



FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS A ENSAYOS EN ANIMALES EN PRODUCTOS COSMÉTICOS

Trabajo de Fin de Grado

San Juan de Alicante, Febrero 2019

Autor: MARIA RUS HARO MORATALLA

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/as: **Marta González Álvarez e Isabel González Álvarez**

INDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	4
2.1. Definición de producto cosmético.....	4
2.2. Parámetros toxicológicos a evaluar para confirmar que un cosmético es seguro.	4
2.3. Normativa Antigua para la realización de ensayos de seguridad de cosméticos.	6
2.4. Aspectos éticos: Regla de las 3Rs.....	7
2.5. Métodos tradicionales para evaluar la seguridad de un cosmético.	9
3. Objetivos.....	19
4. Materiales y Métodos.....	19
5. Resultados	20
5.1. Normativa: Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009.....	20
5.2. Métodos alternativos a la experimentación animal para evaluar la seguridad e inocuidad de un producto cosmético.	21
6. Conclusiones.....	38
7. Bibliografía	39

1. Resumen

En este trabajo de fin de grado se va a hacer una revisión bibliográfica la cual va desde los ensayos en animales utilizados en el siglo XX para evaluar la seguridad e inocuidad de los fármacos y productos cosméticos, pasando por la Regla de las 3Rs: reemplazar, reducir y refinar la cual se propuso a finales de los años 50, la Normativa que ha regido los ensayos de seguridad en productos cosméticos desde mitad del siglo XX hasta finales de siglo (Directiva 76/768/CEE del Consejo de 27 de julio de 1976, Directiva 97/18/CE de la Comisión de 17 de abril de 1997 y finalmente el Real Decreto 1599/1997 de 17 de octubre) y la normativa que rige los ensayos de seguridad de cosméticos en la actualidad (Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009) hasta finalmente los ensayos alternativos a los ensayos animales que son los que se usan hoy en día en la industria cosmética desde la prohibición de los ensayos en animales.



2. Introducción

2.1. Definición de producto cosmético

Según el Reglamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo del 30 de noviembre de 2009, por el cual se rigen los productos cosméticos, define como producto cosmético: *“toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir olores corporales”*. Cualquier producto que no se ajuste a esta definición no tendrá la consideración de producto cosmético y por lo tanto no estará regulado por este Reglamento. ¹

2.2. Parámetros toxicológicos a evaluar para confirmar que un cosmético es seguro.

La evaluación de la seguridad de los cosméticos la realizamos mediante la determinación de distintos parámetros a través de los correspondientes ensayos toxicológicos. Los **parámetros** a evaluar son:

- **Toxicidad aguda: Irritación/Corrosión ocular (en mucosas).**
 - Irritación ocular: alteraciones en el ojo tras la aplicación de una sustancia de ensayo en la superficie anterior del ojo, completamente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación.^{2,3}
 - Corrosión ocular: lesión tisular en el ojo o grave reducción física de la vista, tras la aplicación de una sustancia de ensayo en la superficie anterior del ojo, que no son completamente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación.^{2,3}

- **Toxicidad aguda: Irritación/Corrosión cutánea.**
 - Irritación cutánea: lesión reversible de la piel tras la aplicación de una sustancia de ensayo.^{2,3}
 - Corrosión cutánea: lesión irreversible de la piel, en concreto, necrosis visible de la epidermis y la dermis, que se produce tras la aplicación de una sustancia de ensayo. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, hemorragias, costras sanguinolentas y, al cabo de 14 días de observación se produce un cambio de coloración por palidez de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices.^{2,3}

- **Toxicidad Crónica: Toxicidad a dosis repetidas.** Son los efectos tóxicos producidos tras la administración diaria repetida de una sustancia durante un periodo de tiempo.³

- **Fototoxicidad** (sólo se hacen estos ensayos cuando la luz ultravioleta actúa sobre el producto produciendo cambios que afectan a la toxicidad del cosmético): reacción tóxica aguda provocada tras una primera exposición de la piel a determinadas sustancias químicas y su posterior exposición a la luz, o inducida análogamente por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia química.^{2,3}

- **Absorción dérmica:** Es la penetración de un cosmético hasta la dermis y de aquí, por vía sanguínea, a todo el cuerpo.³

- **Sensibilización dérmica** (dermatitis alérgicas de contacto): es una reacción cutánea de origen inmunológico ante una sustancia. En los seres humanos las respuestas pueden caracterizarse por prurito, eritema, edema, pápulas, vesículas, ampollas o una combinación de estos fenómenos. En otras especies, las reacciones pueden ser diferentes y apreciarse solo eritema y edema.³

- **Carcinogenicidad** (solo se hacen estos ensayos si hay una gran penetración a través de la piel): cuando una sustancia después de su inhalación, ingestión, aplicación o inyección dérmica, induce tumores (benignos o malignos) o aumenta su incidencia, malignidad o acortan el tiempo antes de la aparición del tumor.³

- **Mutagenicidad / Genotoxicidad.**
 - Mutagenicidad: cambios que permanentes y que se transmiten en la cantidad y estructura del ADN de las células.³

 - Genotoxicidad: proceso en el que se daña el ADN alterándose su estructura e información. No se asocia siempre a mutagenicidad.³

2.3. Normativa Antigua para la realización de ensayos de seguridad de cosméticos.

La antigua normativa, ya derogada por el Reglamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009, es la Directiva 76/768/CEE del Consejo de 27 de julio de 1976, la cual tiene como objetivo principal la protección de la salud pública y por ello es indispensable efectuar determinadas pruebas toxicológicas para evaluar la seguridad para la salud humana de los ingredientes y combinaciones de estos que forman parte de la composición de los productos cosméticos, para que estos no perjudiquen la salud pública cuando se apliquen en condiciones normales de empleo.⁴

A continuación se redacta otra directiva que es la Directiva 97/18/CE de la Comisión de 17 de abril de 1997, la cual prohíbe que a partir del 30 de junio del 2000 se pongan en el mercado productos cosméticos que contengan ingredientes o combinaciones de ingredientes testados o experimentados en animales y también obliga a que cualquier experimento con animales debe indicarse de manera clara y contundente si los ensayos y experimentos con

animales se han producido en el producto acabado o/y en alguno de sus ingredientes.⁵

Finalmente para recoger toda la normativa sobre productos cosméticos hasta ese momento se creó un nuevo Real Decreto que es el Real Decreto 1599/1997 de 17 de octubre, sobre productos cosméticos en el cual en el artículo 5 “PROHIBICIONES” en el punto i, vuelve a decir claramente que quedan prohibidos los ingredientes o combinación de ingredientes experimentados en animales a partir del 30 de junio del 2000 y en el artículo 16 “PUBLICIDAD” apartado 2 dice claramente que cualquier referencia a experimentación con animales debe indicar claramente si las experimentaciones efectuadas se refieren al producto acabado y/o a sus ingredientes, ya que en el producto acabado si permite hacer algunos ensayos en animales para comprobar el perfil toxicológico del producto ya que es necesaria una evaluación de seguridad para la salud humana, este Real Decreto fue derogado el 11 de julio de 2013 en todo aquello en lo que se oponía al Reglamento (CE) 1223/2009, a día de hoy está completamente derogado al entrar en vigor el Real Decreto 85/2018.^{1,6,7}

2.4. Aspectos éticos: Regla de las 3Rs

El uso de animales ha provocado y provoca un gran rechazo social. Hasta el siglo XIX la comunidad científica hizo caso omiso de las protestas de los detractores de la investigación animal. Durante este siglo surgieron las primeras normativas para regular el uso de animales para investigación y, en 1959 surge la comunidad científica reconoció que era necesario la regulación del uso de animales en experimentación mediante la publicación del libro “Los principios de la técnica humana experimental” de Russell y Burch, en el cual se proponen 3 estrategias para para minimizar el problema ético y moral que supone el uso excesivo de animales en investigación, estas recibieron el nombre de “El principio de las 3Rs”: Reemplazar, Reducir y Refinar, estas estrategias se basan en reducir la investigación en animales y en caso de que hubiera que realizarla hacerlo de la manera más respetuosa posible. Esta publicación dio lugar a un acercamiento entre los defensores y no defensores del uso de animales en

experimentación, que dio lugar a que en 1966 se aprobara el “Acta para el bienestar animal de los animales de laboratorio”, en esta se reconocen los derechos de los animales. A partir de aquí se fueron elaborando normativas y leyes en los distintos países respecto al trato que deben recibir los animales y como pueden usarse en investigación, docencia, etc, por ejemplo, en España el 11 de Julio de 2013 entro en vigor el Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos en el cual se prohíbe expresamente la experimentación animal en cosmética y medicina estética.⁸

