



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA (FARMÀCIA)

Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos *in vivo*, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácido

Verónica Martínez Ocaña

2007

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Valoración de la irritación dérmica y ocular	3
1.1.1. Anatomía del ojo humano.....	4
1.1.2. Irritación ocular: mecanismos implicados.....	7
1.1.3. Prueba de irritación ocular de Draize	9
1.1.4. Anatomía de la piel.....	12
1.1.5. Irritación dérmica: mecanismos implicados	16
1.1.6. Prueba de irritación dérmica de Draize	18
1.2. Principios éticos de la experimentación animal	19
1.3. Métodos alternativos	22
1.4. Validación de métodos alternativos.....	26
1.5. Métodos alternativos para valorar la irritación ocular y dérmica	29
1.5.1. Modelos basados en órganos	30
1.5.2. Modelos basados en sistemas de cultivo celular y tisular	31
1.5.3. Métodos basados en propiedades fisicoquímicas	33
1.5.4. Otros métodos para valorar la irritación.....	36
1.6. Los tensioactivos: compuestos con potencial irritante.....	36
1.6.1. Características generales de los tensioactivos.....	36
1.6.2. El desarrollo de nuevas moléculas	39
1.6.3. Los lipoaminoácidos.....	39
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. Tensioactivos estudiados	49
3.1.1. Estructuras lineales: N^α-acil-L-arginina metil éster	49
3.1.2. Estructuras diméricas: N^α,N^ω-bis(N^α-acilarginina)α,ω- alquilendiamidas	51

3.1.3. Estructuras del tipo glicerolípido.	52
3.2. Ensayos de irritación en modelos celulares	55
3.2.1. Ensayo de hemólisis	55
3.2.2. Ensayos de irritación en líneas celulares	58
3.3. Ensayos de irritación en un modelo organotípico.....	71
3.3.1. HET-CAM	71
3.3.2. Modificación del HET-CAM: CAM-TBS.....	73
3.4. Ensayos de irritación <i>in vivo</i>	75
3.4.1. Ensayo de irritación ocular	76
3.4.2. Ensayo de irritación dérmica	76
3.5. Análisis estadístico	78
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
4.1. Ensayos para valorar la irritación ocular	82
4.1.1. Ensayo de hemólisis	82
4.1.2. Ensayos basados en la membrana corioalantoidea: HET-CAM y CAM-TBS	92
4.1.3. Ensayo de irritación ocular de Draize.....	95
4.2. Ensayos para valorar la irritación dérmica.....	100
4.2.1. Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares	101
4.2.2. Liberación y producción de la citocina proinflamatoria IL-1 α en la línea celular NCTC 2544.....	116
4.2.3. Acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas	126
4.2.4. Ensayo de irritación dérmica de Draize	131
4.3. Últimas consideraciones.....	133
5. CONCLUSIONES.	135
6. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA.....	139
ANEXO	163

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Valoración de la irritación ocular y dérmica

La localización anatómica del ojo y de la piel **predispone** a estas estructuras a la exposición a una gran variedad de sustancias. Esta exposición, que puede ser accidental o voluntaria, puede provocar efectos adversos como la irritación. Por tanto, es muy importante que se evalúe el potencial irritante dérmico y ocular de cualquier producto químico, farmacéutico o cosmético, ya esté destinado o no a su aplicación tópica.

En este sentido, un caso acaecido en los años 30 en Estados Unidos significó el punto de partida para el desarrollo de métodos que garantizaran la seguridad de los productos cosméticos. En 1933, una mujer estadounidense de 38 años quedó ciega después de utilizar una máscara de pestañas que contenía parafenilendiamina, una sustancia química capaz de causar blefaritis alérgica, queratoconjuntivitis crónica y queratitis bacteriana secundaria (Wilhelmus, 2001). Este hecho despertó la preocupación social por la posible capacidad de cualquier producto de consumo de producir irritación y corrosión ocular. Como respuesta a este acontecimiento y a otros similares, el congreso de los Estados Unidos elaboró una ley en 1938, la *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*, que atribuía a los fabricantes la responsabilidad de la seguridad de sus productos cosméticos. Esta legislación obligaba a los fabricantes a evaluar la seguridad de sus productos antes de comercializarlos (Oser, 1987). John Draize y su equipo desempeñaron un papel muy importante en el desarrollo de métodos para evaluar la seguridad de los productos cosméticos. Durante los años 40 y como jefe del departamento de toxicidad dérmica y ocular de la *Food and Drug Administration* (FDA), desarrolló un método para valorar la toxicidad de los productos que se administran por vía tópica, tanto a nivel cutáneo como ocular. Las técnicas descritas por Draize fueron asimiladas rápidamente por la FDA y por muchos otros laboratorios que las acabaron incluyendo como protocolos habituales para ensayar un gran número de compuestos químicos y productos cosméticos. A principios de los años 60, empezaron a conocerse estos ensayos como la técnica de Draize o el ensayo de Draize. Actualmente, los métodos que utilizan animales de laboratorio para la valoración descriptiva de los efectos adversos sobre el ojo o la piel todavía se conocen como ensayos de Draize y se encuentran aprobados y aceptados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Las legislaciones de **la mayoría de países** todavía exigen la realización de estos ensayos antes de comercializar productos de administración tópica. Por tanto, la aplicación de sustancias en el ojo o la piel de conejos es el principal método utilizado para valorar los efectos

nocivos de las sustancias que pueden entrar en contacto con el ojo o la piel. Con estos ensayos se pueden identificar tanto los daños reversibles como los irreversibles (por ejemplo, la corrosión) y proporcionan una valoración cualitativa a la que se atribuye valor numérico que permite clasificar los compuestos en función de su efecto irritante.

1.1.1. Anatomía del ojo humano

En los humanos adultos, el globo ocular tiene un diámetro de unos 2,5 cm. De su área de superficie total, sólo queda expuesta al ambiente la sexta parte anterior, mientras que el resto se encuentra protegido por los párpados y la órbita ósea. Desde el punto de vista anatómico, la pared del globo ocular consta de tres capas también denominadas túnicas: la túnica fibrosa, la túnica vascular y la túnica nerviosa. La túnica fibrosa es la capa más externa y consta de la córnea, una lente transparente que se sitúa en la zona anterior, y la esclerótica, una capa opaca de tejido conjuntivo denso que proporciona elasticidad y rigidez al ojo. La túnica vascular o úvea es la capa intermedia y se compone de tres partes: coroides, cuerpo ciliar e iris. Finalmente, la túnica nerviosa es la capa más interna y está formada por la retina, una membrana donde se localizan los fotorreceptores y que se encuentra conectada al sistema nervioso central.

La **córnea** se organiza histológicamente en cinco capas principales: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 1.1). Para llegar hasta la retina, la luz debe atravesar la córnea, por tanto, la transparencia de esta lente es uno de los principales factores que afectan al correcto funcionamiento del ojo. Existen diversos aspectos anatómicos y fisiológicos que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de su transparencia como, por ejemplo, la ausencia de vascularización y pigmentación, la correcta organización histológica de las células epiteliales y endoteliales, la organización precisa de las láminas de colágeno en el estroma y el correcto funcionamiento de las células escamosas y cúbicas para eliminar agua de la córnea. La alteración de cualquiera de dichos aspectos podría provocar la opacidad de la lente y, por tanto, impedir su correcto funcionamiento.

La **conjuntiva** es una membrana mucosa que recubre tanto la superficie de la esclerótica que queda expuesta al ambiente (conjuntiva bulbar), como la superficie interna de los párpados (conjuntiva palpebral)

(Figura 1.1). La conjuntiva está vascularizada e inervada y posee glándulas conjuntivas y células inflamatorias.

El **iris** es uno de los componentes fundamentales de la túnica vascular. Se halla suspendido entre la córnea y el cristalino y su borde externo se inserta en los procesos ciliares (Figura 1.1). Está formado por fibras circulares y radiales de músculo liso y su función primordial es regular la cantidad de luz que llega al interior del globo ocular a través de la pupila. El sistema nervioso autónomo se encarga de la regulación del diámetro pupilar en respuesta a cambios en la intensidad de la luz.

Además, el globo ocular presenta unas estructuras accesorias: los párpados, las pestañas, las cejas, los músculos extrínsecos del ojo y el aparato lagrimal.

Los **párpados** son unos pliegues cutáneos que cubren los ojos durante el sueño, los protegen frente al exceso de luz y los cuerpos extraños y distribuyen secreciones lubricantes sobre los globos oculares.

Las **pestañas**, que surgen del borde de cada párpado, y las **cejas**, que describen un arco transversal por arriba del párpado superior, protegen al globo ocular frente a los cuerpos extraños, el sudor y la luz solar directa.

Los seis **músculos extraoculares**, que mueven el globo ocular, reciben inervación de los pares craneales III, IV o VI. Dichos músculos son los rectos superior, inferior, externo e interno del ojo, y los oblicuos superior e inferior. En general, sus unidades motoras son pequeñas. Algunas motoneuronas inervan solo dos o tres fibras musculares lo cual hace posible que los ojos presenten esos movimientos tan rápidos, uniformes y precisos.

El **aparato lagrimal**, integrado por un grupo de estructuras, produce y drena las lágrimas. Las glándulas lagrimales, cada una del tamaño y forma aproximados de una almendra, secretan un líquido acuoso (que sale a través de seis a doce conductos lagrimales) que se vierte en la superficie conjuntival del párpado superior. Las lágrimas son una solución acuosa que contiene sales, algo de moco y lisozima, una enzima protectora que destruye las bacterias. Además protegen, limpian, lubrican y humectan el globo ocular. Después de secretadas, las lágrimas fluyen en sentido medial sobre la superficie del globo ocular, gracias al parpadeo. Cada glándula produce diariamente casi 1 ml de esta solución.

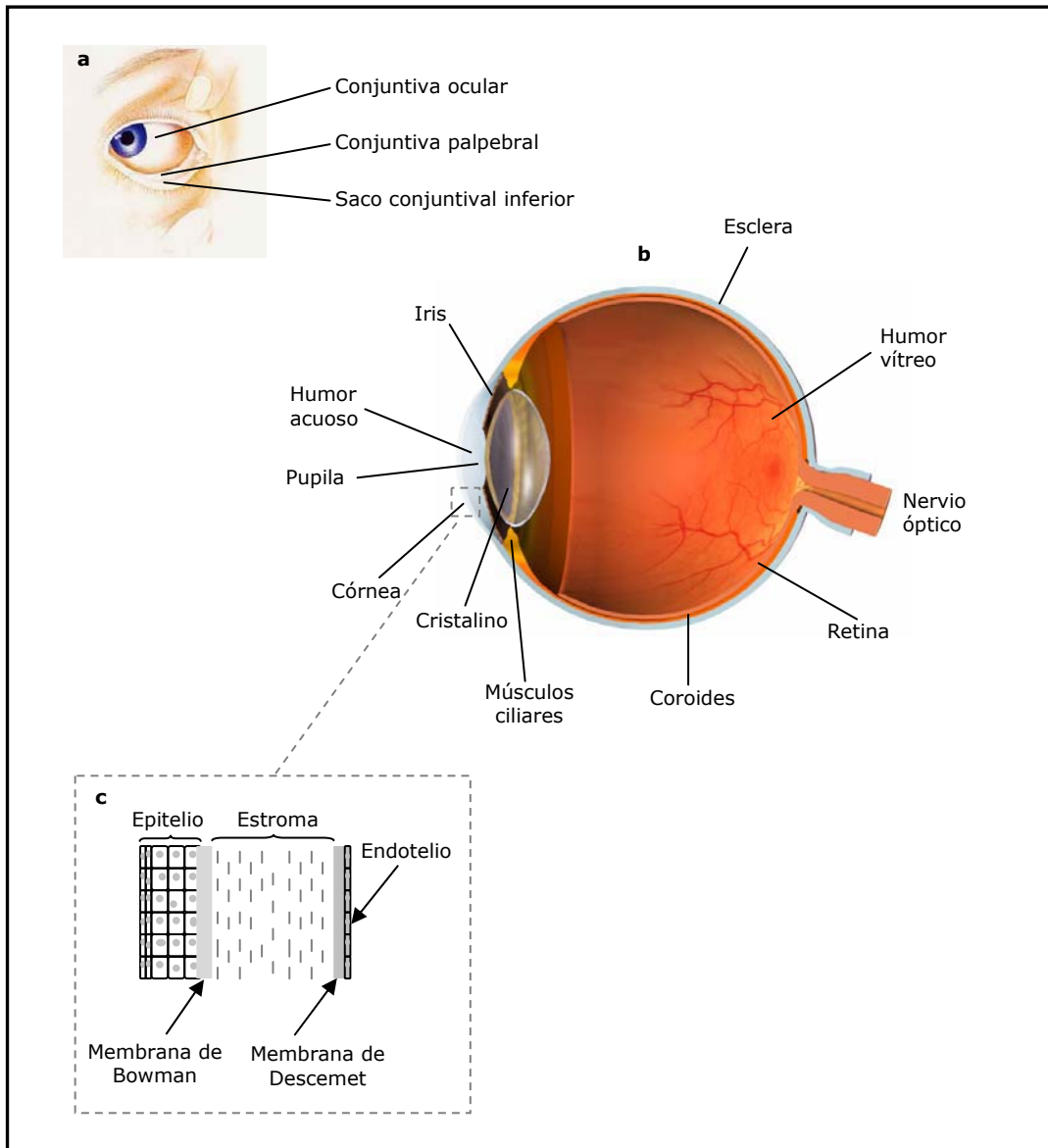


Figura 1.1. Esquema de la anatomía del ojo. En la parte superior (a) se muestra la localización de la conjuntiva que recubre la parte externa del globo ocular y la cara interna de los párpados. También se muestran todas las estructuras que forman el globo ocular (b) y la organización histológica de la córnea (c).

En condiciones normales, tanto la producción como la eliminación de las lágrimas se llevan a cabo a la misma velocidad, ya sea porque estas se evaporan o bien porque fluyen por los canales lagrimales y de estos a las fosas nasales. Sin embargo, cuando una sustancia irritante entra en contacto con la conjuntiva, estimula la sobreproducción de las glándulas lagrimales y su secreción se acumula. La lagrimación es un mecanismo protector, pues las lágrimas diluyen y arrastran la sustancia irritante.

1.1.2. Irritación ocular: mecanismos implicados

En las reacciones de irritación ocular, quizá el tejido más importante del globo ocular es la córnea cuya estructura proteica muy organizada permite el paso libre de la luz a través de ella. Algunas sustancias químicas pueden alterar la estructura de la córnea hasta el punto de perder su transparencia, de modo que pueden provocar pérdida parcial de visión o incluso ceguera. Aunque los párpados le ofrecen cierta protección, es una estructura muy sensible a las lesiones químicas.

Alrededor de un 80 % de la estructura de la córnea está formada por el estroma, una red muy organizada de macromoléculas que permite el paso de la luz gracias a su elevado nivel de organización y un nivel de hidratación apropiado. Existen dos capas celulares muy activas que se encargan de mantener ese nivel de hidratación (de un 75 a un 80 % de agua): el endotelio, formado por una única capa de células y que recubre la superficie interna de la córnea, y un epitelio mucho más grueso que recubre la superficie externa (Figura 1.1 c). Esas dos capas evitan la entrada al estroma corneal de más agua de la necesaria que podría provocar opacidad y edema. Además, el epitelio tiene una segunda función ya que proporciona una barrera física que impide la entrada de materiales extraños. La pérdida de la impermeabilidad transepitelial, debida a daños sobre las uniones estrechas y los desmosomas que unen las células del epitelio, es uno de los fenómenos iniciales en las lesiones inducidas por productos químicos (Botham y cols., 1997). De modo que, si el epitelio se lesiona puede aparecer opacidad corneal. Sin embargo, niveles de opacidad menos graves pueden revertirse dado que el epitelio tiene la capacidad de autorregenerarse a través del movimiento de las células de alrededor hasta cubrir la herida o mediante el remplazo de las células dañadas por división celular. En cambio, el endotelio no es capaz de repararse. Por ese motivo, las lesiones sobre esas células pueden tener consecuencias graves como la ceguera permanente (Curren y Harbell, 1998).

Tabla 1.1. Posible secuencia de acontecimientos en la irritación ocular inducida por productos químicos. En cursiva se destacan los acontecimientos que pueden ser irreversibles.

