A Predictive Test for The Ocular Irritancy Potential of Cosmetic Products. In Vitro Toxicology, Vol. 7, pp 297-305, (1989).

(46) Tortora Gerard J., Anagnostakos Nicholas P., PRINCIPIOS DE ANATOMIA Y FISIOLOGIA, 3a. Edición., Ed. Harla, (1984).

(47) Trademark of Microbics Corporation, 2232 Rutherford Rd., Carlsbad, CA., 92008, U.S.A., (1991).

(48) Wayne W. Daniel., BIOESTADISTICA., Ed. Limusa., 3ª Edición., México, D.F., (1989).