Estas Rs suponen:

- **Reemplazo:** se refiere a la sustitución de animales de experimentación por otros métodos alternativos como son algunos métodos fisicoquímicos, modelos in silico e in vitro.⁸
- **Reducción:** se refiere a minimizar el número de animales utilizados por experimento, sin que pueda haber una reducción de la calidad, fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Para conseguir la reducción es necesario la optimización del diseño experimental realizando análisis estadísticos correctos. Un ejemplo de estrategia para optimizar el rendimiento de los ensayos con animales son las llamadas técnicas no invasivas como por ejemplo las técnicas experimentales basadas en la imagen.⁸
- **Refinamiento:** se refiere a minimizar el sufrimiento animal y mejorar el bienestar animal a todos los niveles. Consiste en seleccionar las mejores condiciones de vida para los animales y utilizar técnicas que permitan minimizar el sufrimiento, dolor o estrés en el animal utilizado para experimentación.⁸

2.5. Métodos tradicionales para evaluar la seguridad de un cosmético.

• Irritación/Corrosión Cutánea

Antes de llevar a cabo estos ensayos hay que analizar detenidamente los datos relevantes ya existentes con el fin de no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias si dichos datos ya demostraban que la sustancia era corrosiva o irritante. Dichos datos incluirán los obtenidos en estudios realizados con seres humanos o animales de laboratorio.³

Se selecciona la especie animal a utilizar, en este caso es el conejo albino. A continuación, 24 horas antes del ensayo se le afeita el pelo de la zona dorsal del tronco con cuidado para no dañarla.³

Durante esas 24 horas antes del ensayo, pondremos los conejos en jaulas individuales a 20 °C, humedad 30-60% e iluminación artificial (12 horas de luz y 12 de oscuridad) y se les da una dieta habitual para animales de laboratorio y se les suministrara agua en cantidad ilimitada. Una vez pasadas las 24 horas comenzamos con el ensayo.³

- Si se cree que la sustancia es **irritante** y **no corrosiva**: se aplica a una dosis de 0,5 mg (sólida) ó 0,5 ml (líquida) en una zona pequeña de la piel de unos 6 cm², que se cubre con una gasa y se sujeta con esparadrapo no irritante. Si no es posible la aplicación directa, la sustancia en estudio se aplica primero a la gasa y a continuación a la piel. La gasa tiene que estar en contacto con la piel durante el período de exposición. Hay que evitar que el animal acceda a la gasa y pueda comérsela o inhalar la sustancia, para ello se cubre la gasa con un vendaje oclusivo. Tras las 4 horas del tiempo de exposición, eliminaremos los residuos de la sustancia con un disolvente (el de referencia es el agua). Si hay irritación debe hacerse el ensayo de forma secuencial exponiendo a otros dos animales a la vez. Cuando se utilicen dos animales no será necesario realizar en ensayo en el tercer animal, si los dos animales muestran la misma respuesta. En caso contrario se hace el ensayo en el tercer animal.³

- Si se supone que la sustancia es **corrosiva además de irritante**: se aplica la sustancia (= dosis que en el párrafo anterior) 3 veces de manera consecutiva. La primera aplicación se retira a los 3 minutos, si no se observa reacción cutánea grave se aplica una segunda, que se retira al cabo de 1 hora y finalmente se hace la tercera aplicación que se retira a las 4 horas, ahora se procede a ver la respuesta de la piel del animal frente a la sustancia. Si se produjera un efecto corrosivo en cualquiera de las 3 aplicaciones se suspende la prueba inmediatamente o si no se aprecia corrosión observaremos al animal durante 14 días, a no ser que aparezca antes la corrosión, pero si la sustancia no es corrosiva, se confirma la respuesta irritante o negativa con otros 2 animales más como máximo, y se le aplicara a cada uno una vez la sustancia manteniéndola durante 4 horas.³

Finalmente, se examinan los signos de eritema y edema, puntuando las respuestas al cabo de 1, 24, 48 y 72 horas de la retirada de la aplicación. Las reacciones cutáneas se puntúan y registran. Si a las 72 horas hay una lesión que no se puede clasificar como irritación o corrosión, quizá sea necesario observarla hasta el día 14 para determinar la reversibilidad de los efectos. Además, se realizará una descripción de los efectos tóxicos, como el daño producido en la grasa de la piel, y de cualquier efecto adverso sistémico, que serán anotados.³

GRADUACIÓN DE LAS REACCIONES CUTÁNEAS	PUNTUACIÓN				
	0	1	2	3	4
Eritema y formación de escaras					
Sin eritema	X				
Eritema muy leve		X			
Eritema bien definido			X		
Eritema moderado a intenso				X	
Eritema intenso o formación de escaras que impide graduarlo					X
Formación de edema					
Sin edema	X				
Edema muy leve		X			

Edema ligero			X		
Edema moderado				X	
Edema intenso					X

• **Irritación/Corrosión ocular.**

Antes de llevar a cabo la prueba in vivo para evaluar la corrosión/irritación de la sustancia, hay que analizar los datos relevantes ya existentes, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias si dichos datos ya demuestran que la sustancia es corrosiva o irritante. Dichos datos incluirán los obtenidos en estudios realizados con seres humanos o animales de laboratorio.³

Se selecciona la especie animal a utilizar, en este caso el conejo albino. A continuación 24 horas antes del ensayo se procede a examinar los ojos del conejo de experimentación, debido a que no se utilizan conejos que tengan irritación ocular, defectos oculares o lesiones en la córnea.³

Durante esas 24 horas antes del ensayo pondremos a los conejos en jaulas individuales a 20 °C, humedad del 30-60% e iluminación artificial (12 horas luz y 12 horas oscuridad) y se les da una dieta habitual de animales de laboratorio y agua en cantidad ilimitada. A las 24 horas comenzamos con el ensayo.³

Se aplica en la conjuntiva de un ojo del animal la sustancia, si es un líquido se pone una dosis de 0,1 ml y si es un sólido o crema se pone una dosis de 100 mg como máximo (o una dosis que ocupe 0,1 ml) separando el parpado del glóbulo ocular, a continuación, se juntan los párpados para evitar la pérdida de sustancia aplicada y en el otro ojo no se le aplica ya que se utiliza como control. Los ojos se lavarán 24 horas después, excepto que la sustancia sea sólida o produzca efectos corrosivos o irritantes que se lavaran inmediatamente. Dependiendo del caso, si la sustancia puede producir dolor se valora aplicar un anestésico local.³

Si no se observa efecto corrosivo, se puede confirmar si la sustancia es irritante o no, con un máximo de 2 animales más. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial, se recomienda efectuar la confirmación de irritación de forma secuencial exponiendo a los animales de uno en uno, en lugar de exponer a dos

a la vez. Si el segundo animal sufre efectos corrosivos o irritantes de suma importancia se suspende el ensayo.³

Los animales que no tengan lesiones oculares los tendremos en observación como mínimo 3 días después de la aplicación. Los animales con lesiones leves o moderadas deben permanecer en observación hasta que desaparezcan las lesiones o hasta transcurridos 21 días, que es cuando finaliza el estudio. Los animales se observan a los 7, 14 y 21 días, así se observa el estado de las lesiones y se comprueba si son reversibles o no.³

Los animales que tengan dolor o malestar fuerte deben ser sacrificados lo antes posible, con la consiguiente evaluación de la sustancia. Serán sacrificados los animales a los que se les produzcan estas lesiones oculares **irreversibles** después de aplicar la sustancia: perforación o ulceración corneal, presencia de sangre en la cámara anterior del ojo, opacidad corneal de grado 4 que perdure durante 48 horas, ausencia de reflejo lumínico que perdura durante 72 horas, ulceración de la conjuntiva o necrosis de la conjuntiva.³

Finalmente, se dan unas puntuaciones según la irritación ocular producida y se establecerán unos grados de irritación ocular.