1. Interacción química con la película de lágrima
2. Unión de los productos químicos al epitelio conjuntival
3. Alteración de las moléculas de adhesión
4. Lesiones en el epitelio corneal
 - Inhibición del transporte mediado por receptor a través de la membrana
 - Pérdida de la integridad del epitelio corneal exterior
5. Lisis de las membranas celulares de todas las capas del epitelio de la córnea
6. Acumulación de agua en el estroma corneal
7. *Entrecruzamiento de las proteínas del estroma corneal*
8. *Erosión del estroma corneal*
9. *Daños celulares en el epitelio corneal*
10. *Dilatación y liberación de elementos procedentes de los vasos linfáticos de la esclerótica (edema y eritema)*
11. *Estimulación de las terminaciones nerviosas (aumento del parpadeo y del lagrimeo)*
12. *Erosión de las terminaciones nerviosas en la córnea y la esclerótica*

La conjuntiva, que recubre la parte del globo ocular que queda expuesta al ambiente, está formada por un epitelio escamoso no queratinizado y es muy sensible a las sustancias extrañas. Cuando una sustancia irritante entra en contacto con la conjuntiva se inicia un proceso inflamatorio que puede provocar la dilatación de la red vascular de la conjuntiva confiriéndole a la membrana un aspecto enrojecido. Asimismo, se pueden producir cambios en la permeabilidad de los capilares provocando la aparición de edema al acumularse líquidos en los espacios intersticiales. Algunos productos que son ligeramente irritantes pueden provocar conjuntivitis sin provocar daños sobre la córnea. Los efectos de los productos químicos sobre la conjuntiva suelen ser reversibles (Nevell, 1996; Curren y Harbell, 1998).

El iris se sitúa por detrás de la córnea y se encuentra rodeado por el humor acuoso. Es una estructura vascular formada por tejido conjuntivo laxo, fibras musculares y células pigmentadas. La irritación también puede provocar sobre esta estructura la dilatación de los vasos sanguíneos y la liberación de

líquidos vasculares que provocan edema. Además, al producirse daños sobre el iris, la liberación de proteínas procedentes de la sangre al humor acuoso puede cambiar su índice de refracción provocando alteraciones en la visión. Daños más graves pueden provocar la destrucción del tejido del iris que tiene como consecuencia la pérdida de su reactividad a la luz (Curren y Harbell, 1998).

1.1.3. Prueba de irritación ocular de Draize

El ensayo de irritación ocular *in vivo* valora los efectos adversos de las sustancias sobre la córnea, el iris y la conjuntiva. De la córnea, se valora la opacidad y el área afectada; del iris, la presencia de inflamación, pliegues, edema, inyección ciliar circuncorneal, fotofobia, hemorragia y destrucción del tejido; y de la conjuntiva, el grado de enrojecimiento, quemosis y la presencia de exudados. En el método de análisis desarrollado por Draize y sus colaboradores (1944), las alteraciones provocadas por la sustancia irritante tienen una gravedad distinta en función de la zona que esté más afectada. Los daños sobre la córnea tienen mayor importancia a la hora de clasificar una sustancia como irritante o corrosiva (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Tabla de valoraciones descrita por Draize que permite convertir las observaciones subjetivas individuales de los tres tejidos oculares en un único valor numérico para estimar la lesión ocular total (Draize y cols., 1945). El sistema de valoración de las lesiones adoptado por la legislación europea y la OCDE es ligeramente distinto y se muestra más adelante en la Tabla 3.7.

Córnea	
A. Opacidad: grado de densidad (se tendrá en cuenta la zona más densa)	
Sin opacidad.....	0
Zonas de opacidad diseminadas o difusas.....	1
Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos.....	2
Zona nacarada; no se ven detalles del iris; el tamaño de la pupila apenas es discernible.....	3
Córnea opaca; no se distingue el iris a su través.....	4
B. Área de la córnea afectada	
Una cuarta parte (o menos) pero no cero.....	1
Más de una cuarta parte pero menos de la mitad.....	2
Más de la mitad pero menos de tres cuartas partes.....	3
Más de tres cuartas partes hasta cubrir toda el área.....	4
<i>Cálculo del valor total = A X B X 5; Valor total máximo = 80</i>	

Iris	
A. Valoración	
Normal.....	0
Pliegues notablemente hundidos, congestión, inflamación, moderada hiperemia o inyección circuncorneal; iris reactivo a la luz (si la reacción es defectuosa se considera como efecto).....	1
Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz.....	2
<i>Cálculo del valor total = A x 5; Valor total máximo = 10</i>	
Conjuntiva	
A. Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar; se excluye la córnea y el iris)	
Normal.....	0
Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyectados).....	1
Coloración carmesí difusa; no se distinguen fácilmente los vasos individuales.....	2
Coloración carne difusa.....	3
B. Quemosis	
Normal.....	0
Cierta hinchazón superior a lo normal (incluyendo la membrana nictitante).....	1
Hinchazón evidente con eversión parcial de los párpados.....	2
Hinchazón con párpados medio cerrados.....	3
Hinchazón con párpados más que medio cerrados.....	4
C. Lagrimeo	
Sin lagrimeo.....	0
Cierta cantidad de lágrima por encima de lo normal (sin incluir la pequeña cantidad que queda en el cantus interior de los ojos no tratados).....	1
Lagrimeo que humedece los párpados y el pelo adyacente.....	2
Lagrimeo que humedece los párpados y una región considerable alrededor de los ojos.....	3
<i>Cálculo del valor total = (A + B + C) x 2; Valor total máximo = 20</i>	

Limitaciones y críticas al ensayo de Draize ocular

El ensayo de Draize ocular ha sido objeto de un análisis exhaustivo. Entre los aspectos valorados se encuentran: el modo de realización de la prueba, su reproducibilidad y relevancia, la utilidad e interpretación de las valoraciones, el coste económico y las implicaciones éticas. Las numerosas variaciones que ha sufrido este ensayo durante los últimos 50 años ponen de

manifiesto la existencia de múltiples aspectos que todavía no se han resuelto satisfactoriamente. Entre ellos se encuentran los siguientes:

1. La valoración de la irritación ocular es tan solo un componente más a la hora de entender el perfil toxicológico de una sustancia. La Toxicología ocular moderna no se basa únicamente en los estudios realizados en animales sino que también tiene en cuenta métodos *in vitro*, modelos asistidos por ordenador y la experiencia en humanos (Goldberg y Frazier, 1989).
2. El ensayo de Draize fue desarrollado para evaluar sustancias que, por su función, entran en contacto con el ojo o con las zonas anejas, como las preparaciones oftalmológicas y los cosméticos. Por tanto, cuando se trata de otro tipo de productos, como sustancias químicas industriales o productos de limpieza, que solo entran en contacto con el ojo en el caso de una exposición accidental, la utilización del ensayo de Draize no sería apropiada ya que la instilación de una cantidad fija de producto no se ajusta a las condiciones de una exposición accidental (Schlatter y Reinhardt, 1985). En estos casos, la finalidad de las pruebas toxicológicas es proporcionar información necesaria para el manejo y el etiquetado correcto del producto.
3. Los signos valorados en el ensayo de Draize no son los únicos implicados en las lesiones oculares y la importancia otorgada a cada uno de ellos es arbitraria. Únicamente se valoran aquellos signos que son fácilmente observables, mientras que posibles cambios a nivel microscópico o molecular no se tienen en cuenta (Wilhelmus, 2001).
4. La reproducibilidad de este ensayo está limitada por las múltiples variables que intervienen en su valoración. Existen diferentes causas de variación en los resultados del ensayo: el tipo de animal, la tasa de liberación de un producto respecto a su vehículo, la cantidad de lagrimeo, la zona del ojo donde se instila la sustancia, la facilidad con la que se puede valorar la gravedad de las lesiones y, por supuesto, la subjetividad del observador. Además, animales de la misma cepa pueden responder de forma distinta al mismo producto y diferentes observadores pueden obtener resultados distintos del mismo ensayo (York y Steiling, 1998).
5. Existen razones anatómicas y fisiológicas que indican que los ojos del conejo no son adecuados para predecir efectos adversos en humanos. Entre las razones anatómicas cabe resaltar la presencia de la membrana nictitante o tercer párpado en el ojo del conejo. Se cree que esta

membrana podría servir de ayuda para la eliminación de sustancias irritantes en contacto con la superficie corneal debido a que se desliza horizontalmente sobre el ojo (Calabrese 1983). También se ha propuesto que la cinética de eliminación de sustancias puede ser más rápida en el conejo debido a este tercer párpado, aunque todavía no se haya documentado en estudios comparativos. Otra diferencia importante es el tamaño del saco conjuntival que en el conejo es mayor y, por tanto, permite la instilación de volúmenes mayores, quizá superiores a los que suelen encontrarse en exposiciones accidentales (Curren y Harbell, 1998).

6. El grosor de la córnea y de sus componentes estructurales es distinto entre las dos especies. La córnea del conejo tiene un grosor aproximado de 0,37 mm mientras que en la córnea humana es de 0,51 mm (Calabrese, 1983). Por otro lado, el área de la córnea en relación con la superficie total del globo ocular también varía de manera significativa entre especies; en la especie humana esta relación es del 7 %, mientras que en el conejo es del 25 % (Swanston, 1985). Además, los conejos tienden a secretar menor cantidad de lágrima. Para concluir, los conejos jóvenes tienen la capacidad de regenerar el endotelio corneal dañado, un fenómeno que no se da en humanos.

1.1.4. Anatomía de la piel

La piel forma la superficie externa continua o *tegumento* del cuerpo. Es el mayor órgano del cuerpo y constituye casi una sexta parte del peso corporal total. Tiene cuatro funciones principales:

- **Protección.** La piel nos protege de las radiaciones ultravioletas, así como de las agresiones mecánicas, químicas y térmicas. Su superficie relativamente impermeable previene la deshidratación y actúa como una barrera física frente a la invasión de microorganismos.
- **Sensibilidad.** La piel es el principal órgano sensitivo del cuerpo y contiene diversos receptores para el tacto, la presión, el dolor y la temperatura.
- **Termorregulación.** En los seres humanos, la piel constituye el órgano principal implicado en los procesos de termorregulación. El cuerpo evita las pérdidas de calor gracias a la presencia de pelos y tejido subcutáneo adiposo. La pérdida de calor se ve favorecida por la evaporación del sudor en la superficie cutánea y por un incremento en el flujo sanguíneo de la rica red vascular de la dermis.

- Funciones metabólicas. El tejido adiposo subcutáneo constituye un gran almacén de energía, principalmente en forma de triglicéridos. La vitamina D se sintetiza en la epidermis para complementar la obtenida por la alimentación.

Desde el punto de vista estructural, la piel consta de dos partes principales (Figura 1.2):

1. Epidermis: la zona superficial y más delgada que está constituida por un epitelio escamoso queratinizado.
2. Dermis: la zona más profunda y gruesa que está formada por una capa de tejido fibroelástico denso.

La epidermis recibe soporte y nutrición a través de la dermis, estructura que posee una red vascular muy rica y contiene numerosos receptores sensitivos.

1.1.4.1. Epidermis

La epidermis está formada por un epitelio escamoso estratificado y queratinizado. Contiene cuatro tipos principales de células: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

Prácticamente el 90-95 % de las células epidérmicas son queratinocitos, que producen queratina. Alrededor del 8 % corresponde a los melanocitos, los responsables de la pigmentación cutánea. Sus prolongaciones celulares largas y delgadas se extienden entre los queratinocitos y les transfieren gránulos de melanina, un pigmento que varía de marrón a negro, el cual contribuye al color de la piel y absorbe la luz ultravioleta dañina. Una vez dentro de los queratinocitos, estos gránulos se aglutinan para formar una capa protectora sobre el núcleo, en la zona orientada a la superficie cutánea. De esta manera, protegen el DNA nuclear de la luz ultravioleta.

Las células de Langerhans son representantes especializados del sistema mononuclear-fagocítico y actúan como células presentadoras de antígeno. Se originan en la médula ósea roja y emigran a los estratos inferiores de la epidermis, donde constituyen una pequeña proporción de las células. Participan en las reacciones inmunitarias contra los microorganismos que invaden la piel; además, les afecta fácilmente la luz ultravioleta.

Las células de Merkel son las menos numerosas de la epidermis. Se localizan en la capa más profunda de ésta, donde tienen contacto con las prolongaciones aplanadas de neuronas sensoriales, unas estructuras llamadas

discos táctiles o de Merkel. Las células y los discos de Merkel participan en las sensaciones táctiles.

La epidermis está formada por diversas capas de células que se organizan en cinco estratos:

1. *Estrato basal.* Es la capa germinativa de la epidermis y la de localización más profunda. Consiste en una sola hilera de queratinocitos cúbicos o cilíndricos, algunos de los cuales son células madre, que están en división celular constante para producir continuamente nuevos queratinocitos. Los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel se encuentran dispersos entre los queratinocitos del estrato basal.
2. *Estrato espinoso.* Situado sobre el estrato basal, consta de ocho a diez capas de queratinocitos poliédricos estrechamente unidos. A medida que sus células se acercan a la superficie, éstas se hacen cada vez más planas. Además presentan unas prolongaciones espinosas de filamentos intermedios del citoesqueleto que se insertan en desmosomas para originar la unión estrecha de las células. Esta disposición proporciona resistencia y flexibilidad a la piel. También se observan prolongaciones de las células de Langerhans y de los melanocitos.
3. *Estrato granuloso.* Está localizado en la parte central de la epidermis, consta de tres a cinco capas de queratinocitos aplanados en los que se desencadena el proceso de apoptosis. Los núcleos y otros orgánulos de estas células se encuentran en proceso de degeneración y los filamentos intermedios son más evidentes. Los queratinocitos también contienen unos gránulos laminares, envueltos por una membrana, los cuales liberan una secreción de alto contenido en lípidos que ocupa los espacios entre las células del estrato granuloso y otras más superficiales de la epidermis. Dicha secreción funciona como un sellador impermeable. Al eliminarse su núcleo, las células ya no pueden llevar a cabo sus funciones metabólicas vitales y mueren. Así pues, el estrato granuloso marca la transición entre los estratos profundos metabólicamente activos y las células muertas de los estratos superficiales.
4. *Estrato lúcido.* Se encuentra sólo en la piel de las yemas de los dedos, palmas de las manos y plantas de los pies. Consta de tres a cinco capas de queratinocitos transparentes, planos y muertos, que contienen filamentos intermedios muy apiñados y poseen una membrana plasmática engrosada.

5. *Estrato córneo*. Está constituido por unas 25 a 30 capas de queratinocitos muertos y planos llenos de queratina madura. Entre las células hay lípidos de los gránulos laminares que ayudan a hacer impermeable el estrato. Esas células se desprenden constantemente y las sustituyen otras de estratos más profundos. El estrato córneo sirve como barrera impermeable efectiva y también protege de lesiones y microbios.

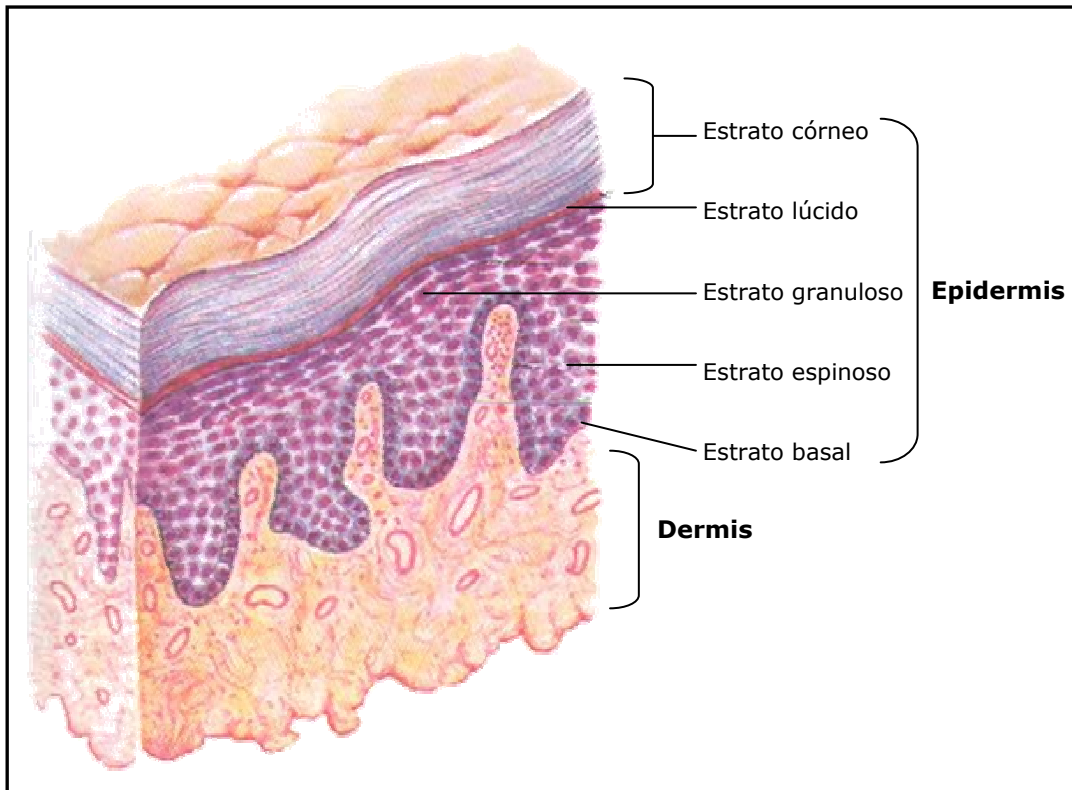


Figura 1.2. Corte anatómico de la piel donde puede verse la organización de la epidermis y de la dermis (Imagen obtenida en la siguiente dirección <http://distance.stcc.edu/AandP/AP/AP1pages/Units1to4/epistissmol/skin.htm>).

1.1.4.2. Dermis

La capa profunda de la piel es la dermis que está compuesta fundamentalmente de tejido conjuntivo que contiene colágeno y fibras elásticas. Las células de la dermis son principalmente fibroblastos responsables de la síntesis del colágeno, la elastina y la sustancia fundamental. También están presentes varios tipos de células de la línea blanca, mastocitos y macrófagos tisulares que intervienen en funciones de defensa inespecífica y vigilancia inmunológica. La dermis posee vasos sanguíneos, nervios, glándulas y folículos pilosos. De acuerdo con su estructura tisular, la dermis está dividida en dos zonas:

1. *Dermis papilar*. Es la porción superficial de la dermis y le corresponde una quinta parte del grosor total de la dermis. Está constituida por tejido conjuntivo areolar que contiene fibras elásticas finas. Su área superficial aumenta considerablemente gracias a pequeñas protuberancias digitiformes llamadas papilas dérmicas. Estas estructuras penetran en la epidermis y contienen asas capilares. Algunas papilas dérmicas también incluyen receptores táctiles, denominados corpúsculos táctiles o de Meissner, que son terminaciones nerviosas sensibles al tacto. En las papilas dérmicas, también existen terminaciones nerviosas libres, o sea dendritas que carecen de especialización estructural apreciable. Dichas terminaciones envían impulsos que finalmente se traducen en sensaciones de calor, frío, dolor, cosquilleo y comezón.
2. *Dermis reticular*. Es la parte profunda de la dermis y está formada por tejido conjuntivo denso e irregular con haces de fibras de colágeno y algunas fibras elásticas gruesas. Los haces de fibras de colágeno de esta región se entrelazan en forma de red. Los espacios entre las fibras están ocupados por varios adipocitos, folículos pilosos, nervios, así como glándulas sebáceas y sudoríparas. La combinación de fibras de colágeno y elásticas de esta capa proporciona a la piel su resistencia, extensibilidad (capacidad para extenderse) y elasticidad (capacidad para regresar a su forma original después del estiramiento).

1.1.5. Irritación dérmica: mecanismos implicados

Se define irritación dérmica como una reacción inflamatoria local de efectos reversibles. Se caracteriza por la aparición de eritema (enrojecimiento) y edema (acumulación de líquido en el intersticio celular) tras la aplicación de un compuesto químico en una zona determinada de la piel. En los procesos agudos de irritación aparece principalmente inflamación mientras que la irritación crónica se caracteriza fundamentalmente por una hiperproliferación y una hiperqueratosis transitoria (Berardesca y Distante, 1994).

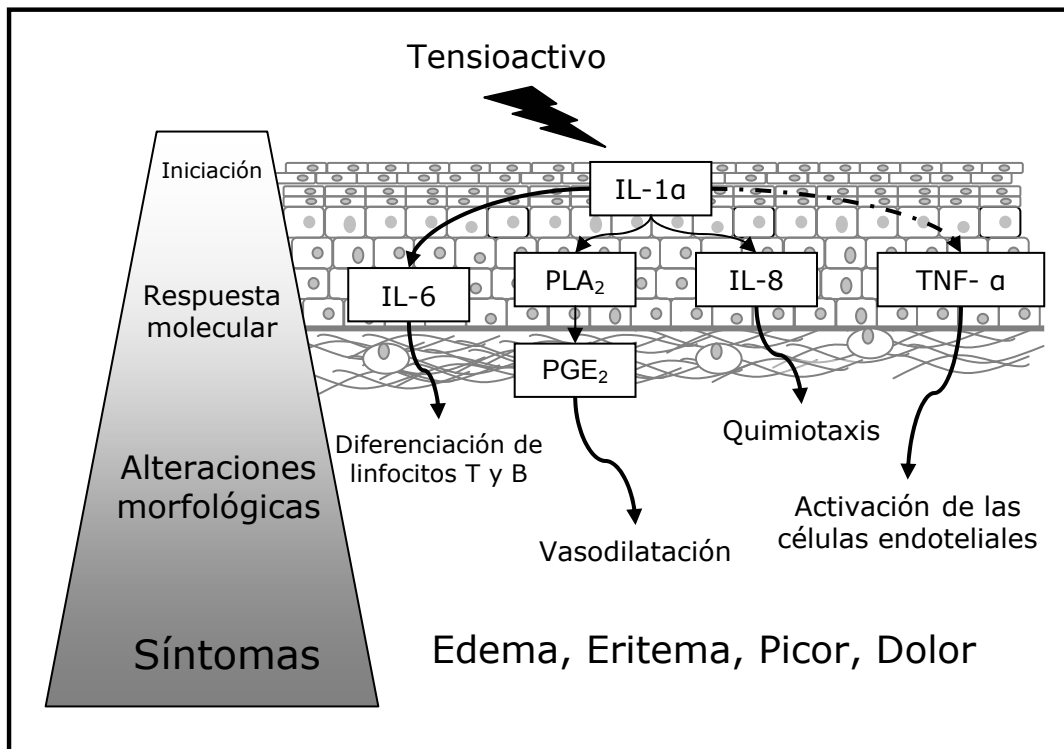


Figura 1.3. Mecanismo de irritación dérmica provocada por tensioactivos. Se ha propuesto la siguiente pauta de acontecimientos: los tensioactivos inducen una liberación inicial de IL-1 α que provoca la síntesis y liberación de mediadores secundarios (respuesta molecular). Esta respuesta va seguida por una serie de alteraciones morfológicas que provocarán, finalmente, la aparición de los primeros síntomas (Adaptado de Welss y cols., 2004).

Los mecanismos bioquímicos implicados en la irritación dérmica son muy complejos y todavía no se conocen en detalle. Un producto químico puede provocar irritación no solo mediante la destrucción directa del tejido sino que puede alterar distintas funciones celulares provocando la liberación, formación y activación de autacoides. En la piel, los autacoides inician una cascada de reacciones que acaba provocando inflamación. Entre los autacoides encontramos la histamina, los metabolitos del ácido araquidónico, las cininas, el sistema del complemento, algunas especies reactivas del oxígeno y las citocinas. En la Figura 1.3 se muestra una posible secuencia de acontecimientos tras la exposición de la piel a un tensioactivo, una serie de compuestos químicos muy utilizados en preparaciones que pueden entrar en contacto con la piel.

En el caso de las células epidérmicas, el mecanismo principal que utilizan para participar en las reacciones inflamatorias de la piel es la producción y liberación de citocinas. Los queratinocitos, que constituyen aproximadamente un 90 o 95 % de las células de la epidermis, son una fuente

muy importante de citocinas y, por tanto, desempeñan un papel decisivo en el inicio y el mantenimiento de las reacciones inflamatorias (McKenzie y Sauder, 1990). En condiciones normales, los queratinocitos producen algunas citocinas constitutivamente, como la interleucina-1 α (IL-1 α) (Dinarello, 1998), pero también son capaces de producir otras citocinas (TNF- α , IL-8, IL-6,...) en respuesta a estímulos externos (Sims y cols., 1993). Sin embargo, entre todas las citocinas que son capaces de producir y liberar, únicamente la IL-1 α , la IL-1 β y el TNF- α activan un número suficiente de efectores para desencadenar por sí mismos un proceso inflamatorio (Kupper, 1990).

1.1.6. Prueba de irritación dérmica de Draize

El ensayo de irritación dérmica se basa en la aplicación de una sustancia, ya sea líquida o sólida, en una pequeña área de la piel de un mamífero. Según la guía 404 de la OCDE, pueden utilizarse diversas especies de mamífero aunque se recomienda la utilización del conejo albino, en concreto la cepa New Zealand. Después del tiempo de aplicación, generalmente 4 horas, se valora la aparición de eritema o edema en la zona tratada.

Del mismo modo que con el ensayo de Draize ocular, el ensayo dérmico ha recibido numerosas críticas tanto por la subjetividad inherente al procedimiento de evaluación como por la posibilidad de causar lesiones graves y dolor a los animales usados en el estudio. Existe una enorme presión social liderada por las sociedades y organizaciones protectoras de animales que promueven una legislación restrictiva del mercado de productos cuyos ingredientes han sido ensayados en animales (Robinson y cols., 2002). Por esta razón, en la actualidad, la predicción de la toxicidad dérmica aguda inducida por compuestos químicos es un área en la que se están haciendo considerables esfuerzos dirigidos al desarrollo y validación de métodos alternativos.

Limitaciones y críticas al ensayo de Draize dérmico

Algunos de los aspectos ya mencionados que limitan la aplicación y la eficacia del ensayo de Draize ocular también son aplicables al ensayo dérmico. La valoración de las lesiones es subjetiva y la reproducibilidad del ensayo también está limitada por múltiples factores. Además, una sencilla comparación visual permite concluir que la piel humana y la piel de un animal como el conejo son muy distintas. Entre las diferencias anatomohistológicas cabe destacar:

1. La presencia de un pelaje denso que recubre la piel de la mayoría de los mamíferos. Se sabe que existe una relación inversa entre la densidad del pelo de un animal y el grosor de su epidermis. Por tanto, la epidermis humana es más gruesa que la del conejo. Asimismo, el grosor de la piel también varía en función de la región corporal.
2. El sudor humano está producido por glándulas sudoríparas ecrinas mientras que en los animales predominan las glándulas de tipo apocrino. Las glándulas sudoríparas ecrinas liberan el sudor directamente sobre la superficie externa de la epidermis mientras que las apocrinas lo liberan hacia el tallo del pelo. Además el sudor procedente de glándulas apocrinas es menos ácido que el sudor ecrino por lo que el pH de la superficie cutánea de los animales es algo superior al de la piel humana (Kral y Schwartzman, 1964).
3. Se han descrito diferencias en el contenido de los gránulos de los mastocitos de distintas especies, por tanto, existen diferencias en cuanto a su sensibilidad a diversos mediadores inflamatorios aplicados sobre la piel (Wasserman, 1983).

Indudablemente, esas diferencias contribuyen a la falta de correlación entre los resultados obtenidos en algunos modelos animales y los ensayos predictivos en humanos (Patrick y Maibach, 1989).

1.2. Principios éticos de la experimentación animal

La utilización de animales de experimentación ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de la Toxicología y de la Medicina. En el campo de la Toxicología, que fue en sus inicios y durante un largo periodo de tiempo el estudio de los venenos, encontramos las primeras referencias al uso de animales como modelo experimental. Mitrídates VI (132-63 a.C.), rey del Ponto, temeroso de ser víctima de envenenamiento ordenó llevar a cabo una serie de ensayos en animales para estudiar la acción tóxica de los venenos y su protección mediante antídotos. Por este motivo se le puede considerar el iniciador de la Toxicología experimental.

Sin embargo, fue a partir del siglo XVIII con la revolución científica cuando se fue aceptando gradualmente que el desarrollo de la medicina, y de las ciencias biológicas en general, dependía en gran medida de los resultados

de los experimentos con animales y que su utilización contribuía al bienestar del hombre y a mejorar sus condiciones de vida. En este contexto surgen figuras muy importantes, como Mateo Emanuel Orfila, (1787-1853) médico español que inició profundos estudios sobre los métodos de la identificación y dosificación de las principales sustancias tóxicas de la época. Guiado por los trabajos de Fisiología de François Magendie, Orfila utilizó animales para el estudio de la acción de los venenos, utilizando con ese fin más de 800 perros. Escribió la obra *Tratado de los venenos de los reinos Mineral, Vegetal y Animal o Toxicología General considerada sobre los fundamentos de la Fisiología, la Patología y la Medicina Legal*, por la que se le reconoce como el padre de la Toxicología forense y es el que introdujo esta disciplina en el contexto judicial (Vallverdú, 2005).

Sin embargo, el aumento de los experimentos basados en modelos animales provocó que en el siglo XIX surgiera un importante movimiento en contra de la experimentación animal, primero en Inglaterra y después en Francia donde los trabajos de los fisiólogos Magendie y Bernard fueron el blanco de las críticas de los antiviviseccionistas. De esta época data la primera organización antiviviseccionista, la Sociedad de la calle Victoria, que fue creada en Inglaterra en 1875.

Marshall Hall, un médico británico de la primera mitad del siglo XIX defendió activamente la utilización de animales en investigación. Sus aportaciones más importantes como investigador las realizó en el área de la fisiología de la circulación donde sus experimentos con animales le sirvieron para estudiar el funcionamiento del sistema circulatorio. Estas investigaciones permitieron un gran avance en ese campo de la medicina. Sin embargo, se vio en la necesidad de defender con vehemencia sus experimentos con animales, ya que eran objeto de duras críticas por parte de los grupos antiviviseccionistas. Por este motivo, en su obra *A Critical and Experimental Essay on the Circulation of the Blood* propone cinco principios dirigidos a la protección de los animales utilizados en la fisiología experimental. Sus observaciones estaban orientadas fundamentalmente a evitar la repetición innecesaria de procedimientos experimentales y a reducir su sufrimiento en la medida de lo posible. Esos principios se resumen de la siguiente manera:

1. No debemos recurrir a la experimentación en aquellas situaciones en las que la mera observación pueda proporcionarnos la información que buscamos.

2. No debe realizarse ningún experimento si no se posee un objetivo claro y definido.
3. Es totalmente innecesario repetir procedimientos experimentales que ya hayan sido llevados a cabo por otros científicos reputados.
4. Todos los experimentos deben llevarse a cabo intentando reducir al mínimo el sufrimiento inflingido al animal.
5. Todos los procedimientos experimentales deben llevarse a cabo en las condiciones necesarias para que sus resultados sean lo suficientemente seguros y se evite la necesidad de repetirlo.

La presión social ejercida por los grupos proteccionistas llevó a la Inglaterra victoriana a promulgar la primera ley para la protección de los animales de experimentación: *Cruelty to Animals Act*, 1876. No obstante, la posición de algunos extremistas que demandaban la total abolición de los experimentos con animales no obtuvo un gran apoyo de la sociedad. Por el contrario, desde finales del siglo XIX, la experimentación animal se incrementó de manera rápida. De hecho, el auge que se produjo en la utilización de animales de experimentación durante el siglo XX fue paralelo a la consolidación y desarrollo pleno de la Toxicología. La causa fundamental fue el desarrollo industrial experimentado durante el siglo XIX que provocó que pronto aparecieran los efectos nocivos de las sustancias y que surgiera, por tanto, la preocupación social por la idea de riesgo. Durante la segunda década del siglo XX, se producen los primeros intentos de crear modelos matemáticos de las relaciones entre dosis y respuesta y en la siguiente aparece el concepto de umbral (*threshold*). Es a partir de este momento cuando se trabaja para elaborar teorías tanto explicativas como predictivas (Bliss, 1939).

Por tanto, es indiscutible la importancia que los modelos animales han tenido hasta el momento presente en el avance de la investigación biológica, médica y veterinaria. Sin embargo, de igual modo que la utilización de animales con fines científicos ha ido aumentando progresivamente hasta el momento actual, los grupos antiviviseccionistas, cada vez más numerosos, también han continuado luchando para conseguir la abolición del uso de animales de experimentación. La presión social que ejercen y que han ejercido ha provocado que durante las últimas décadas se haya desarrollado la ciencia del animal de laboratorio. Esta ciencia se basa fundamentalmente en la teoría de Russell y Burch descrita en la obra *The principles of humane experimental technique* (1959) donde se describe cómo disminuir o eliminar los aspectos no humanitarios de la experimentación animal. Los autores introdujeron el

“Concepto de las 3 erres” (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) como principal línea directriz para el uso responsable de los animales de experimentación.

1.3. Métodos alternativos

Actualmente nos enfrentamos a una contradicción. Por una parte, la Administración y la opinión pública solicitan la máxima garantía de todos los productos de consumo, pero por otra parte exigen que no utilice la experimentación animal para evaluar la seguridad de dichos productos. La legislación vigente en Europa determina que el uso de animales de experimentación debe estar científica y éticamente justificado. El modo de hacerlo varía entre los distintos países, pero todos coinciden en el fondo de la cuestión, ya que todos ellos analizan la idoneidad de los procedimientos respecto a los objetivos del proyecto, promueven la utilización del menor número de animales posible y obligan a los investigadores a demostrar que han considerado adecuadamente todas las alternativas a los procedimientos que causan dolor o malestar en los animales.