GRADUACIÓN DE LAS LESIONES OCULARES	PUNTUACIÓN				
	0	1	2	3	4
Córnea					
Sin ulceración ni opacidad	X				
Zonas de opacidad diseminadas o difusas y los detalles del iris se aprecian con claridad.		X			
Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos			X		
Zona nacarada; no se ven detalles del iris; el tamaño de la pupila apenas es discernible				X	
Córnea opaca; no se distingue el iris					X

Iris					
Normal	X				
Pliegues notablemente hundidos, congestión, inflamación, moderada hiperemia o inyección circun-corneal; iris reactivo a la luz		X			
Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz			X		
Conjuntiva					
Enrojecimiento Normal	X				
Algunos vasos sanguíneos hiperémicos		X			
Coloración carmesí difusa; no se distinguen fácilmente los vasos individuales			X		
Coloración carne difusa				X	
Quemosis					
Inflamación Normal	X				
Cierta hinchazón superior a lo normal		X			
Hinchazón evidente con eversión parcial de los párpados			X		
Hinchazón con párpados medio cerrados				X	
Hinchazón con párpados más que medio cerrados					X

- **Toxicidad Crónica (Dosis Repetidas durante 28 días vía cutánea)**

Se eligen los animales al azar (pueden ser ratas o conejos), tienen que ser jóvenes, sanos y de ambos sexos y hacemos 2 grupos, cada grupo contiene 5 animales (en total 10 animales, mitad hembras y mitad machos), unos irán al grupo control y otros al grupo de tratamiento. Durante los 5 días anteriores al comienzo del ensayo se tiene a los animales en buenas condiciones alimentarias y de alojamiento. Un día antes de comenzar con el ensayo se rasura la piel de la región dorsal al animal (habrá que hacerlo todas las semanas durante el ensayo,

siempre con cuidado de no dañar la piel), esta rasuración tiene que tener un tamaño como máximo de un 10% de su superficie corporal total. Si la sustancia que vamos a aplicar es sólida tendrá que mezclarse con un vehículo apropiado (normalmente agua) para asegurar un buen contacto con la piel y es líquida se aplicara sobre la piel tal cual sin hacer nada.³

Comenzamos el ensayo teniendo a cada animal en una jaula individual, la sustancia es administrada los 28 días que dura el ensayo, a la misma hora cada día. A lo largo del ensayo se darán 3 dosis diferentes: en el inicio una dosis baja con la que no debe producirse ningún efecto toxico detectable, luego una dosis intermedia la cual debe producir efectos tóxicos observables mínimos y finalmente con el tiempo una dosis más elevada la cual producirá efectos tóxicos pero nunca causará la muerte, si en algún momento la aplicación de la sustancia produce irritación cutánea grave se reducen las concentraciones y si las lesiones son muy graves se detiene el experimento. El animal será expuesto a la sustancia 6 horas al día, esta estará en contacto con la piel mediante un apósito de gasa porosa y esparadrappo no irritante, además esta zona será cubierta para que el apósito no se mueva y el animal no pueda rozarse ni ingerir la sustancia, para evitar esto también se puede utilizar como alternativa un collarín. Finalmente, tras pasar el tiempo de exposición se elimina cualquier resto de sustancia con agua.³

Los animales se observan a diario para poder ver si hay síntomas de toxicidad, si los hay tendremos que apuntar el momento en el que aparecen, su intensidad y duración. Semanalmente debemos registrar el peso de los animales y al finalizar el ensayo, los animales deben ser sacrificados y posteriormente debe de realizárseles la autopsia, en caso de que algún animal durante el ensayo sufriera un dolor grave o angustia se sacrifica de inmediato.³

Los animales con algún efecto toxico los mantendremos en observación además de los 28 días de duración del ensayo 14 días más para ver si hay curación (efectos reversibles) o si persisten los efectos tóxicos.³

Por último, deben recogerse todos los resultados en un cuadro, indicando: grupos del ensayo, número de animales totales y el número en los que se han observado lesiones y que tipo de lesión es. Todos estos resultandos se evalúan

mediante métodos estadísticos y se procede a hacer un informe final del ensayo.³

- **Absorción dérmica**

Se utiliza de animal la rata, esta debe ser joven, sana y solo se utilizarán de un único sexo (machos). Se utilizarán 4 animales donde se aplicará la sustancia problema. La temperatura de estos animales debe ser de unos 22°C con una Humedad del 40 – 60%, tendrán luz artificial durante 12 horas y las restantes 12 horas serán de oscuridad, seguirán una dieta típica de laboratorio y agua en cantidad ilimitada.³

Durante los 5 días antes del ensayo, los animales estarán en jaulas individuales para adaptarse a las condiciones del laboratorio y un día antes de comenzar el ensayo se rasura la piel a la rata en la zona del dorso y de los hombros con cuidado de no dañar la piel, después de la rasuración limpiamos el sitio con acetona para conseguir la eliminación del sebo que haya. La zona que se rasurara deberá ser lo bastante amplia para que se pueda calcular la cantidad absorbida de sustancia problema/cm² piel, por lo que para ello la rasuración debe tener unos 10 cm².³

Tras delimitar la piel se comienza el ensayo aplicando en el sitio una cantidad de sustancia problema determinada que será la que un humano utilizaría: entre 1-5mg/cm² si la sustancia es sólida y si fuera líquida serían 10 µl/cm². Tras la aplicación se protegerá esta zona del animal con una gasa para que no se frote la zona y lo devolveremos a la jaula donde durante 3 veces al día se recogerán sus excrementos (orina, heces y fluidos) para analizarlos. La exposición a la sustancia será de 6 a 24 horas depende del tiempo que esta sustancia vaya a permanecer sobre la piel del ser humano, al final de dicha exposición se retira la gasa protectora y se conserva para ser analizada, la piel tratada queda al descubierto y será lavada con agua y jabón, se seca y antes de devolverlos a la jaula se les vuelve a tapar la zona para ser utilizada posteriormente otra vez. A lo largo del ensayo se irán observando periódicamente los animales para ver si tienen alguna reacción o signo de toxicidad. Finalmente se sacrifican y se recoge

su sangre para analizarla y la piel del lugar donde se ha aplicado la sustancia y otra superficie similar rasurada para analizarlas por separado, la piel donde se aplica el producto se fraccionará separando la capa cornea y la epidermis mediante la técnica "tape stripping" para obtener más información sobre la distribución de la sustancia. Finalmente recogeremos todos los datos y realizaremos un informe final del ensayo.³

La duración del ensayo es de 24 horas (exposición) y contando hasta el sacrificio de los animales llega hasta las 48 horas de ensayo.³

- **Fototoxicidad**

El ensayo se realiza en ratas albinas jóvenes y sanas, estas se toman al azar, en total se eligen 30 ratas (15 machos y 15 hembras). Durante 5 días antes del ensayo los animales son alojados en jaulas individuales en el laboratorio con una temperatura de 22°C aproximadamente y con una humedad del 90% controlada, tienen luz artificial durante 12 horas y otras 12 horas de oscuridad. Toman una dieta normal de animales de laboratorio y agua en cantidades ilimitadas.⁹

En las 24 horas anteriores al comienzo del ensayo se les rasura la piel del dorso con cuidado para no dañar la piel, esta tiene un área de 6*8 cm.⁹

Al día siguiente se comienza el ensayo y lo que se hace es que las 30 ratas son divididas en 3 grupos de 10 (5 machos y 5 hembras) y se distribuyen los grupos de la siguiente manera:

- Grupo 1: Control + más Irradiación.
- Grupo 2: Control de Irradiación (a estos animales se les irradia la piel directamente sin aplicar ninguna sustancia).
- Grupo 3: Sustancia Problema más Irradiación

La cantidad aplicada de sustancia problema es de 50µl, se aplica sobre la zona rasurada y se ponen a los animales después en una caja de retención para que los animales no se muevan y se pueda asegurar que tendrán la máxima exposición a la radiación de la luz.⁹

Para la irradiación empleamos una lámpara de luz ultravioleta (UVA y UVB) con una longitud de onda (λ) de 365nm. Se irradia al animal a la media hora de aplicar la sustancia problema, para ello se coloca en una caja de retención situado a 10cm de la lámpara durante 2 horas. Los animales se observan justo después de la irradiación y a las 24, 48 y 72 horas, en estas observaciones se tendrán en cuenta la aparición de eritema y/o edema. Atendiendo a la escala de Draize utilizada en los ensayos de irritación cutánea, clasificaremos gradualmente las lesiones producidas.⁹

Finalmente, se sacrifican los animales y se analizan mediante microscopio las lesiones producidas en los animales, para confirmar el posible efecto fototóxico de la sustancia problema.⁹

- **Sensibilización dérmica (Prueba de maximización en cobaya (GPMT))**

Cinco días antes del inicio del ensayo, se aclimatan a las condiciones del laboratorio cobayas albinas jóvenes, sanas y de ambos sexos. Estas son elegidas al azar y se asignan a los lotes de tratamiento (entre 10 y 20 cobayas para el lote tratado y entre 5 y 10 para el control) y se les elimina el pelo mediante afeitado. Pesaremos a los animales antes y después del ensayo.³

En este ensayo hay dos exposiciones: exposición de **inducción** y **exposición de provocación**. En la exposición de inducción la dosis debe ser más alta que la que produce irritación cutánea moderada y en la exposición de provocación la dosis debe ser la mayor dosis no irritante.³

- **Inducción**

Día 0 (lote de sustancia problema): Se administran tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en la región dorsal superior, de la que se ha eliminado el pelo (Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico; Inyección 2: la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado, en la concentración seleccionada; Inyección 3: la sustancia de ensayo en la concentración seleccionada formulada en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico .La

concentración final de la sustancia de ensayo será igual a la utilizada en la inyección 2.)