Sobre la base de estas consideraciones surgió la necesidad de definir, crear y desarrollar los métodos alternativos al uso de animales de laboratorio que, como ya se ha comentado anteriormente, se basan en el principio de las 3 erres de Russell y Burch. Actualmente, se considera un método alternativo a la experimentación animal aquél que cumpla uno de los siguientes principios:

1. Incorpora un **refinamiento** de los procedimientos, de modo que disminuyen el dolor o malestar de los animales, o bien aumentan su bienestar.
2. Permite una **reducción** en el número de animales necesario.
3. Facilita el **reemplazo** del uso de animales por sistemas que no requieren seres vivos, o emplean otras especies animales que sean inferiores en la escala filogenética animal.

En Europa, el Consejo de Europa y la Comunidad Económica Europea se ocupan de la regulación de estas materias y el espíritu de las 3 erres ha quedado recogido en el documento oficial *Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos* (86/609/CEE). En la actualidad, la mayor parte de los países europeos sigue, en mayor o menor medida, las normas comunitarias sobre esta materia. En el caso concreto de España, se incorporó esa Directiva mediante el Real Decreto 223/1986 que ha sido

ampliado recientemente mediante el Real Decreto 1201/2005. La Legislación Catalana también quiso reflejar su compromiso con la protección animal y promulgó la *Llei 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques* que fue ampliada en el año 1997 mediante el Decreto 214/97. Uno de los aspectos más interesantes de ese Decreto es la incorporación en el Artículo 18 del Capítulo 6 de la formación mínima necesaria para todo el personal que trabaje con los animales. En la legislación española ese aspecto no ha sido incorporado hasta el Real Decreto 1201/2005.

Por otro lado, el desarrollo de métodos alternativos al uso de animales ha de basarse en conocimientos científicos sólidos y, por este motivo, existen organizaciones internacionales que se dedican a la validación y armonización de estos métodos. Entre estas organizaciones se encuentran el ECVAM (Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos del Centro Común de Investigación, Comisión Europea), el ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) y la OCDE.

El ECVAM fue creado por la UE en octubre de 1991 a través de una Comunicación de la Comisión del Consejo y del Parlamento Europeos, como respuesta a la Directiva 86/609/EEC que exige la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Tal y como se establece en dicha Directiva, para conseguir el objetivo fijado por la UE es necesario que tanto la Comisión como los Estados Miembros se impliquen activamente en el desarrollo, la validación y la aceptación de métodos que supongan la reducción, el refinamiento o el reemplazo de los animales de experimentación.

En el artículo 7.2 de esa Directiva se establece lo siguiente:

No deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio, razonable y factible para obtener el resultado perseguido, y que no implique la utilización de un animal.

En el artículo 23:

La Comisión y los Estados miembros deberán fomentar la investigación sobre el desarrollo y la confirmación de técnicas alternativas que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en experimentos con animales, que supongan el uso de menos animales o que impliquen procedimientos menos dolorosos, y darán los pasos oportunos, en la medida en que lo consideren

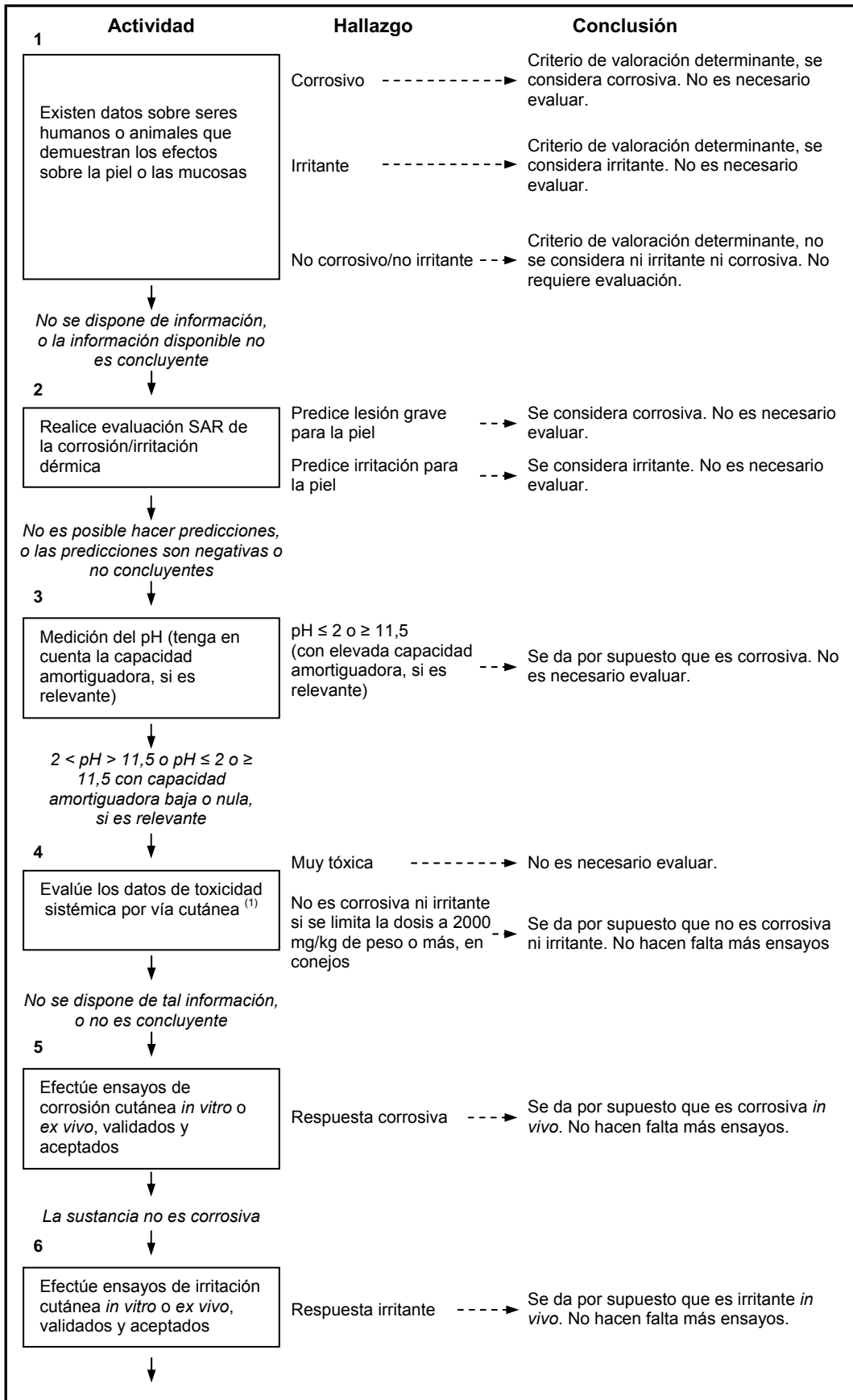
apropiado, para fomentar la investigación en este campo. La Comisión y los Estados miembros seguirán de cerca la evolución de los métodos experimentales.

En base al contenido de la Directiva, el ECVAM se propone los siguientes objetivos:

- Coordinar la validación de métodos alternativos en el ámbito de la Unión Europea.
- Actuar como lugar de intercambio de información sobre el desarrollo de métodos alternativos.
- Crear, mantener y gestionar una base de datos sobre procedimientos alternativos.
- Fomentar el diálogo entre legisladores, industrias, científicos, asociaciones de consumidores y organizaciones defensoras del bienestar animal, con el fin de desarrollar, validar y conseguir el reconocimiento internacional de los métodos alternativos.

En el caso de la irritación dérmica y ocular, se han propuesto varios tipos de métodos alternativos, entre ellos los métodos *in vitro*. De hecho, la OCDE propone la aplicación de una estrategia secuencial razonable para la evaluación de la corrosión/irritación dérmica y ocular que combina datos experimentales derivados de un amplio abanico de métodos alternativos (técnicas fisicoquímicas, estudios de relación estructura-actividad [SAR], ensayos *in vitro*, etcétera) y ensayos en animales. En la Figura 1.4 se muestra la estrategia propuesta para la irritación/corrosión dérmica. Según esta estrategia, los ensayos en animales deben ser llevados a cabo solo si son necesarios. De este modo se aporta la vía más efectiva para intentar predecir la toxicidad, y al mismo tiempo, se reduce el número de animales de laboratorio usados en los estudios (Botham y cols., 1998). Además, con esta filosofía de evaluación se consigue:

- Implantar la estrategia de las 3 erres, en términos de minimizar el uso y el sufrimiento de los animales de experimentación.
- Maximizar el uso de los conocimientos existentes.
- Optimizar el uso de los recursos.



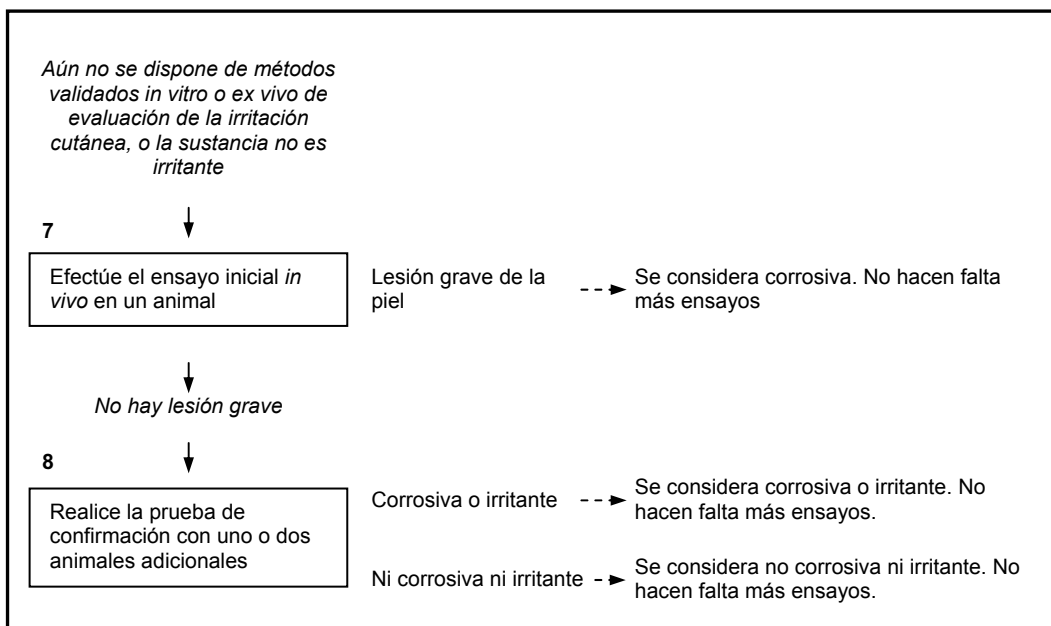


Figura 1.4. Estrategia secuencial propuesta por la OCDE y adoptada por la UE para la valoración de la corrosión o irritación dérmica de nuevos compuestos (extraída del Diario Oficial de la Unión Europea, L216/3, 16.6.2004). En el caso de la irritación ocular se ha propuesto una estrategia similar, además, siempre que un compuesto se considere corrosivo para la piel, se considera también corrosivo para los ojos y no se admite su evaluación *in vivo*.

1.4. Validación de métodos alternativos

El proceso de validación es el mecanismo a través del cual se establece la fiabilidad y la relevancia de un procedimiento diseñado para una finalidad específica (Balls y cols., 1995). El rigor con el que se establezcan los criterios de validación dependerá de la finalidad de ese nuevo método de ensayo. Existen tres finalidades para las cuales puede validarse un método:

- Para el cribado de nuevas moléculas que permita identificar durante las etapas iniciales de desarrollo de un producto aquellas sustancias potencialmente peligrosas o seleccionar las que serán ensayadas *in vivo* posteriormente.
- Como complemento a los ensayos en animales para obtener un perfil toxicológico de la sustancia más completo.
- Como ensayo de remplazo dirigido a sustituir un ensayo *in vivo* si se consigue su aceptación a nivel de las instituciones reguladoras.

En el último caso, es esencial que el método alternativo o una batería de métodos garanticen el mismo nivel de protección para el hombre y su ambiente como los ensayos *in vivo* a los que deben sustituir (Green, 1993). La validación debe ser un proceso muy disciplinado donde los estudios deben diseñarse de modo que puedan valorarse de forma clara y concluyente las hipótesis planteadas para decidir si la realización del método alternativo propuesto es adecuada para el objetivo planteado inicialmente (Tabla 1.3).

Por ese motivo es muy importante que los métodos alternativos se optimicen al máximo antes de incluirlos en un estudio de validación. Existen una serie de factores que deben tenerse en cuenta durante la fase de prevalidación, los más importantes son los siguientes:

- Deben existir indicios claros de que el método alternativo es relevante para el objetivo previsto.
- Los protocolos de trabajo deben estar claramente definidos y se debe disponer de protocolos normalizados de trabajo (PNT).
- Deben existir indicios de que los datos generados son reproducibles entre distintos laboratorios.
- Se debe disponer de un modelo de predicción que permita una interpretación correcta de los resultados.

Como ya se ha comentado anteriormente, el ECVAM es el organismo encargado de coordinar la validación de métodos alternativos a nivel de la UE. Desafortunadamente, todos los esfuerzos orientados al desarrollo y la posterior validación de métodos alternativos que puedan remplazar por completo los ensayos de Draize no han tenido éxito. Entre los años 1991 y 1999, el ECVAM, diversas asociaciones industriales y las universidades realizaron seis estudios para la evaluación de distintos métodos alternativos para valorar la irritación ocular: *European Commission/Home Office (EC/HO) study* (Balls y cols., 1995), *COLIPA study* (Brantom y cols., 1997), *BGA/BMBF study* (Spielmann y cols., 1993; Spielmann y cols., 1996), *CTFA study* (Gettings y cols., 1991; Gettings y cols., 1992; Gettings y cols., 1994; Gettings y cols., 1996), *IRAG study* (Bradlaw y cols., 1997) y *JMHW study* (Ohno y cols., 1999). Sin embargo, ninguno de dichos estudios proporcionó resultados concluyentes, ningún método se mostró capaz de remplazar por completo el ensayo de Draize ocular. La principal razón que explica la falta de éxito es la dificultad que entraña el comparar los resultados obtenidos *in vitro* con los resultados *in vivo*.

Además, existe una enorme variabilidad en los resultados obtenidos *in vivo* debido a la subjetividad del ensayo.

<p>I. Desarrollo del ensayo</p>
<p>II. Prevalidación/optimización del ensayo</p> <p>A. <i>Plan preliminar</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Definir los fundamentos y objetivos del ensayo • Desarrollar el protocolo • Desarrollar los valores control • Perfeccionar los datos/resultados del modelo de predicción <p>B. <i>Actividades</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Capacitar y formar los laboratorios • Medir la reproducibilidad dentro y entre laboratorios • Identificar las limitaciones del ensayo
<p>III. Determinar las posibilidades de la validación</p> <p>A. <i>Analizar el desarrollo del ensayo y los resultados de la prevalidación</i></p> <p>B. <i>Normalizar el protocolo</i></p>
<p>IV. Validación del ensayo</p> <p>A. <i>Constituir el comité de gestión</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Definir el objetivo del estudio • Diseñar el estudio • Seleccionar los laboratorios participantes • Establecer los procedimientos de gestión y supervisión <p>B. <i>Procedimientos a realizar antes de iniciar el ensayo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Realizar los procedimientos de recogida de registros • Seleccionar las sustancias químicas de referencia • Codificar y distribuir las sustancias químicas de referencia <p>C. <i>Ensayar las sustancias químicas codificadas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Medir las acciones realizadas entre los laboratorios • Recopilar y evaluar los resultados <p>D. <i>Interpretación del ensayo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Analizar y resumir los resultados del ensayo • Comparar los resultados con el modelo de predicción establecido • Aceptar o rechazar el modelo
<p>V. Solicitar la aprobación del ensayo a efectos legislativos</p> <p>A. <i>Preparar el informe</i></p> <p>B. <i>Presentar los resultados que avalan la solicitud</i></p> <p>C. <i>Preparar los resultados para su publicación</i></p>

Tabla 1.3. Proceso de validación de métodos alternativos

En el caso de irritación dérmica, el ECVAM está haciendo un seguimiento de algunos de los métodos alternativos propuestos a través de estudios de validación (Zuang y cols., 2002; van de Sandt y cols., 1999). Durante los años 1999 y 2001 algunos de los métodos *in vitro* más prometedores fueron sometidos a estudios de prevalidación pero ninguno de ellos dio resultados lo suficientemente satisfactorios como para incluirlos en estudios de validación. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la idoneidad de algunos de los métodos para valorar el posible efecto corrosivo de las sustancias sobre la piel. El ECVAM ha considerado científicamente válidos dos ensayos *in vitro* de corrosión cutánea: el ensayo de resistencia eléctrica transcutánea en piel de rata (*the rat skin transcutaneous electrical resistance*, TER) y un ensayo que emplea un modelo de piel humana (ECVAM, 1998; Fentem y cols., 1998; Barratt y cols., 1998). El estudio de validación del ECVAM demostró que ambos ensayos podían diferenciar de manera fiable los agentes corrosivos cutáneos conocidos de los que no lo son. Esos dos ensayos ya han quedado recogidos en la legislación europea gracias a la directiva 2000/33/CE de la Comisión por la que se adapta por 27ª vez al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (ECVAM, 1998).