Día 0l (lote control): Se ponen tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en los mismos lugares que en los animales tratados (Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico; Inyección 2: vehículo solo; Inyección 3: formulación al 50 % (p/v) del vehículo en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico).

Días 5-7 (lotes sustancia problema y control): Un día antes de la aplicación tópica de inducción, si la sustancia no es irritante de la piel, se trata la superficie de ensayo, previo corte al rape del pelo o afeitado del mismo, con 0,5 ml de lauril-sulfato sódico al 10 % en vaselina, para producir irritación local.

Días 6-8 (lote de sustancia problema): Se elimina de nuevo el pelo de la superficie de ensayo. Se carga un papel de filtro con la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado y se aplica a la superficie de ensayo y se mantiene con un apósito oclusivo durante 48 horas.

Días 6-8 (lote control): Se elimina de nuevo el pelo de la superficie de ensayo. Solo se aplica el vehículo, de forma similar, en la superficie de ensayo con un apósito oclusivo durante 48 horas.

- **Provocación**

Días 20-22 (lotes de sustancia problema y control): Se elimina el pelo de los costados de los animales tratados y de los controles. Se aplica un parche con una sustancia estudiada sobre un costado de los animales y, cuando sea necesario, también se puede aplicar en el otro costado un parche con el vehículo solo. Los parches se mantienen con un apósito oclusivo durante 24 horas. Finalmente, un día después de la provocación se elimina el parche y al siguiente día (2 días después de la aplicación de la provocación) se observa la reacción cutánea y se ve de que tipo es, según una clasificación que se ha establecido previamente y el tercer día (72 horas después de la provocación) se hace una segunda observación y se apunta también.

Se utiliza la escala de clasificación de Magnusson y Kligman para evaluar las reacciones del ensayo con parche de provocación: 0 (sin cambios visibles), 1 (eritema ligero o en manchas localizadas), 2 (eritema moderado y confluyente) y 3 (eritema intenso y tumefacción).

3. Objetivos

El **objetivo principal** es hacer una revisión bibliográfica sobre los métodos alternativos para evaluar y asegurar la inocuidad y seguridad de los cosméticos.

En concreto los **objetivos específicos** serían los siguientes:

- Determinar los métodos alternativos para evaluar la irritación/corrosión aguda cutánea y ocular de productos cosméticos.
- Determinar los métodos alternativos para evaluar la toxicidad a dosis repetidas de productos cosméticos.
- Determinar los métodos alternativos para evaluar la absorción dérmica de productos cosméticos.
- Determinar los métodos alternativos para evaluar la fototoxicidad en productos cosméticos.
- Determinar los métodos alternativos para evaluar la sensibilización dérmica de productos cosméticos.

4. Materiales y Métodos

La revisión bibliográfica se ha realizado utilizando las bases de datos Medline y su buscador llamado PubMed y la base de datos bibliográfica llamada Google Académico. Además también he realizado la búsqueda en diferentes sitios oficiales como el BOE, la Unión Europea y la AEMPS.

La búsqueda bibliográfica se ha comenzado buscando en el DESC (Descriptores de ciencias de la Salud) los siguientes descriptores o palabras clave: “métodos alternativos”, “in vitro”, “experimentación animal”, “toxicología”, “cosméticos”, y “normativa y esta misma base de datos nos proporciona los MESH (Descriptores en Ingles) : “alternative methods”, “in vitro”, “animal experimentation”, “toxicology”, “Cosmetics” and “legislation & jurisprudence” con los que realizamos la ecuación de búsqueda bibliográfica en las bases de datos y buscadores.

Para minimizar la búsqueda se utilizó como filtro que las palabras clave aparecieran en el título de los artículos y a través de los artículos más relevantes, se accedió a otros artículos citados en la bibliografía de éstos.

5. Resultados

5.1. Normativa: Reglamento (CE) Nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009.

Este reglamento entro en vigor el 11 de julio de 2013, con el cual se prohíbe expresamente la experimentación animal en productos cosméticos, ya que **según se redacta en la normativa del Reglamento (CE) Nº 1223/2009:**

“Actualmente es posible garantizar la inocuidad de los productos cosméticos acabados sobre la base de los conocimientos relativos a la seguridad de los ingredientes que contienen. Por tanto, conviene adoptar disposiciones en virtud de las cuales se prohíba la realización de experimentos en animales con los productos cosméticos acabados”.¹

“Será posible garantizar progresivamente la seguridad de los ingredientes empleados en los productos cosméticos haciendo uso de métodos alternativos que no impliquen la utilización de animales y que estén validados a nivel comunitario por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA) u homologados como científicamente válidos por este organismo, con

la consideración debida al desarrollo de la validación en la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE)”¹

5.2. Métodos alternativos a la experimentación animal para evaluar la seguridad e inocuidad de un producto cosmético.

- **Irritación/Corrosión Cutánea**

Como alternativa a los modelos en animales para la toxicidad aguda (irritación /corrosividad cutánea) se han creado 3 modelos de piel artificial los cuales son: el SkinEthic, Episkin y EpiDerm®. A continuación, voy a definir la morfología de cada uno y en que difieren de la piel humana¹⁰:

- **SkinEthic**: modelo de piel reconstituida sintetizado a partir de la base de un cultivo celular de queratinocitos humanos que crecen sobre filtros de policarbonato, en condiciones aeróbicas, en un medio de cultivo definido y estandarizado, dando lugar a un tejido morfológicamente muy parecido a la epidermis humana. Está compuesto por estrato córneo, estrato granuloso y estrato espinoso. Se diferencia del tejido humano en el número de capas celulares que componen el estrato córneo y la epidermis, siendo éste mucho más fino. Además, aparecen gotículas de grasa que no se están en la piel humana natural, siendo sobre todo abundantes en el estrato basal. En cuanto a la composición lipídica, se observan menos fosfolípidos, más ceramidas y presencia de lanosterol, (que no está presente en la epidermis humana) en comparación con la piel humana natural. La relación fosfolípidos/ceramidas difiere de la piel humana natural.¹⁰

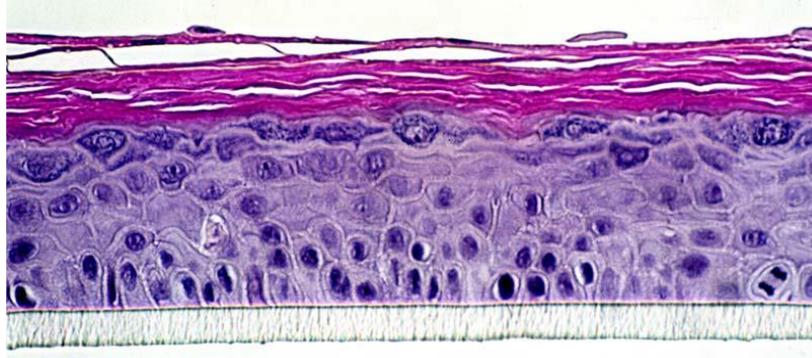


Figura 1. Fotografía cultivo celular SkinEthic

- **Episkin:** cultivo celular complejo que consiste en una matriz de colágeno bovino de tipo I, que representa la dermis. Esta capa está recubierta con una película de colágeno tipo IV, sobre la que se cultiva una epidermis estratificada y diferenciada derivada de un segundo pasaje de queratinocitos humanos. Presenta todas las capas que forman la piel humana, pero las células de la porción viable tienen una organización diferente a la piel humana natural. Se observan cambios en la forma de las células del compartimento suprabasal, que tienden a ser cúbicas, mientras que las superiores son aplanadas. Respecto al contenido lipídico también está alterado con respecto a la piel humana natural, hay menos fosfolípidos y más ceramidas, presencia de lanosterol y un contenido muy elevado de triglicéridos. La relación fosfolípidos/ceramidas difiere de la piel humana natural.¹⁰

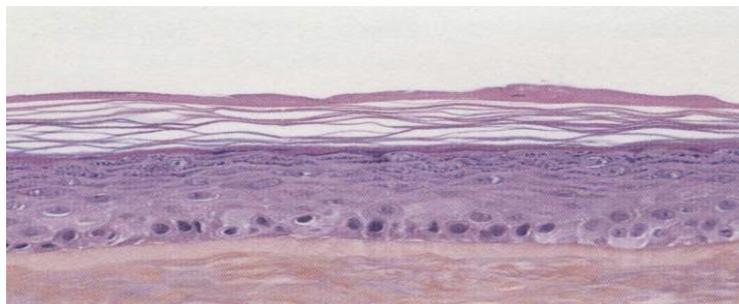


Figura 2. Fotografía cultivo celular Episkin.