1.5. Métodos alternativos para valorar la irritación ocular y dérmica

Actualmente se sigue trabajando en la búsqueda de métodos alternativos y en la mejora de aquellos métodos que se han mostrado eficaces para realizar cribados iniciales de los productos.

Los métodos alternativos para valorar la irritación ocular y dérmica que se han propuesto para sustituir a los ensayos de Draize se clasifican en modelos basados en órganos, sistemas de cultivo celular o tisular y métodos basados en propiedades fisicoquímicas de los productos. Todos los ensayos que se comentarán a continuación han sido incluidos en algún estudio de validación o prevalidación. En la Tabla 1.4 se muestra un listado de los diferentes métodos y algunas de sus características principales.

1.5.1. Modelos basados en órganos

1.5.1.1. Utilización de órganos aislados

Estos métodos se basan en la utilización de ojos o córneas procedentes de diversos animales (bovinos, porcinos, conejos o pollos), los cuales se exponen a los productos irritantes. Los ojos que se obtienen de mataderos o de animales utilizados en otros ensayos toxicológicos, se colocan rápidamente en unos recipientes especiales que garantizan su conservación durante un periodo de tiempo determinado que debe ser suficiente para realizar el ensayo. Entre estos métodos se encuentra el ensayo de permeabilidad y opacidad de la córnea bovina (BCOP) (Casterton y cols., 1996) que se realiza con córneas aisladas de bueyes o vacas procedentes de mataderos. También hay otros ensayos que utilizan el globo ocular completo de distintos animales: el ensayo del ojo aislado de conejo (IRE), (Worth y Balls, 2002) y el ensayo del ojo aislado de pollo (CEET) (Prinsen y Koëter, 1993; Prinsen, 1996; Worth y Balls, 2002). En los dos últimos ensayos, una vez expuesto el ojo a la sustancia ensayada se examina la córnea para detectar posibles cambios como edema, opacidad y retención de fluoresceína en el epitelio.

1.5.1.2. Métodos basados en la membrana corioalantoidea

La membrana corioalantoidea (CAM) del huevo de gallina es una estructura muy vascularizada utilizada por el embrión de pollo para el intercambio gaseoso a través de la cáscara del huevo. Sus características estructurales lo hacen similar a tejidos altamente vascularizados como la conjuntiva y es capaz de responder frente a productos a irritantes.

Existen tres métodos que utilizan este órgano para predecir la irritación ocular: el ensayo HET-CAM (*Hen's Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane*) (Luepke, 1985; Spielmann, 1992a; Steiling, 1994), el ensayo CAM-VA (*Chorio-Allantoic Membrane Vascular Assay*) (Leighton y cols., 1985; Bagley y cols., 1991) y el ensayo CAM-TBS (*Chorio-Allantoic membrana: Trypan Blue Staining Test*) (Hagino y cols., 1991; Itagaki y cols., 1995). En los dos primeros ensayos se valora de forma visual el tiempo de aparición de fenómenos como hemorragia, vasoconstricción, coagulación e hiperemia tras la exposición de la membrana a un determinado producto. En cambio, el ensayo CAM-TBS, que fue desarrollado para evitar la subjetividad de esos ensayos, permite una cuantificación objetiva de las lesiones dado que se valora la cantidad de colorante azul de tripán que queda adsorbido a la membrana lesionada. La tinción con azul de tripán se usa ampliamente para medir la viabilidad celular y

detecta la destrucción y desnaturalización de las membranas celulares (Hagino y cols., 1999).

1.5.2. Modelos basados en sistemas de cultivo celular y tisular

1.5.2.1. Modelos basados en tejidos humanos reconstituidos

Los modelos basados en tejidos humanos reconstituidos son sistemas tridimensionales que se obtienen mediante el crecimiento de queratinocitos en cultivo sobre diferentes sustratos. Estos sistemas generan una interficie aire-líquido que permite la aplicación tópica de sustancias puras o diluidas (Botham y cols., 1998; Fentem y cols., 2001; Faller y cols., 2002).

Para valorar la irritación dérmica se han desarrollado los siguientes modelos de piel humana reconstituida: el modelo EPISKIN™ (Portes y cols., 2002; Faller y cols., 2002, Roguet y cols., 1994), el modelo Epiderm™ (Cannon y cols., 1994; Earl y cols., 1999) y el modelo SkinEthic™ (Rosdy y Clauss, 1990; de Brugerolle de Fraissinette y cols., 1999). Estos sistemas tisulares artificiales se construyen a partir de queratinocitos humanos derivados de piel que se cultivan sobre estructuras especializadas como pueden ser matrices de colágeno o estructuras de policarbonato. Suelen crecer formando múltiples capas hasta formarse una epidermis más o menos diferenciada. Los criterios de valoración que suelen utilizarse en este tipo de modelos son ensayos de viabilidad celular, como el ensayo de reducción de la sal de formazán 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (ensayo MTT), el cálculo del valor TE₅₀ (tiempo de exposición necesario para que una determinada sustancia reduzca la viabilidad del tejido en un 50 %), liberación de citocinas y cambios morfológicos.

Asimismo, para valorar la irritación ocular también se han desarrollado distintos modelos que intentan imitar el epitelio corneal y formar una interficie aire-líquido similar a la mucosa corneal. Entre dichos modelos se encuentran los siguientes: modelo EpiOcular™ (Southee y cols., 1999), modelo de epitelio corneal reconstituido de SkinEthic (Nguyen y cols., 2003; Brinch y Elvig, 2001) y el modelo Gillette. Entre los criterios de valoración también se encuentran ensayos de viabilidad celular como el ensayo MTT aunque también puede utilizarse la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y de citocinas, estudios histológicos o la expresión génica. En el modelo Gillette, los criterios de valoración que se utilizan son la permeabilidad transepitelial (TEP) y la resistencia eléctrica transepitelial (TER) que valoran la integridad del epitelio corneal.

1.5.2.2. Explantes de piel y cultivo tisular

También, se ha propuesto la utilización de piel humana o de animales para desarrollar métodos para valorar la irritación dérmica. Entre esos métodos destaca el ensayo de valoración de la integridad de la piel de ratón (*SIFT, the mouse Skin Integrity Function Test*) (Heylings y cols., 2001; Heylings y cols., 2003) en el que se utilizan dos métodos para valorar la integridad del estrato córneo: la pérdida de agua transepidérmica (TEWL, *TransEpidermal Water Loss*) y la resistencia eléctrica (ER, *Electrical Resistance*). También cabe destacar el ensayo Prediskin (Fentem y cols., 2001) que utiliza piel humana procedente de pacientes que han sido sometidos a alguna intervención de cirugía plástica. Por último, cabe destacar el ensayo en oreja de cerdo no perfundida (Fentem y cols., 2001) basado en la determinación del incremento absoluto de TEWL de la superficie de la piel tras la exposición a la sustancia ensayada.

1.5.2.3. Ensayos de citotoxicidad

La utilización de ensayos de citotoxicidad para la valoración del potencial irritante ocular o dérmico se basa en la observación que algunas sustancias que lesionan la piel o las mucosas también pueden producir efectos citotóxicos sobre diferentes tejidos epiteliales y endoteliales. Se ha sugerido que un producto químico puede ejercer un efecto citotóxico interfiriendo en funciones celulares básicas y con estructuras comunes a todos los tejidos (citotoxicidad basal) o interfiriendo con funciones y estructuras específicas de un tejido (citotoxicidad específica de órgano). Para valorar la citotoxicidad pueden tenerse en cuenta diferentes criterios de valoración como: morfología, viabilidad, metabolismo, integridad de la membrana celular, proliferación, adhesión y captación o incorporación de precursores radiactivos. Entre los ensayos de citotoxicidad más utilizados encontramos el ensayo de captación del colorante rojo neutro (*NRU, Neutral Red Uptake Assay*) (Borenfreund y Puerner, 1984; Clothier, 1990; Spielmann, 1992b; Harbell, 1994); el ensayo de liberación del colorante rojo neutro (*NRR, Neutral Red Release Assay*) (Clothier, 1992; Zuang, 2001); y el ensayo de hemólisis (*RBC, Red Blood Cell Haemolysis Test*) (Muir y cols., 1983; Pape y Hoppe, 1990; Lewis, 1994; Pape y Pfannenbecker, 1992).

1.5.2.4. Ensayos basados en características funcionales de las células

Entre los ensayos basados en determinadas características funcionales de las células se encuentran los siguientes:

- Valoración de la integridad epitelial mediante fluoresceína (*FL, Fluorescein Leakage Test*) (Rhoads y cols., 1993; Cottin y Zanvit, 1997; Shaw y cols., 1990). Se basa en el hecho que el epitelio corneal tiene la capacidad de actuar como barrera impermeable a sustancias potencialmente peligrosas y que, por lo tanto, cuando se daña su estructura se produce irritación ocular. En este ensayo se obtiene *in vitro* una estructura similar al epitelio corneal cultivando células epiteliales hasta que se establecen entre ellas uniones estrechas y desmosomas. Se expone la capa de células a la sustancia a ensayar y, después de retirarla, se añade una solución de fluoresceína para cuantificar qué cantidad de colorante es capaz de atravesar ese epitelio.
- *The Silicon Microphysiometer (SM) or Cytosensor Microphysiometer Assay* (Bruner y cols., 1991; McConnell y cols., 1992; Catroux y cols., 1993; Harbell y cols., 1999). Se determinan los cambios en la actividad metabólica de cultivos celulares como una medida indirecta del potencial irritante.

1.5.3. Métodos basados en propiedades fisicoquímicas

Para valorar la irritación ocular se ha desarrollado el ensayo IRRITECTION® que es una actualización del EYTEX™ System (Kelly, 1989). Se basa en la utilización de un reactivo macromolecular que adopta una estructura similar a la córnea. Las sustancias irritantes cuando entran en contacto con el reactivo provocan la aparición de turbidez a causa de cambios conformacionales en la estructura macromolecular y en su nivel de hidratación.

También se han desarrollado modelos de predicción basados en la relación estructura-actividad (*QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationship*) para predecir el potencial irritante de las sustancias (Cronin y cols., 1994; Abraham y cols., 1998; Abraham y cols., 2003; Cronin y cols., 2003; Hulzebos y cols., 2003; Patlewicz y cols., 2003).

Tabla 1.4. Características generales de los métodos alternativos propuestos para valorar la irritación dérmica y ocular.

Método alternativo	Clase	Modelo	Criterios de valoración
Irritación ocular			
BCOP	Órgano aislado	Córnea aislada de ojo de buey o vaca	Opacidad y permeabilidad mediante absorbancia y fluoresceína
IRE	Órgano aislado	Ojo de conejo	Opacidad y grosor de la córnea
CEET	Órgano aislado	Ojo de pollo	Opacidad y grosor de la córnea, retención de fluoresceína por el epitelio dañado
HET-CAM	Organotípico	Membrana corioalantoidea del huevo de gallina	Aparición de hemorragia, vasoconstricción y coagulación
CAM-VA	Organotípico	Membrana corioalantoidea del huevo de gallina	Aparición de hemorragia e hiperemia
CAM-TBS	Organotípico	Membrana corioalantoidea del huevo de gallina	Adsorción del colorante azul de tripán en la membrana lesionada
EpiOcular™	Tejido reconstituido	Queratinocitos humanos	Viabilidad celular (MTT), liberación de IL-1 α , PGE ₂ y LDH, permeabilidad con fluoresceína
Epitelio corneal humano reconstituido <i>in vitro</i> SkinEthic (a)	Tejido reconstituido	Línea inmortalizada de queratinocitos humanos	Viabilidad celular (MTT), liberación de LDH y de citocinas (IL-1 α , IL-6, IL-8, ...)
Gillette HCE-T	Tejido reconstituido	Línea inmortalizada de células epiteliales de córnea humana	TEP, TER, ensayo MTT y estudios histomorfológicos
Captación del colorante rojo neutro (NRU)	Cultivo celular	Cultivo primario de queratinocitos o utilización de líneas celulares	Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (concentración que inhibe en un 50 % la captación del colorante)
Liberación del colorante rojo neutro (NRR)	Cultivo celular	Cultivo primario de queratinocitos o utilización de líneas celulares	Cálculo de la concentración que produce la liberación de un 50 % del colorante
Ensayo de hemólisis (RBC)	Modelo celular	Eritrocitos de mamífero aislados de sangre periférica	Lisis de las membranas y desnaturalización de la oxihemoglobina

Valoración de la integridad epitelial mediante fluoresceína (FL)	Cultivo celular	Células epiteliales	Permeabilidad del epitelio a una solución de fluoresceína
The Silicon Microphysiometer (SM)	Cultivo celular	Queratinocitos humanos normales o línea celular de fibroblastos de ratón L929	Actividad metabólica de la célula
IRRITECTON	Ensayo bioquímico	Reactivo macromolecular que imita la estructura de la córnea	Valoración de la turbidez del reactivo mediante técnicas espectrofotométricas
Ensayo de Draize ocular con volúmenes pequeños (LVET)	Modelo <i>in vivo</i>	Conejo albino	Valoración visual de las lesiones en córnea, conjuntiva e iris

Irritación dérmica

Valoración de la irritación de mucosas (Mucosal Irritation Model)	Modelo animal invertebrado	Molusco gasterópodo <i>Arion lusitanicus</i>	Cantidad de moco liberado y liberación de LDH
Inhibición del crecimiento del tubo polínico (PTG)	Modelo vegetal	Polen de la planta <i>Nicotiana sylvestris</i>	Valoración de la turbidez del medio mediante técnicas espectrofotométricas
EPISKIN	Tejido reconstituido	Una matriz de colágeno sobre la que se cultivan queratinocitos humanos.	Viabilidad celular (MTT) principalmente, pero también liberación de IL-1 α y LDH
EPIDERM	Tejido reconstituido	Queratinocitos humanos derivados de piel que se cultivan en unas estructuras especiales Millicell	Viabilidad celular (cálculo de la TE ₅₀)
SkinEthic (b)	Tejido reconstituido	Queratinocitos humanos normales cultivados sobre una estructura de policarbonato	Viabilidad celular, liberación de IL-1 α y cambios morfológicos
Ensayo de valoración de la integridad de la piel de ratón (SIFT)	Explante de piel	Piel procedente de ratón	TEWL y ER
Prediskin	Explante de piel	Piel humana	Viabilidad celular (MTT) e histología
Ensayo en oreja de cerdo no perfundida (Pig Ear Test)	Explante de piel	Piel procedente de cerdo	TEWL
QSAR	Modelos matemáticos	Tratamiento de los datos mediante programas informáticos en base a algoritmos de predicción	Relación estructura química-actividad

1.5.4. Otros métodos para valorar la irritación

También se han propuesto otros modelos para valorar la irritación ocular como el método que se basa en la utilización de un organismo invertebrado, *Arion lusitanicus*, un molusco gasterópodo (Adriaens y Remon, 2002). Existe otro ensayo que predice el potencial irritante mediante la valoración de la inhibición del crecimiento del tubo polínico (PTG). Este ensayo no se basa en la utilización de un modelo animal sino que utiliza el polen de la planta del tabaco (Kappler y Kristen, 1987; Kappler y Kristen, 1990).

Hasta el momento hemos comentado fundamentalmente métodos alternativos de remplazo para los ensayos de Draize. Sin embargo, también existe un método alternativo al ensayo de Draize pero que se basa en el refinamiento del protocolo estándar. Se trata del ensayo de Draize ocular con volúmenes pequeños (LVET, *Low Volume Eye Test*) (Griffith y cols., 1980; Bruner y cols., 1992) cuya diferencia fundamental respecto al ensayo tradicional está en que el volumen que se aplica que es de solo 0,01 ml. Al aplicarse solo una décima parte del volumen que suele aplicarse, se evita parte del sufrimiento del animal. Además, se considera que la aplicación de un volumen menor de sustancia reflejaría mejor la situación que se daría en humanos.

1.6. Los tensioactivos: compuestos con potencial irritante

Los tensioactivos constituyen una familia de compuestos químicos que se utilizan diariamente a escala mundial en grandes cantidades. Están presentes en la mayoría de los productos cosméticos, en preparaciones farmacológicas, en productos de limpieza e incluso en productos alimentarios. Sin embargo, debido a su relativa capacidad para solubilizar los lípidos de las membranas, muchos tensioactivos provocan irritación cuando entran en contacto con la piel o con las mucosas (Willis y cols., 1989; Scheuplein y Ross, 1970; Effendy y Maibach, 1996). Por tanto, los tensioactivos se han convertido en instrumentos valiosos para la investigación de los procesos implicados en la irritación. En general, las propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos son factores decisivos que determinan si la sustancia producirá irritación.

1.6.1. Características generales de los tensioactivos

Un compuesto tensioactivo es una sustancia química natural o sintética de estructura anfífila que se adsorbe en las interfases gas/líquido (aire-agua),

líquido/líquido (aceite-agua) o gas/sólido (superficie de sólidos) (Attwood y Florence, 1983). El término anfífilo hace referencia a la existencia en la misma molécula de dos regiones claramente diferenciadas. Una es la porción hidrófoba (o apolar) que presenta afinidad por disolventes orgánicos o apolares y corresponde frecuentemente a una cadena hidrocarbonada (de tipo alquilo o alquil benceno) de longitud variable. La segunda es la porción hidrófila (o polar), caracterizada por mostrar atracción hacia disolventes polares, principalmente agua. Esta región puede estar formada por átomos de oxígeno, azufre, fosfato o nitrógeno, incluidos en grupos funcionales como alcoholes, tioles, éteres, ésteres, ácidos, sulfatos, sulfonatos, fosfatos, aminas, amidas, etc.

La naturaleza dual (polar-apolar) de los tensioactivos y en particular el equilibrio entre las partes hidrófoba e hidrófila de la molécula, conocido como balance hidrófilo-lipófilo (HLB), es la característica responsable de los fenómenos de actividad superficial y de agregación supramolecular (micelas, cristales líquidos, liposomas, vesículas o geles) de los tensioactivos. Como consecuencia de esas características, poseen numerosísimas aplicaciones en el desarrollo de productos industriales (Rosen, 2004).

La adsorción de las moléculas de tensioactivo en las interfases o en las superficies que las contienen se debe a una débil interacción entre la parte hidrófoba del tensioactivo con las moléculas de agua y también a la fuerte interacción (fuerzas de dispersión y puentes de hidrógeno) entre las propias moléculas de agua. Todo esto provoca la expulsión de la parte no polar o hidrófoba del tensioactivo fuera del interior de la solución acuosa.

Por otro lado, la porción polar del tensioactivo interacciona fuertemente con el agua a través de interacciones dipolo-dipolo o ión-dipolo y queda por tanto solvatada. Como resultado, las moléculas de tensioactivo no quedan completamente separadas en otra fase sino que quedan preferentemente adsorbidas de manera ordenada en la interfase con la parte hidrófoba fuera del interior de la fase acuosa y la parte hidrófila queda solvatada. La adsorción progresiva de las moléculas de tensioactivo a la superficie de la solución provoca un cambio en las fuerzas de interacción de las moléculas de agua de la superficie. Como consecuencia, el tensioactivo es capaz de disminuir la energía de los enlaces entre las moléculas de agua, es decir, de reducir la fuerza de tensión superficial del agua. A medida que aumenta el número de moléculas de tensioactivo en la superficie, la tensión disminuye hasta alcanzar un valor crítico, llamado concentración micelar crítica (CMC), a partir del cual la tensión

superficial se mantiene constante y se empiezan a formar agregados moleculares de tensioactivo o micelas en la solución (Berthod, 1983; Rosen, 2004). A partir de la CMC cualquier cantidad de tensioactivo que se añada a la solución se incorpora en forma de agregado y no de monómero.

La formación de micelas es una característica importante de los tensioactivos ya que algunos procesos que se dan en las interfases, como la interacción de los tensioactivos con membranas biológicas, la hemólisis y la solubilización dependen de las micelas (o agregados) presentes en la solución.

Desde el punto de vista comercial, los tensioactivos se clasifican a menudo en función de su uso. Sin embargo, este tipo de clasificación no resulta muy adecuada ya que muchos tensioactivos presentan diversos usos y podría dar lugar a confusiones. La clasificación de tensioactivos más aceptada científicamente se basa en su capacidad de disociación en agua (ya que éste es el principal medio de aplicación de los tensioactivos) y, por lo tanto, se clasifican según la naturaleza de su grupo hidrófilo o polar (Effendy y Maibach, 1996; Salager, 2002; Porter, 1994). Sobre la base de este criterio se clasifican en los siguientes grupos:

- **Aniónicos.** Son tensioactivos que en solución acuosa se disocian en un anión anfífilo (responsable de la actividad superficial) y un contraión catiónico, que suele ser un metal alcalino (sodio, potasio...) o un amonio cuaternario. Este tipo de tensioactivos son los más utilizados como emulsionantes, solubilizantes, humectantes y detergentes.
- **Catiónicos.** Se disocian dando lugar a un catión anfífilo y un contraión aniónico, que suele ser un halogenuro. La gran mayoría de estos agregados son compuestos nitrogenados tales como sales de amonio y sales de amonio cuaternario. Se utilizan en aplicaciones particulares como antimicrobianos naturales o sintéticos de uso externo o como agentes de adsorción sobre sustratos biológicos inertes con carga negativa. Esta última propiedad hace que sean excelentes agentes antiestáticos, suavizantes para el cabello, así como inhibidores de la corrosión. También se pueden utilizar como desinfectantes de heridas en la piel y para la desinfección de material quirúrgico (cloruro de benzalconio).
- **Anfóteros.** Son tensioactivos que, en función del pH de su grupo polar, da lugar tanto a disociaciones aniónicas como catiónicas y pueden poseer las propiedades detergentes de los aniónicos y las desinfectantes de los catiónicos. Este es el caso de productos sintéticos como las

betaínas o las sulfobetaínas y sustancias naturales como los aminoácidos y los fosfolípidos. En general, se utilizan en sectores específicos como los cosméticos y también en champús para bebés, donde su elevada biocompatibilidad y baja toxicidad son primordiales.

- No iónicos. El pH de la solución no afecta a esta clase de tensioactivos y no se ionizan en soluciones acuosas ya que su grupo hidrófilo (alcohol, fenol, éter, éster o amida) no se puede disociar. Una gran proporción de estos tensioactivos son hidrófilos por la presencia de una cadena de polietilenglicol (alcoholes etoxilados). Se utilizan mucho en preparaciones farmacéuticas, en la industria cosmética (limpiadores, champús) y como emulsionantes y solubilizantes en los alimentos.

1.6.2. El desarrollo de nuevas moléculas

Se sabe con certeza que los compuestos con actividad superficial pueden tener un gran impacto medioambiental. Por tanto, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad de los tensioactivos se han convertido en propiedades casi tan importantes como las posibles prestaciones que puedan ofrecer a los consumidores. En consecuencia, actualmente existe la necesidad de desarrollar nuevas moléculas con propiedades tensioactivas y que, además, sean biodegradables y biocompatibles. Sin embargo, para evitar que su abanico de aplicaciones no se vea limitado, estos nuevos compuestos deben conservar las propiedades fisicoquímicas que presentan los tensioactivos utilizados actualmente.

Para alcanzar ese objetivo, se han propuesto dos estrategias distintas. Por un lado, el diseño de análogos estructurales de compuestos naturales como los lipoaminoácidos, los glicolípidos y los fosfolípidos y, por otro, el aumento de la eficiencia de los tensioactivos para obtener el mismo rendimiento con menor cantidad de producto y disminuir, así, el impacto medioambiental.

1.6.3. Los lipoaminoácidos

La utilización de lipoaminoácidos constituye una de las mejores opciones para obtener el mismo rendimiento de los tensioactivos convencionales en sus aplicaciones para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Morán y cols., 2004). Dado que poseen una estructura sencilla que se asemeja a moléculas naturales muestran una baja toxicidad y una elevada biodegradabilidad (Pérez y cols., 2002a, 2002b; Benavides y cols., 2004a, 2004b; Sánchez y cols., 2004, 2006; Martínez y cols., 2006). Además, estos

compuestos se obtienen a partir de materias primas renovables como los aceites vegetales y los aminoácidos. La obtención de moléculas con carácter anfífilo a partir de la combinación de aminoácidos polares con compuestos hidrocarbonados apolares de cadena larga ha dado lugar a numerosas moléculas con una elevada actividad superficial y que presentan una amplia diversidad estructural y unas propiedades fisicoquímicas y biológicas muy diversas (Infante y cols., 1984, 1988; Seguer y cols., 1994; Clapés y cols., 1999; Piera y cols., 2000; Morán y cols., 2001, 2002; Pérez y cols., 2002a, 2002b).

La región hidrófila formada por el aminoácido determina las diferencias fundamentales en cuanto a la adsorción, la agregación y la actividad biológica del tensioactivo. Se pueden obtener tensioactivos catiónicos, aniónicos, anfóteros o no iónicos en función de los grupos funcionales libres.

Los aminoácidos pueden combinarse con las cadenas alifáticas para formar tres tipos principales de estructuras (Figura 1.5):

- Estructuras lineales o de una única cadena formadas por un aminoácido unido a una cola hidrofóbica.
- Estructuras diméricas (*gemini*) formadas por dos grupos polares (dos aminoácidos) y dos grupos hidrófobos separados por una molécula espaciadora unida covalentemente.
- Estructuras del tipo glicerolípido formadas por un grupo polar (un aminoácido) y uno o dos grupos hidrófobos unidos por un esqueleto de glicerol.

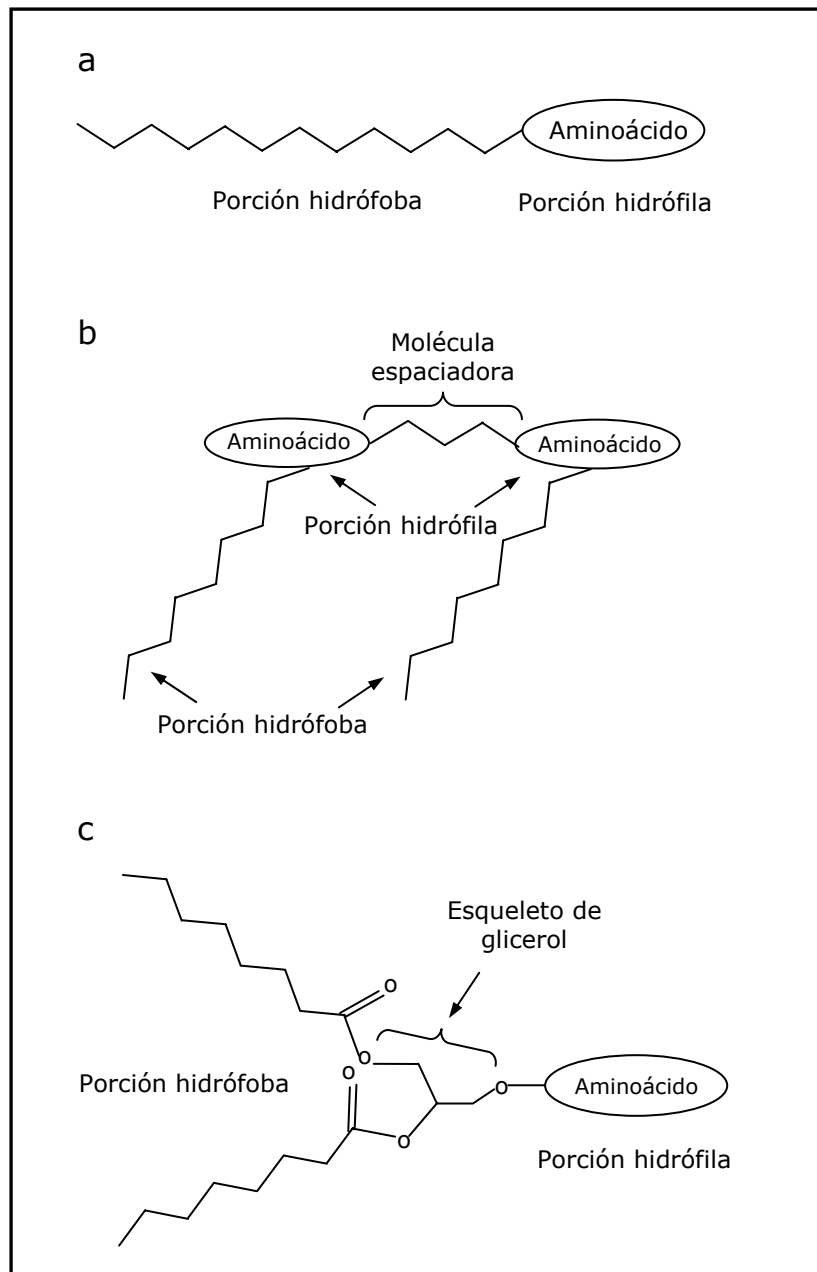


Figura 1.5. Estructura de los diferentes tensioactivos derivados de aminoácidos: estructuras lineales (a), estructuras diméricas (b) y estructuras glicerolípídicas (c).

2. OBJETIVOS

Este trabajo está enmarcado dentro de un proyecto de investigación centrado en la búsqueda y síntesis de nuevos tensioactivos derivados de aminoácidos. Los tensioactivos son unos compuestos químicos que debido a sus propiedades fisicoquímicas pueden provocar irritación dérmica y ocular. Por tanto, es interesante desarrollar nuevos compuestos que sean más biocompatibles que los tensioactivos comerciales que se utilizan actualmente. Por otro lado, los ensayos de Draize, que se basan en la utilización de animales, son los únicos métodos aceptados y exigidos oficialmente para valorar la irritación dérmica y ocular antes de la comercialización de nuevos compuestos. No obstante, por motivos sociales, éticos y científicos existe la necesidad de disponer de métodos que permitan remplazar los animales de experimentación en esos ensayos toxicológicos. Por consiguiente, los objetivos de este estudio han sido los siguientes:

- Estudiar el potencial efecto irritante ocular y dérmico de una serie de tensioactivos derivados de aminoácidos utilizando distintos métodos alternativos a la experimentación animal basados en modelos celulares y organotípicos.
- Estudiar la relación entre la estructura del tensioactivo y su efecto irritante para guiar la síntesis de compuestos menos dañinos para la piel y los ojos.
- Evaluar la aplicabilidad de los métodos alternativos utilizados en este estudio para aportar información que facilite su posible validación por parte de las instituciones reguladoras.
- Proponer modelos de predicción en sistemas *in vitro* que permitan establecer una clasificación de los tensioactivos en función de su efecto irritante sobre la piel.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tensioactivos estudiados

3.1.1. Estructuras lineales: N^α-acil-L-arginina metil éster

(Infante y cols., 1984)

Los derivados N^α-acil-L-arginina metil éster están formados por el aminoácido arginina, el cual se ha metilado previamente en su grupo α-carboxílico, unido por su grupo α-amino a cadenas alifáticas de distinta longitud. La acilación del grupo amino terminal de la arginina se llevó a cabo mediante la condensación de ácidos grasos con el éster metílico de arginina utilizando métodos químicos tradicionales. Este tipo de compuestos son tensioactivos catiónicos con una biodegradabilidad y una actividad superficial elevadas en comparación con otros tensioactivos catiónicos convencionales como las sales cuaternarias de amonio de cadena larga.

En este estudio se han incluido los siguientes compuestos:

- LAM: N^α-lauroil-L-arginina metil éster
- MAM: N^α-miristoil-L-arginina metil éster
- CCR: una mezcla formada por N^α-caprilicoil-L-arginina metil éster, N^α-capriloil-L-arginina metil éster, N^α-lauroil-L-arginina metil éster, N^α-miristoil-L-arginina metil éster, N^α-palmitoil-L-arginina metil éster y N^α-estearil-L-arginina metil éster. Este compuesto se sintetizó por primera vez para este estudio a partir de una mezcla de ácidos grasos obtenidos del coco compuesta por los ácidos caprílico (5,84 %), cáprico (4,62 %), láurico (53,04 %), mirístico (18,12 %), palmítico (8,68 %) y esteárico (9,47 %).

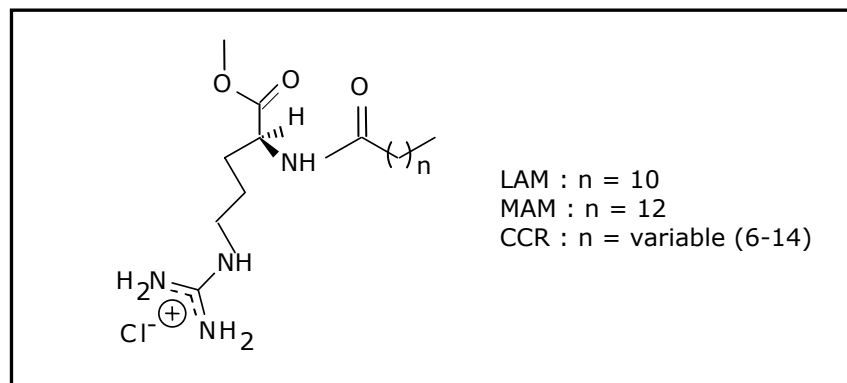


Figura 3.1. Estructura química de los tensioactivos N^α-acil-L-arginina metil éster.