- **EpiDerm®**: Este cultivo utiliza queratinocitos humanos normales que también crecen en condiciones especiales para dar lugar a un modelo de epidermis humana multicapa, compuesto de células completamente diferenciadas aireadas y cultivadas sobre filtros de policarbonato, comparable a epidermis humana real, ya que contiene todos los estratos. Este modelo presenta ciertas ventajas morfológicas respecto a los cultivos anteriores, ya que no difiere en cuanto al estrato basal porque sus células tienen forma de columna redondeada y, además, en aproximadamente el 50% de los cultivos aparecen hemidesmosomas. Las células del estrato espinoso son aplanadas, como en la epidermis humana, los cuerpos lamelares del estrato granuloso son normales y los gránulos de queratohielina son redondeados o con forma de estrella. Entre las diferencias más significativas con la piel humana es que la membrana basal es irregular, los lípidos intracelulares del estrato córneo del cultivo están presentes, pero su organización es muy diferente y aparecen gotículas lipídicas que no se encuentran en la piel humana natural. Respecto al contenido lipídico hay muchas más ceramidas que en la piel humana y presencia de lanosterol, pero la relación fosfolípidos ceramidas se aproxima mucho mejor a la situación real.¹⁰

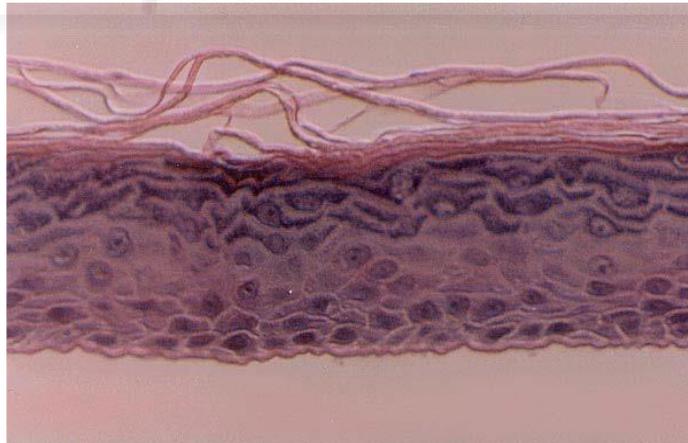


Figura 3. Fotografía cultivo celular EpiDerm.

De los 3 tipos de piel humana reconstituida hay dos que son mejores para evaluar la corrosión/irritación cutánea que son los modelos: **EpiDerm** y **Episkin**.

- **Episkin**: se basa en el 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyl tetrazolium bromide (**MTT**) test o test de citotoxicidad. Tras comprobar que el no activo no interfiere con el reactivo MTT y comprobar que hay transporte efectivo del activo, se aplica el producto a analizar más los controles positivo y negativo: 15 minutos a 37°C (50mg o 50µl por cm²). Después se elimina el reactivo y se mantienen las muestras epidérmicas durante un periodo de post-incubación de 42 horas a 37°C. Después se lleva a cabo el ensayo MTT y se comprueba el control positivo. Estudios preliminares realizados por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) han demostrado que el modelo Episkin es válido para distinguir entre los productos muy irritantes en la mayoría de los casos de los no irritantes.^{11,12}

- **Epiderm**: para demostrar que este modelo era válido para determinar la irritación de los productos cosméticos se hicieron 3 ensayos: 1º) en 3 laboratorios distintos se compararon 16 tensioactivos con el modelo EpiDerm y piel humana natural. Cuando cada laboratorio terminó de realizar las pruebas pusieron en común sus datos y los datos que había del modelo humano natural in vivo y la correlación entre ambos modelos fue muy parecida por lo que se demostró que era un buen modelo para identificar los productos cosméticos irritantes. 2º) Por otro lado se hicieron estudios para identificar los marcadores bioquímicos de la irritación cutánea que se miden antes de ocurrir la irritación en la piel, para ello se aplicó laurilsulfato sódico junto con agua pesada (óxido de deuterio) en el modelo EpiDerm y en el modelo de piel humana natural y se midió el nivel de irritación midiendo los niveles de ARNm en la Interleuquina-1 y estos tuvieron respuestas muy diferentes, esto se vio que es por la mala función barrera que tiene este modelo y debido a esto se concluyó: que este modelo es bueno para hacer un cribado de productos cosméticos los cuales

probablemente son irritantes y que debido a la baja función como barrera que tiene este modelo, este requiere una concentración más baja de producto para que se produzca la irritación que en la piel humana natural. 3º) Finalmente, se compararon 22 formulaciones de productos cosméticos para ver el potencial de irritación que tenían y se encontró una buena correlación entre un modelo y otro (utilizando las concentraciones de producto necesarias en cada modelo y que fueran equivalentes, ya que el modelo EpiDerm necesita menos producto que la piel humana) lo que indica que el modelo es útil para evaluar el potencial de irritación de los productos cosméticos. ¹¹

• **Irritación/Corrosión ocular**

Para este tipo de ensayo existen dos posibles métodos alternativos: el método de la opacidad corneal bovina y la prueba de permeabilidad (BCOP) y la prueba del huevo de gallina en la membrana corioalantoica (HET-CAM).

- **Método de la opacidad corneal bovina y la prueba de permeabilidad (BCOP).**

Los ojos bovinos se recogen al poco de fallecer el animal y para que se conserven son puestos en una solución salina a baja temperatura. A continuación, una vez se llega al laboratorio (tiene que estar cerca del matadero para que lleguen al laboratorio rápido en las mejores condiciones posibles) se observan las córneas de los ojos y se seleccionan las que no tengan ninguna lesión, estas son depositadas en la cámara especial BCOP y a continuación se les añade medio esencial mínimo (MEM), este se encontrará en contacto con el epitelio y endotelio corneal. Tras pasar 60 minutos de incubación en la cámara especial BCOP a 37°C y humedad controlada por los investigadores, se procede a realizar una lectura de la opacidad corneal con ayuda del opacímetro (Pre-Test).¹³

Ahora se pasa a la realización del ensayo, las córneas se dividen en 2 grupos: un grupo serán las corneas problema y el otro grupo las corneas control. Para

este ensayo se utilizan 2 tipos de controles: positivos y negativos, estos son esenciales para que este ensayo pueda ser aceptado y reproducible. Los controles positivos individuales se utilizan para probar productos cosméticos sólidos (se utiliza Imidazol al 20% en MEM) y líquidos (se utiliza etanol al 100%).¹³

La cornea del ojo se encuentra expuesta al cosmético que se va a analizar durante un intervalo de tiempo determinado según la capacidad irritante que tenga el producto. A continuación, tras este periodo de tiempo se lava la córnea para eliminar los restos de producto cosmético que puedan quedar y se vuelve a poner otra vez en la incubadora durante un tiempo. Una vez pasado este periodo de tiempo, la opacidad se vuelve a leer en el opacímetro y se registrara la opacidad de cada cornea de manera individual. A los valores de opacidad que obtengamos se le tienen que restar los valores obtenidos en el Pre-Test y así se obtienen los valores reales (correctos) de opacidad.¹³

Ahora se hace el ensayo de permeabilidad, se coloca el ojo en contacto con la fluorescencia y la fluorescencia penetra a través de la córnea al interior del ojo, entonces se coge una muestra de la cámara anterior del ojo y se pone en una cubeta de espectrofotometría y se mide con el espectrofotómetro ($\lambda=490\text{nm}$) la cantidad de fluorescencia disponible en la muestra. Se obtienen diferentes valores de densidad óptica dependiendo de la cantidad de fluorescencia que penetra a través de la córnea y se acumula en la cámara posterior del ojo.