Tabla 3.1. Algunas características fisicoquímicas de los tensioactivos derivados de aminoácidos

Tensioactivo	Estructura	Peso molecular	Aminoácido	Carga iónica	Núm. de cadenas hidrocarbonadas	Longitud de la cadena
LAE	Lineal	421	Arginina	Catiónico	1	12
LAM	Lineal	406	Arginina	Catiónico	1	12
MAM	Lineal	435	Arginina	Catiónico	1	14
CCR	Lineal	418	Arginina	Catiónico	1	Variable (8-16)
C ₃ (OA) ₂	Dimérica	712	Arginina	Catiónico	2	8
C ₃ (CA) ₂	Dimérica	768	Arginina	Catiónico	2	10
C ₃ (LA) ₂	Dimérica	824	Arginina	Catiónico	2	12
C ₃ (OH)(LA) ₂	Dimérica	837	Arginina	Catiónico	2	12
8,8R	Glicerolípida	501	Arginina	Catiónico	2	8
10,10R	Glicerolípida	557	Arginina	Catiónico	2	10
12,12R	Glicerolípida	614	Arginina	Catiónico	2	12
14,14R	Glicerolípida	691	Arginina	Catiónico	2	14
LAcR	Glicerolípida	509	Arginina	Catiónico	1	12
LAcN	Glicerolípida	431	Asparagina	No iónico	1	12
LAcQ	Glicerolípida	445	Glutamina	No iónico	1	12
LAcY	Glicerolípida	480	Tirosina	No iónico	1	12
LAcE	Glicerolípida	446	Ácido glutámico	Aniónico	1	12
LAcD	Glicerolípida	432	Ácido aspártico	Aniónico	1	12

También se ha incluido en este estudio el N^α-lauroil-L-arginina etil éster (LAE), un tensioactivo de esta familia que se utiliza como conservante alimentario. La empresa que lo comercializa ya ha realizado todos los estudios de toxicidad necesarios para su utilización en la industria alimentaria (Ruckman y cols., 2004).

3.1.2. Estructuras diméricas: N^α,N^ω-bis(N^α-acilarginina)α,ω-alquilendiamidas

(Piera y cols., 2000)

Durante los últimos 10 años, los tensioactivos diméricos han suscitado mayor interés que los tensioactivos monoméricos ya que presentan una serie de propiedades que los hacen más eficaces (Rosen, 1993; Diz y cols., 1994; Zana, 1997). Están formados por dos estructuras monoméricas de carácter anfífilo que se conectan a través de una cadena espaciadora situada cerca de los grupos polares. Por tanto, cada molécula posee dos grupos hidrófobos y dos grupos hidrófilos a diferencia de los tensioactivos monoméricos que solo poseen un grupo de cada. Estos tensioactivos tienen una característica importante cuando se les compara con tensioactivos monoméricos con un mismo balance HLB: presentan una CMC menor. Además poseen unas excelentes propiedades solubilizantes, humectantes, espumantes, antimicrobianas y dispersantes. También presentan un elevado potencial sinérgico, es decir, mejoran la eficiencia y la eficacia de otros compuestos con actividad superficial. Por todos esos motivos, se les ha considerado la próxima generación de tensioactivos.

Como ya se ha comentado, los lipoaminoácidos son una familia de tensioactivos que resultan respetuosos con el medio ambiente, por lo tanto, sintetizar tensioactivos diméricos a partir de lipoaminoácidos constituye una buena estrategia para aumentar el rendimiento y la efectividad de las estructuras monoméricas. En este trabajo se han estudiado las siguientes estructuras diméricas (Figura 1.6):

- C₃(OA)₂: bis(N^α-octanoil-L-arginina)-1,3-propanendiamida dihidrocloruro
- C₃(CA)₂: bis(N^α-caproil-L-arginina)-1,3-propanendiamida dihidrocloruro
- C₃(LA)₂: bis(N^α-lauroil-L-arginina)-1,3-propanendiamida dihidrocloruro
- C₃(OH)(LA)₂: bis(N^α-lauroil-L-arginina)-2-hidroxi-1,3-propanendiamida dihidrocloruro

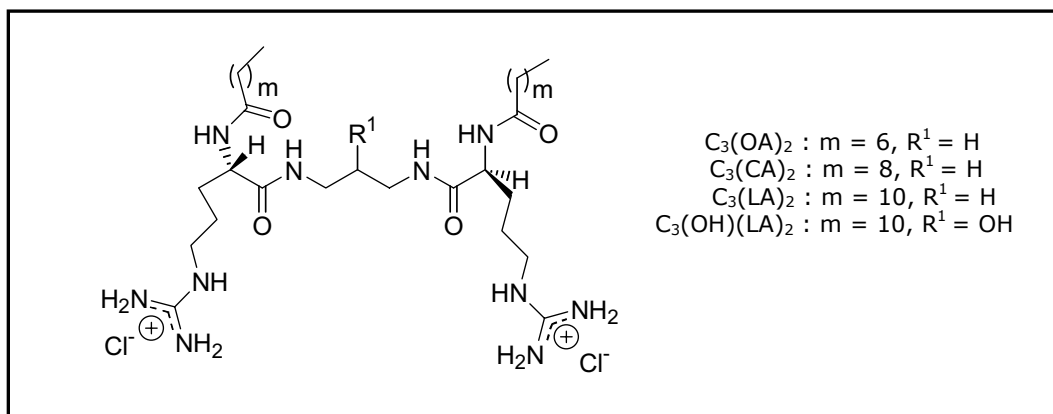


Figura 3.2. Estructura molecular de los tensioactivos N^α, N^ω -bis(N^α -acilarginina) α, ω -alquilendiamidas

3.1.3. Estructuras del tipo glicerolípido

Otra estrategia para obtener lipoaminoácidos es la síntesis de tensioactivos con estructuras glicerolípídicas. Este tipo de compuestos se consideran análogos estructurales de los monacilglicéridos, los diacilglicéridos y los fosfolípidos que se encuentran en la naturaleza. Están constituidos por una o dos cadenas alifáticas y por un aminoácido que actúa como región polar. Lo que diferencia a este grupo de tensioactivos de los otros grupos de lipoaminoácidos es que las cadenas alifáticas se unen al aminoácido a través de una molécula de glicerol. Las propiedades biológicas y fisicoquímicas de este tipo de compuestos no se han estudiado en detalle hasta el momento (Morán y cols., 2004).

3.1.3.1. 1,2-O-diacil-rac-glicero-3 (L-arginina)

(Pérez y cols., 2002b)

Estos compuestos pueden considerarse análogos estructurales de las lecitinas. Gracias a su estructura química, combinan las propiedades fisicoquímicas de las lecitinas y de los tensioactivos derivados de arginina. Están formados por dos cadenas hidrocarbonadas de la misma longitud que se unen al esqueleto de glicerol mediante enlaces éster. En este caso, la región polar es el aminoácido arginina y no un grupo fosfato como en las lecitinas. En este trabajo se han utilizado las siguientes moléculas:

- 8,8R: 1,2-O-dicaprilcooil-rac-glicero-3 (L-arginina)
- 10,10R: 1,2-O-dicaprilcooil-rac-glicero-3 (L-arginina)
- 12,12R: 1,2-O-dilaurooil-rac-glicero-3 (L-arginina)
- 14,14R: 1,2-O-dimiristoil-rac-glicero-3 (L-arginina)

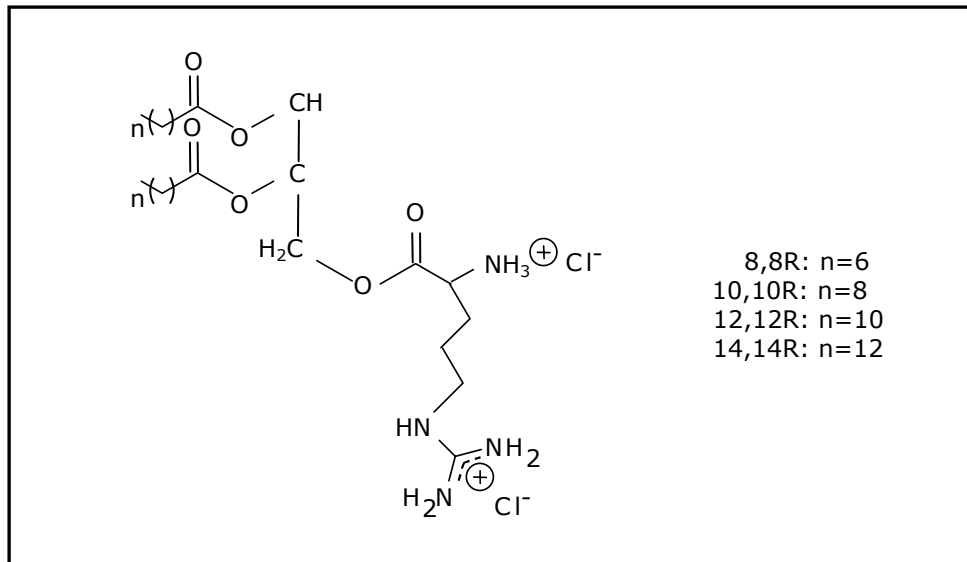


Figura 3.3. Estructura molecular de los tensioactivos 1,2-O-diacil-rac-glicero-3 (L-arginina)

Estas moléculas constituyen una nueva clase de tensioactivos multifuncionales con un comportamiento de autoagregación comparable a las lecitinas de cadena corta (Pérez y cols., 2001). Además, dado que tanto la región hidrófila como la hidrófoba se unen al esqueleto de glicerol a través de un enlace éster, es muy probable que se trate de tensioactivos altamente biodegradables (Andresen y Kirk, 1995).

3.1.3.2. 1-O-lauroil-rac-glicero-3 (N^α-acetil-L-aminoácido)

(Morán y cols., 2001; Morán y cols., 2002)

Este tipo de compuestos tienen una estructura similar a un fosfolípido. Están formados por una molécula de monolauroilglicerol unida mediante enlace éster con el grupo alfa-carboxílico de diferentes aminoácidos acetilados (Figura 1.8). Según el aminoácido que forma parte de la molécula, los tensioactivos se han denominado de la siguiente forma:

- LAcR: 1-O-lauroil-*rac*-glicero-3 (N^α-acetil-L-arginina)
- LAcN: 1-O-lauroil-*rac*-glicero-3 (N^α-acetil-L-asparagina)
- LAcQ: 1-O-lauroil-*rac*-glicero-3 (N^α-acetil-L-glutamina)
- LAcY: 1-O-lauroil-*rac*-glicero-3 (N^α-acetil-L-tirosina)
- LAcE: 1-O-lauroil-*rac*-glicero-3 (N^α-acetil-L-ácido glutámico)
- LAcD: 1-O-lauroil-*rac*-glicero-3 (N^α-acetil-L-ácido aspártico)

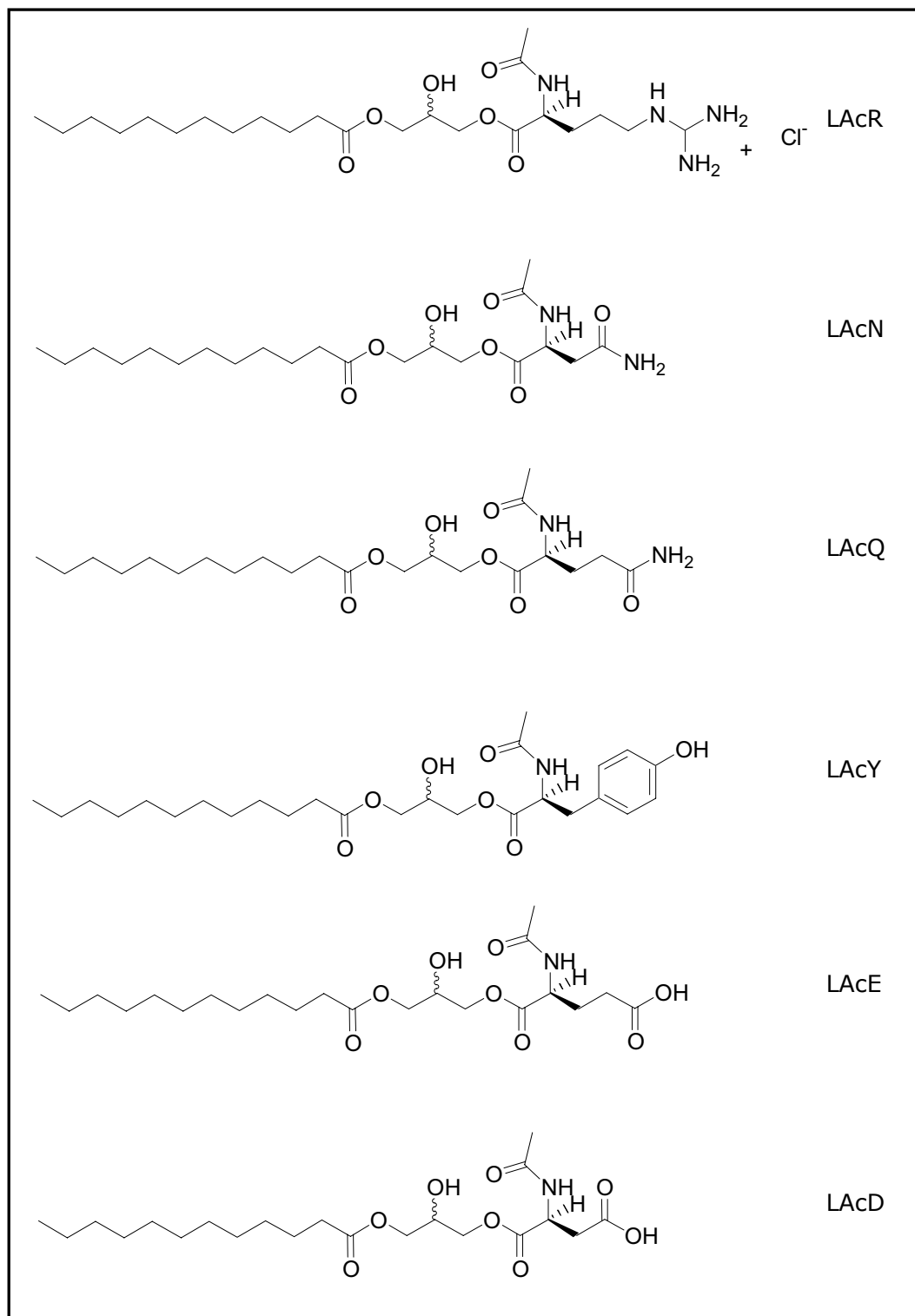


Figura 3.4. Estructura molecular de los tensioactivos del tipo 1-O-lauroil-rac-glicero-3 (N^α-acetil-L-aminoácido).

3.2. Ensayos de irritación en modelos celulares

3.2.1. Ensayo de hemólisis

El ensayo de hemólisis para predecir el efecto irritante a nivel ocular se ha realizado según el protocolo INVITTOX núm. 37 basado en los trabajos previos de Pape y cols. (1987; 1990; 1991).

Materiales

Las muestras de sangre humana se obtuvieron del Banco de Donantes del Hospital Clínico de Barcelona. El dodecil sulfato sódico (SDS) y el NaCl utilizado para preparar la solución salina fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

Protocolo experimental

- *Preparación de la suspensión de eritrocitos.* Se realizaron tres lavados de la sangre en solución salina fisiológica (0,9 % p/v) para eliminar el plasma y los leucocitos. Finalmente, los eritrocitos se resuspendieron a una densidad celular final de 8×10^9 células/ml.
- *Ensayo de hemólisis.* Para realizar el ensayo de hemólisis se añadieron diferentes volúmenes (de 10 a 80 μ l) de las soluciones de tensioactivo (de 1 a 10 mg/ml) en tubos de poliestireno con el objetivo de ensayar diferentes concentraciones (de 10 a 1000 μ g/ml). Por cuestiones de solubilidad, las soluciones de tensioactivo se prepararon en solución salina (0,9 % de NaCl). Después se añadieron alícuotas de 25 μ l de la suspensión de eritrocitos a cada tubo y se llevó hasta un volumen final de 1 ml en solución salina. Posteriormente, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Después del periodo de incubación, se centrifugaron los tubos (10 minutos a 1500 x g) y se determinó el porcentaje de hemólisis mediante la lectura de la absorbancia a 540 nm. Previamente, el espectrofotómetro se ajustó a cero con un control negativo que se preparó añadiendo 25 μ l de la suspensión de eritrocitos a un vial con solución salina o PBS hasta un volumen final de 1 ml. Las lecturas de absorbancia de las muestras se compararon con viales que representaban el 100 % de hemólisis ya que se añadieron 25 μ l de la suspensión de eritrocitos a un vial con agua destilada. A partir de los resultados de hemólisis, se obtuvo una curva concentración-respuesta

(Figura 3.5) y se calculó la concentración de tensioactivo que inducía el 50 % de hemólisis (CH₅₀).