Finalmente se hace el cálculo del valor de la puntuación in vitro, por el cual se obtienen diferentes valores con los que diremos si un producto cosmético es irritante o no.¹³

Puntuación In Vitro = Opacidad + 15 × cantidad fluoresceína

Puntuación in vitro	Resultados
0 - 25	Irritación Leve
25,1 – 55	Irritación Moderada
≥ 55,1	Irritación Severa

Tabla 1. Valores de puntuación que definen si un cosmético es o no irritante.

Limitaciones del método: no mide la irritación si esta se produce después de mucho tiempo de la aplicación, la córnea no tiene película lacrimal pudiendo dar como resultados falsos positivos, el laboratorio tiene que encontrarse cerca del matadero de animales porque los ojos no duran mucho después de morir el animal.

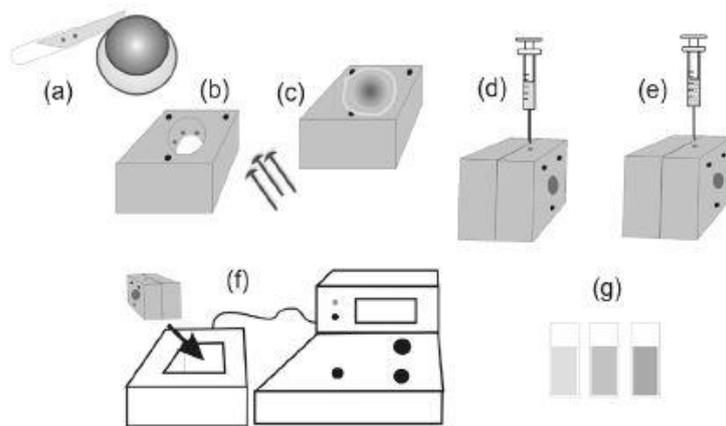


Figura 4. Método de la opacidad corneal bovina y la prueba de permeabilidad (BCOP).

- Test de la membrana corioalantoica en huevo fecundado de gallina (HET-CAM).

Este ensayo es un método validado alternativo a la experimentación animal para hacer ensayos de irritación/corrosión ocular. En él se usa una membrana corioalantoica de un huevo de gallina fecundado. Este ensayo mide el daño en la membrana y así se determina la capacidad de irritación ocular del producto cosmético administrado.¹³

Los efectos del producto cosmético los probamos en esta membrana porque se asume que estos efectos en los vasos sanguíneos y proteínas de la membrana son similares a los efectos que se producirían en el ojo de un conejo.¹³

Este método tiene 5 etapas:

1ª Etapa: los 20 huevos fecundados se limpian con etanol al 70% y se ponen en una incubadora a 37°C. Al cuarto día, son observados con la ayuda de una luz especial para verificar que existe un embrión y su posición dentro del interior del huevo y una vez visto esto, se cogen 10 huevos al azar y se les quita una parte de la cascara del huevo (parte con un espacio con aire) con cuidado de no romper la membrana y acto seguido se humedece dicha membrana con 2 ó 3 ml de NaCl 0,9%. Finalmente, la apertura se sella con una cinta transparente y se vuelve a meter el huevo en la incubadora.¹³

2ª Etapa: Las muestras problema se suspenden en agua o aceite vegetal (si el producto es sólido se añaden 0,3 gramos y si el producto es líquido se añaden entre 0,1 y 0,3 ml a la suspensión). El lauril sulfato sódico que tiene gran poder irritante se utiliza como control positivo, para ello se diluye en agua a una concentración de 0,01 molar. Los otros 10 huevos restantes que tenemos en la incubadora sin agujerito se observan diariamente y se utilizan como grupo control para monitorizar las condiciones ambientales en el interior de la incubadora.¹³

3ª Etapa: al décimo día los huevos se sacan de la incubadora y se les pone en la membrana un anillo de teflón (sirve para añadir la muestra en un sitio concreto de la membrana corioalantoica), se diluyen 40µl de la muestra problema y a continuación se añaden en la parte rodeada por anillo de teflón de cada huevo las muestras problema y el control positivo lauril sulfato sódico cada uno a un huevo diferente para que cada huevo solo contenga una disolución en su interior. A continuación, se vuelven a meter a la incubadora los huevos durante media hora. Se sacan de la incubadora y se evalúan los daños vasculares producidos (lisis, sangrado o coagulación) dentro del anillo de teflón con una linterna, usando el área de fuera del anillo como referencia (la propia membrana es el propio control), esto se hace al minuto y a los cinco minutos de sacar los huevos de la incubadora. Cuando terminamos volvemos a meter los huevos en la incubadora con la cinta transparente que tapa la parte abierta del huevo y se procede a registrar todos los efectos observados y si hay algún efecto vascular el

resultado se considera positivo. Acto seguido se determina la concentración de producto para la cual el 50% de los huevos muestra una respuesta positiva.¹³

4ª Etapa: Por última vez volvemos a sacar los huevos de la incubadora y se retira la tira transparente definitivamente y se procede a pelar el huevo completamente para mejorar el área visible de la membrana y ver mejor los efectos vasculares que se hayan podido producir. Los efectos vasculares se clasifican según la siguiente tabla:

Efectos Vasculares	Puntuación	Descripción
Ninguno	0	Reacción no observable
Vasos sanguíneos no detectables	1	Membrana sin sangre, aparentemente limpia
Inyección capilar	2	Aumento del flujo sanguíneo en vasos pequeños
Sangrado mínimo	3	El sangrado recubre <25% del área interna del anillo
Sangrado leve	4	El sangrado recubre entre el 25-50% del área interna del anillo
Sangrado moderado	5	El sangrado recubre entre el 50-75% del área interna del anillo
Sangrado Grave	6	El sangrado recubre un área interna del anillo >75%

Tabla 2. Efectos vasculares en la membrana corioalantoica por la muestra problema.

5ª Fase: Se calcula la puntuación total de la irritación con la siguiente ecuación¹³:

$$((301 - \text{Tiempo hemorragia}/300) * 5) + ((301 - \text{Tiempo lisis}/300) * 7) + ((301 - \text{Tiempo coagulación}/300) * 9)$$

Puntuación HET-CAM	Tipo de Irritación
0 – 0,9	No hay Irritación
1 – 4,9	Irritación Leve
5 – 9,9	Irritación Moderada
10 - 21	Irritación Grave

Tabla 3. Puntuación total que puede recibir la muestra problema y así definir como de irritante es.

Limitaciones del método: no mide la irritación si esta se produce después de mucho tiempo de la aplicación y no se puede evaluar el daño reversible.¹³

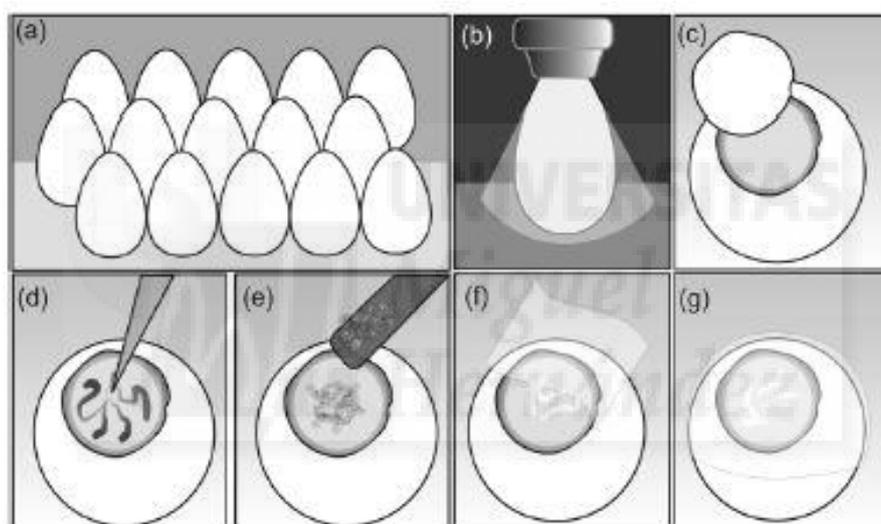


Figura 5. Test HET-CAM.

- **Toxicidad Crónica (Dosis Repetidas durante 28 días vía cutánea)**

En la actualidad **no existe ningún método alternativo aceptado y validado científicamente para el reemplazo de los ensayos in vivo**. Pero se está haciendo un gran esfuerzo por conseguirlos, algunos proyectos europeos que lo están intentando son:

- EU FP6 Predictions Project: Short-term models assay for long term toxicity. En este estudio utilizan cultivos celulares y los comparan con los datos de toxicidad crónica existentes en riñón e hígado.²
- EU FP7 SEURAT-1: hacia el reemplazo de test de toxicidad in vivo de dosis repetidas.²

- **Absorción dérmica**

Se deben diferenciar dos tipos de estudio: los que evalúan la permeabilidad del activo, es decir, la difusión de este a través de todas las capas de la piel hacia la circulación sistémica, para esto se utilizan las **células de difusión** o células de Franz. Y los que evalúan el grado de penetración del activo en las distintas capas de la piel y para esta evaluación se utiliza la técnica del **tappe stripping**.¹⁵

- **Células de difusión:** están formadas por 2 compartimentos, uno dador, con la solución de activo o la formulación a ensayar, y otro receptor, que contiene una solución receptora en la que se irá disolviendo la fracción absorbida, en el caso de los cosméticos lo que interesa es que no pase nada porque si pasara algo significaría que está pasando a circulación sistémica el activo y dejaría de ser un cosmético ya que estos solo pueden llegar como mucho a la dermis. Las células están hechas de vidrio y según su tamaño pueden contener volúmenes de 2 a 20 ml y sus áreas de difusión pueden ir desde 0.3 a 5 cm². Las células de difusión pueden ser estáticas o de flujo continuo, pero las más utilizadas en cosmética son las estáticas y de flujo vertical (tipo célula de Franz). El área de difusión es el espacio situado entre los dos compartimentos que ocupa la membrana que se utilizará en el estudio, generalmente la piel pero que puede ser de distinta naturaleza según la finalidad del ensayo planteado.¹⁵

El diseño del compartimento receptor puede tener un único brazo de muestreo a través del que se toman muestras a tiempos prefijados (células estáticas); o bien pueden tener dos, de modo que el contenido del compartimento receptor está en continua renovación tratando de simular el drenaje vascular.

Finalmente decir que en el compartimento receptor no se deben de formar capas estáticas ni burbujas de aire, por eso hay que ir rellenando el compartimento receptor con precaución y en las células estáticas para evitar la formación de capas estáticas se les introduce un imán y la célula de difusión se pone dentro de un vasito con un poco de agua encima de una mini placa termo-agitadora para que al encenderla se pueda agitar la solución del compartimento receptor y además se le aporte calor para que el sistema se encuentre a la temperatura óptima que estarían entre 30-32°C , así se consigue la homogeneización instantánea de la solución receptora y una temperatura constante. Lo recomendado es que este tipo de ensayos duren 24 horas. Finalmente se cogerán muestras del compartimento receptor para analizarlas y ver si hay formulación de ensayo. Cuando se haga este tipo de ensayo en un producto cosmético, al final del ensayo cuando analizamos las muestras nunca puede haber nada en el compartimento receptor porque eso significaría que el cosmético no llega a sangre como debe de ser.¹⁵

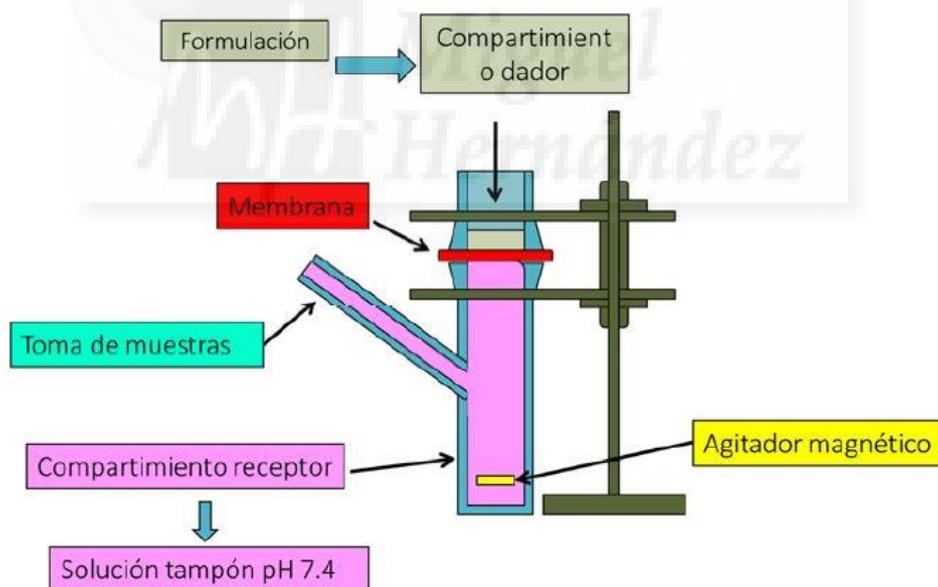


Figura 6. Esquema de una célula de difusión.

- Técnica de tappe stripping.

Esta técnica consiste en arrancar entre 15 y 20 cintas adhesivas (pesadas antes) en la zona donde se ha aplicado el producto sobre la piel. Al retirar las cintas, se determina por diferencia de peso el estrato córneo retirado y se cuantifica el contenido de la sustancia activa en las cintas, normalmente se utilizan: la espectrometría UV o la cromatografía (HPLC).

El proceso se realiza de la siguiente manera: se pone la formulación sobre un sitio de la piel que se encuentre delimitado (normalmente en el antebrazo ya que en esa zona no suele haber pelo ni zonas irregulares como heridas) y se extiende la formulación bien hasta dejar una capa muy fina y homogénea por toda la zona, a continuación se coloca una cinta sobre la piel libre y un rodillo (35 mm de diámetro, 45 mm de ancho) se mueve dos veces hacia atrás y adelante para aplicar una presión constante en la cinta y a continuación se retira la cinta con una pinza mediante un movimiento rápido.

Las tiras de cinta retiradas contienen partes del estrato córneo y cantidades de la sustancia aplicada por vía tópica. Se considera, de manera general, que utilizando 20 se elimina el estrato córneo completamente.¹⁶

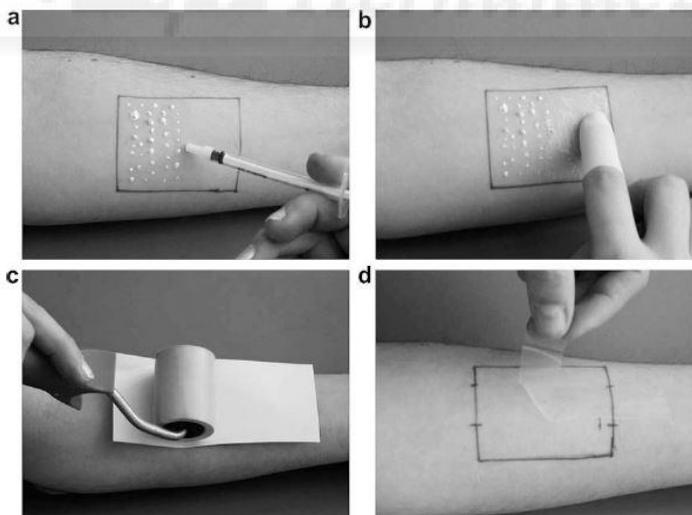


Figura 7. Técnica del tappe stripping.

• Fototoxicidad

El **ensayo de fototoxicidad in vitro 3T3 Absorción del Rojo Neutro (ARN)** se emplea para identificar el potencial fototóxico de una sustancia problema inducido por la sustancia excitada tras su exposición a la luz. Este método se encarga de medir la fototoxicidad mediante la reducción relativa de la viabilidad de las células expuestas a la sustancia en presencia de la luz respecto a las expuestas en la oscuridad.³

La citotoxicidad celular se mide mediante con la disminución de la absorción por parte de las membranas celulares del colorante vital rojo neutro a las 24 horas tras administrar la muestra problema e irradiación.³

El rojo neutro es un colorante catiónico débil, este penetra a través de la membrana celular y se acula en el interior de los lisosomas.

Los xenobióticos (sustancias extrañas) producen la alteración de la superficie de la membrana de los lisosomas lo que provoca una serie de cambios que producen una disminución de la absorción y fijación del rojo neutro con lo que es posible distinguir entre tres tipos de estados en los que se puede encontrar la célula: células viables, lesionadas y muertas.³

Este ensayo se comienza cultivando durante 24 horas un tipo celular llamado Balb/c3T3 para que se formen monocapas. Posteriormente se incuban durante 1 hora 2 placas de 96 pocillos por cada sustancia problema que queramos estudiar, cada placa con 8 concentraciones diferentes de cada sustancia y después se expone una de las dos placas a la dosis máxima de irradiación no citotóxica mientras que la otra se mantiene en la oscuridad. A continuación, en los pocillos de ambas placas juntamos el medio de cultivo con la sustancia problema y la incubamos otras 24 horas y medimos la viabilidad celular mediante la absorción de rojo neutro (Se mide la densidad óptica del extracto de Rojo Neutro a 540 nm en un espectrofotómetro, utilizando los blancos como referencia), a menor absorción menor viabilidad celular.³

La viabilidad celular se expresa en % respecto a los controles y se calcula para cada una de las concentraciones del ensayo y se comparan las respuestas a las distintas concentraciones con y sin irradiación.

Ahora se obtiene la concentración inhibitoria 50 (concentración a partir de la cual la viabilidad celular se reduce en un 50% con respecto a los controles).³



Figura 8. Absorción del Rojo Neutro según viabilidad celular.

• Sensibilización dérmica

Para la sensibilización dérmica se utiliza una prueba llamada la prueba del parche o “patch test” en la cual se utilizan voluntarios sanos para realizarla. Normalmente va a destinada a personas con dermatitis atópica, dermatitis de contacto, psoriasis, eczema crónico ya que estas suelen ser las personas más propensas a una reacción cuando se aplican un cosmético.¹⁷

La prueba se realiza de la siguiente manera: se cogen de 12 a 20 voluntarios sanos y la batería de cámaras cargadas con los alérgenos cosméticos se les debe colocar en la parte superior de la espalda debido a que hay mucha zona libre y no es pilosa, también se puede aplicar en la parte superior de brazos, pero siempre evitando las zonas con pelo. Para evitar que las cámaras se despeguen de la piel se utiliza esparadrapo no irritante, de esta manera se evita la falta de adherencia por contacto insuficiente de alguna cámara con la piel. A las 48 horas se procede a retirar la batería de cámaras y tras esta retirada se procede a la lectura por parte del médico después de 15 minutos, si los resultados dan positivos con respecto a algún antígeno se deben de registrar. El paciente debe

volver a la consulta del médico tras 72 y 96 horas de la aplicación de las pruebas para realizar otra lectura, estas lecturas son esenciales debido a que las reacciones de sensibilización suelen aparecer a partir de las 72 horas del contacto con el alérgeno cosmético. Si en las lecturas de las 72 y 96 horas las lecturas que salieron positivas a las 48 horas salen negativas lo que ocurre es que no era una reacción de sensibilización real, sino que solo hubo una irritación local al aplicar la prueba.¹⁷



Figura 8. Batería de cámaras cargadas con alérgenos.

CHART 2: Cosmetics series

Substance	Concentration	Vehicle
Germal 115	2.0%	Solid vas.
BHT	2.0%	Solid vas.
Toluenesulphonamide-formaldehyde resin	10.0%	Solid vas.
Triethanolamine	2.5%	Solid vas.
Bronopol	0.5%	Solid vas.
Chloracetamide	0.2%	Solid vas.
Sorbic Acid	2.0%	Solid vas.
Ammonium thioglycolate	2.5%	Solid vas.
Chlorhexidine	100%	Water
Amerchol	0.5%	Water

Figura 9. Serie de sustancias alérgenos o sensibilizantes en cosméticos.

Los resultados de la prueba se leen según los criterios establecidos por el “International Contact Dermatitis Research Group” (ICDRG).

? +	Dudoso
+	Reacción leve, posible eritema, infiltración y pápulas.
+ +	Reacción fuerte, eritema, infiltración, pápulas y vesículas.
+ + +	Reacción muy fuerte, eritema intenso, infiltración y vesículas.
IR	Reacción irritante, de varios tipos
NT	No testado

Figura 10. Respuestas a los Pach-Test acordadas por el Grupo internacional de Dermatitis de Contacto (ICDRG).

Finalmente, en cosméticos para asegurarnos de que el resultado positivo, negativo producido en la prueba cerrada es real habrá que hacer una prueba abierta repetida la cual consiste en que si se sospecha que una sustancia es sensibilizadora, se aplicará dos veces al día durante siete días en la porción anterior del brazo y si en dos o tres días se produce eccema la respuesta es positiva y el cosmético realmente contiene la sustancia sensibilizadora.¹⁷

6. Conclusiones.

Tras la realización de la revisión bibliográfica se ha podido establecer en relación con los objetivos las siguientes conclusiones:

Los **ensayos alternativos** a los ensayos en animales **más relevantes** a la hora de **evaluar los parámetros** conforme a los que establecemos si un cosmético es seguro y no produce toxicidad son:

- Modelos de piel humana reconstituida (**EpiDerm** y **Episkin**) para evaluar la toxicidad cutánea aguda
- El modelo HET-CAM en embriones de pollo es el modelo más reconocido para evaluar la toxicidad ocular aguda. También se acepta el uso del modelo BCOP.
- No hay ningún método alternativo a los ensayos en animales para evaluar la potencial toxicidad crónica
- Las células de difusión son un modelo válido para evaluar la permeabilidad del activo y el método de Tappe stripping para evaluar el grado penetración del mismo.
- Existen varios modelos validados para evaluar la fototoxicidad. El ensayo in vitro 3T3 basado en la Absorción del Rojo Neutro es uno de los más sencillos y fiables
- La sensibilización dérmica no se puede evaluar in vitro debido a la implicación del sistema inmune. Este parámetro se evalúa directamente en humanos utilizando la prueba del parche o "pach test".

Como conclusión general podemos determinar que los métodos alternativos a los ensayos con animales son variados y cubren muchos aspectos a evaluar de los cosméticos pero aun así todavía tienen muchas limitaciones y no suelen ser tan específicos como eran los ensayos en animales. En estas últimas décadas se están haciendo grandes esfuerzos tanto estatales como por parte de la industria privada para obtener y validar nuevos métodos muchos más completos y efectivos que permitan obtener datos fiables para asegurar la calidad, estabilidad e inocuidad de los cosméticos.

7. Bibliografía

1. Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009.
2. de Lapuente, Borrás, González-Linares, Llanas, Mitjans, Ramos-López, Vinardell. Los métodos alternativos en el estudio de la seguridad de cosméticos. *Revista de Toxicología [Internet]*. 2014; 31(2):140-8.
3. Reglamento (CE) n o 440/2008 de la Comisión, de 30 de mayo de 2008.
4. Directiva del Consejo, de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos.
5. Directiva 97/18/CE de la Comisión, de 17 de abril de 1997, por la que se aplaza la fecha a partir de la cual quedan prohibidos los experimentos con animales para ingredientes o combinaciones de ingredientes de productos cosméticos.
6. Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre productos cosméticos.
7. Real Decreto 85/2018, de 23 de febrero, por el que se regulan los productos cosméticos.
8. Gonzalez-Alvarez M, Gonzalez-Alvarez I, Noguera I, Bermejo M. Investigación animal para el desarrollo de nuevos fármacos: reducir, refinar o reemplazar. En: Universidad Miguel Hernández de Elche. *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*. España: Universidad Miguel Hernández; 2015. p. 161-80.
9. Vega R, García G, Hernández M, Guerra I, Bueno V, Vega Y et al. Evaluación In vivo de la actividad fototóxica de formulaciones cosméticas. *Acta Farm. Bonaerense*. 2002; 21(3):193-6.
10. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005; 60(2):167-78.
11. C. Faller, M. Bracher, N. Dami, R. Roguet. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of

- cosmetics, *Toxicol. In Vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2002; 16(5): 557–572.
12. P. Portes, M.H. Grandidier, C. Cohen, R. Roguet, Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. In Vitro*. 2002; 16 (6): 765–770.
 13. Cazedey E.C.L, Carvalho F.C, Fiorentino F.A.M, Gremião M.P.D, Salgado H.R.N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. *Braz. J. Pharm. Sci.* (2009); 45(4): 759-66.
 14. Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W, Düsing HJ, Gamer A, Haltner-Ukomadu E, et al. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *Altern Lab Anim*. 2008; 36(2):161-87.
 15. Anton T, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Bermejo M, Merino-Sanjuan V. Absorción transdérmica: Modelos in vitro. En: Universidad Miguel Hernandez de Elche. *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*. España: Universidad Miguel Hernandez; 2015. p. 321-30.
 16. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann H.J, Fluhr J.W. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009; 72(2): 317-23.
 17. Lazzarini R, Duarte I, Ferreira AL. Patch tests. *An Bras Dermatol*. 2013; 88(6): 879-88.