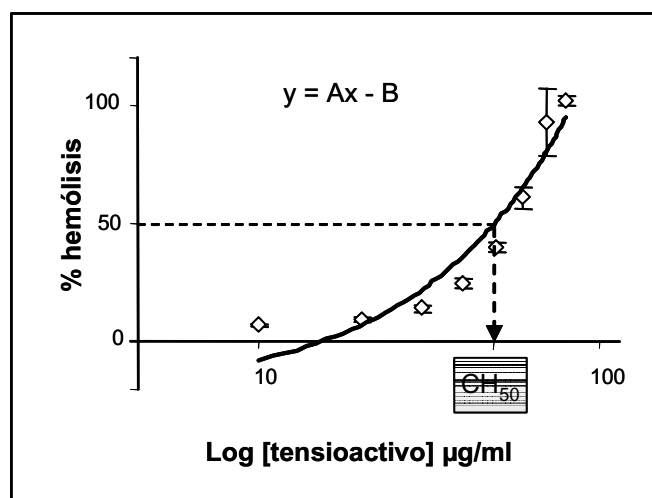


Figura 3.5. Cálculo de la concentración hemolítica 50 a partir de las gráficas concentración-respuesta.

- *Índice de desnaturalización de la hemoglobina.* Para la determinación del índice de desnaturalización de la hemoglobina (ID) se realizó un procedimiento similar al anterior. Se prepararon soluciones de tensioactivo y de SDS a 10 mg/ml en solución salina fisiológica y se pusieron en contacto con alícuotas de 25 µl de la suspensión de eritrocitos. Después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación constante, se centrifugaron los viales y se hicieron lecturas de absorbancia a 540 y 575 nm. Una vez obtenidos los valores de absorbancia, el índice de desnaturalización de cada tensioactivo se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$ID (\%) = \frac{(R_1 - R_i)}{(R_1 - R_2)} \times 100 ,$$

donde R_1 , que es un valor constante (1,05) representa la relación de absorbancia 575/540 de la oxihemoglobina, R_2 la relación 575/540 para la hemoglobina tras el tratamiento con el tensioactivo estudiado y R_i la relación de las absorbancias de la hemoglobina 575/540 tras el tratamiento con SDS.

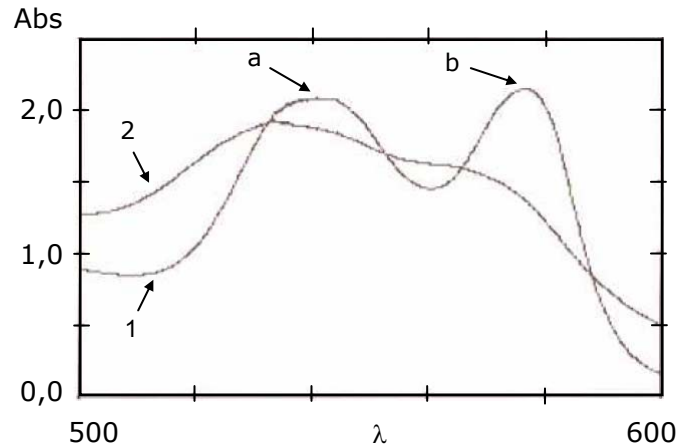


Figura 3.6. Espectro característico de la hemoglobina (1) con sus picos máximos de absorción a 540 nm (a) y 575 (b). Después del tratamiento con SDS (2), la hemoglobina se desnatura y se producen cambios en el espectro. Los cambios en la relación de las absorbancias 575/540 son indicativos del nivel de desnaturación de la proteína.

- *Índice de irritación ocular.* El índice de irritación se calcula a partir de la relación lisis/desnaturación (L/D) que se obtiene dividiendo el valor CH_{50} ($\mu\text{g/ml}$) entre el índice de desnaturación. Según esta relación L/D los tensioactivos se clasifican desde no irritantes a muy irritantes (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Clasificación de los tensioactivos según el índice L/D.

L/D	Clasificación
>100	No irritante
>10	Ligeramente irritante
>1	Moderadamente irritante
>0,1	Irritante
<0,1	Muy irritante

3.2.2. Ensayos de irritación en líneas celulares

Se utilizaron cuatro líneas celulares: dos líneas de fibroblastos procedentes de embriones de ratón (3T6 y 3T3) y dos líneas de queratinocitos humanos (NCTC 2544 y HaCaT). Las características principales de esas líneas celulares y las condiciones de cultivo se muestran en la Tabla 3.3. Los cultivos se mantuvieron en una estufa a 37 °C en atmósfera de aire modificada con un 5 % de CO₂. La manipulación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad trabajando en una cabina de flujo laminar vertical previamente pulverizada con etanol al 70 % y tratada con luz ultravioleta durante 20 min.

Material es

Los medios de cultivo RPMI 1640 sin glutamina, RPMI sin glutamina ni rojo de fenol y *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), la L-glutamina, la solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS), la solución de tripsina / EDTA, la solución amortiguadora hepes y el suero fetal bovino (FBS) fueron suministrados por la casa comercial Cambrex (Verviers, Bélgica). Los fluorocromos naranja de acridina y bromuro de etidio fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). El dimetilsulfóxido (DMSO) fue suministrado por Fluka. Los frascos de cultivo de 75 cm², las placas de 12, 24 y 96 pocillos fueron suministrados por TPP (Trasadingen, Suiza). El resto de material estéril para cultivo celular fue suministrado por Rubilabor (Rubí, Barcelona) y las cámaras de recuento celular Fast-Read[®] por Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

Descongelación

Las alícuotas de las distintas líneas celulares estaban congeladas en suspensión en medio RPMI 1640 (3T6 y NCTC) o DMEM (3T3 y HaCaT) con un 10 % de FBS y un 10 % de DMSO. Se descongelaron y seguidamente se centrifugaron a 1200 g y se retiró el sobrenadante para eliminar, así, los restos de DMSO. La fracción celular se resuspendió en 20 ml del medio de cultivo apropiado y se incubaron en frascos de 75 cm². Cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80 % se procedió a su tripsinización para realizar la resiembra del cultivo en otro frasco de mantenimiento o en placas para la realización de los ensayos pertinentes.

Tripsinización

- Fundamento. Las células cuando se mantienen en las condiciones apropiadas se adhieren a la superficie de un soporte formando, así, una matriz de unión. La tripsinización, o tratamiento con tripsina, permite la

disgregación enzimática de estas uniones y de las uniones intercelulares, dando lugar a una suspensión de células. La presencia de EDTA en la solución de tripsina optimiza el proceso de disgregación dado que actúa como un quelante de metales que podría inhibir la actividad de la enzima. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y para evitar una pérdida de viabilidad celular, la tripsina se inactiva mediante la adición de medio de cultivo con suero.

- *Protocolo experimental.* El cultivo se lavó con PBS y se incubó a 37 °C durante 5 min aproximadamente con una solución estéril de 0,5 mg/l de tripsina y 0,2 g/l de EDTA. Se utilizó un volumen de 40-50 µl de tripsina por cm² de superficie a tratar. Después de la incubación, se comprobó que las células se hubieran desprendido de la superficie de crecimiento y, a continuación, se inactivó la tripsina por adición de medio de cultivo (3 veces el volumen de tripsina utilizado). A continuación se realizó un recuento para determinar el número de células y la viabilidad celular de la suspensión de células obtenida.

Recuento de células viables

- *Fundamento.* Los agentes intercalantes, como los fluorocromos naranja de acridina y bromuro de etidio, son moléculas planas e hidrófobas que se intercalan entre los pares de bases del DNA y provocan distorsiones en su estructura de doble hélice. El fluorocromo naranja de acridina entra en las células vivas y tiñe de color verde el DNA bicatenario y de color naranja claro el DNA monocatenario y el RNA. En cambio, el bromuro de etidio únicamente puede atravesar la membrana plasmática de las células muertas y tiñe de color naranja rojizo su material genético (Parks y cols., 1979).
- *Preparación del colorante.* Se preparó una solución de naranja de acridina de 10 µg/ml y una solución de bromuro de etidio de 200 µg/ml disueltos en PBS. A continuación, se mezclaron los dos colorantes a volúmenes iguales (1:1) y la solución resultante se volvió a diluir 10 veces (solución de trabajo) y se guardó en un recipiente de vidrio topacio a 4 °C. Todas las soluciones se prepararon con PBS estéril.

Tabla 3.3. Características principales de las líneas celulares y sus correspondientes condiciones de cultivo.

	3T6 (CCL-96)	3T3 (0058-MoECL)	NCTC 2544 (ICLC HL97002)	HaCaT (0001-HSCL)
Descripción	Fibroblastos Crecen en monocapa pero no presentan inhibición por contacto	Fibroblastos Crecen formando una monocapa. Presentan inhibición por contacto.	Queratinocitos Crecen formando una monocapa. Presentan inhibición por contacto	Queratinocitos Crecen formando una monocapa. Presentan inhibición por contacto
Origen	Embriones de ratón (<i>Mus musculus</i>)	Embriones de ratón (<i>Mus musculus</i>)	Piel humana	Melanoma de piel de humano adulto
Ciclo celular	18 h	18 h	21 h	22-23 h
Condiciones de cultivo				
Medio de mantenimiento	RPMI 1640 sin glutamina	DMEM sin glutamina 4,5 g/l de glucosa	RPMI 1640 sin glutamina	DMEM sin glutamina 4,5 g/l de glucosa
Suplementado con	10 % de FBS Glutamina (2 mM) Estreptomicina (100 µg/ml) Penicilina (100 U/ml)	10 % de FBS Glutamina (2 mM) Estreptomicina (100 µg/ml) Penicilina (100 U/ml) Hepes (10 mM)	10 % de FBS Glutamina (2 mM) Estreptomicina (100 µg/ml) Penicilina (100 U/ml)	10 % de FBS Glutamina (2 mM) Estreptomicina (100 µg/ml) Penicilina (100 U/ml) Hepes (10 mM)
Condiciones	37 °C 5 % CO ₂	37 °C 5 % CO ₂	37 °C 5 % CO ₂	37 °C 5 % CO ₂
Referencias	Todaro y Green, 1963; Todaro y cols., 1964.	Todaro y Green, 1963; Todaro y cols., 1964.	Neufahrt y cols., 1976; Neufahrt y cols., 1978.	Boukamp y cols., 1988.

- *Protocolo experimental.* Se mezclaron 100 μl de la suspensión celular con 500 μl de medio (RPMI o DMEM, según la línea celular) con el objetivo de diluir la muestra. De esta suspensión, se tomaron 50 μl , se mezclaron con 50 μl de la solución de trabajo del colorante y se rellenaron las celdas necesarias de una cámara Fast-Read® para realizar el recuento de células por microscopía de fluorescencia. Finalmente, se calculó el número de células viables por μl de la suspensión celular inicial considerando que el volumen interior de cada celda era de 1 μl .

Resiembra de los cultivos celulares

- *Protocolo experimental.* A partir del número de células viables por μl de suspensión celular inicial y de la densidad de siembra deseada en cada caso, se mezcló un volumen determinado de suspensión celular con el medio de cultivo hasta completar el volumen apropiado dependiendo del recipiente de cultivo que se iba a utilizar.
- *Frascos.* Son recipientes de cultivo de poliestireno con una superficie de crecimiento de 75 cm^2 tratada para facilitar la adhesión de las células.

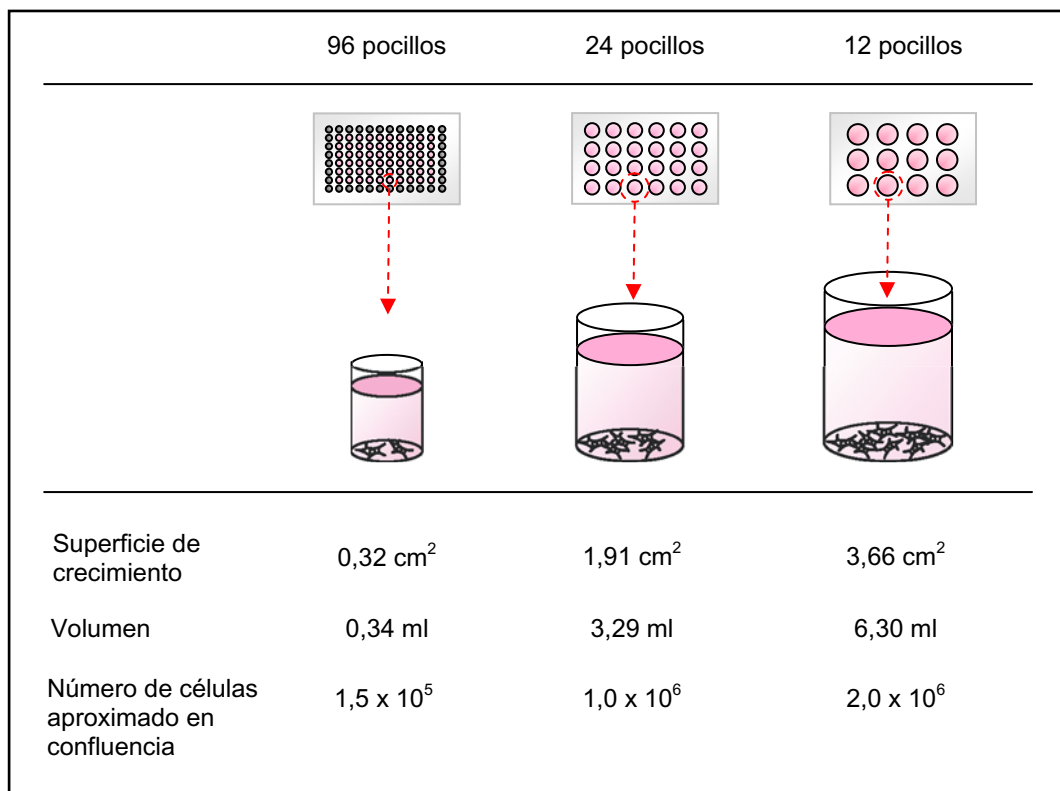


Figura 3.7. Características de las placas de poliestireno utilizadas para el cultivo celular. En función del ensayo que se quiera realizar es necesario un número mínimo de células que nos obliga a utilizar un tipo específico de placa.

- *Placas.* De igual modo que los frascos, las placas son recipientes de cultivo con una superficie de crecimiento de poliestireno tratada. En este estudio se han utilizado placas de 96, 24 y 12 pocillos (Figura 3.7).

3.2.2.1. Ensayos de citotoxicidad

Materiales

El medio RPMI 1640 sin glutamina ni rojo de fenol fue suministrado por Cambrex (Verviers, Bélgica). El colorante rojo neutro y el MTT fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). El DMSO, el etanol absoluto y el ácido acético glacial fueron suministrados por Fluka.

Protocolo experimental

- *Siembra en placa.* Cuando los cultivos celulares alcanzaron en el frasco un nivel de confluencia aproximado del 80 % se trataron con una solución de tripsina/EDTA con el fin de eliminar la matriz extracelular que las une a la superficie del frasco y obtener, así, una suspensión celular. A continuación, se sembraron en los 60 pocillos centrales de placas de 96 pocillos de poliestireno a una densidad de 5×10^4 células/ml. Las placas se mantuvieron en estufa a 37 °C y 5 % CO₂.
- *Exposición de las placas a los productos.* Una vez alcanzada la confluencia, fueron expuestas a concentraciones crecientes de tensioactivo (de 1 a 500 µg/ml) disuelto en medio RPMI o DMEM (según la línea celular) con un 5 % de FBS, 2 mM de L-glutamina y un 1 % de la solución de antibiótico. En cada una de las placas se incluyeron controles, pocillos a los que se les añadió medio únicamente (sin tensioactivo). Después de añadir el tratamiento, las placas se incubaron en estufa a 37 °C y 5 % de CO₂ durante un periodo de 24 h.
- *Captación del colorante rojo neutro (NRU, neutral red uptake).*
 - *Fundamento.* El colorante rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) es un colorante catiónico débil que atraviesa la membrana celular pasivamente por un proceso de difusión no iónica y se une a la matriz intracelular de los lisosomas. Las células muertas o dañadas no pueden retener el colorante después de los procesos de lavado y fijación.

- Preparación del colorante. Se preparó 24 h antes de realizar el ensayo disolviendo el colorante hasta una concentración de 5 µg/ml en medio de cultivo RPMI sin FBS y sin rojo de fenol.
- Protocolo experimental. El ensayo NRU se llevó a cabo según el método descrito por Borenfreund y Puerner (1986) pero con una modificación introducida por Riddell y cols. (1986) que evita el uso de formaldehído durante el procedimiento. Después del tratamiento de las células con los distintos tensioactivos, el medio se aspiró de cada uno de los pocillos y se añadieron 100 µl por pocillo de la solución del colorante rojo neutro. Después de incubar las células durante 3 h con dicho colorante en la estufa a 37 °C y 5 % de CO₂, se eliminó el colorante por aspiración, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se añadieron 100 µl de una solución al 50 % de etanol absoluto y el 1 % de ácido acético glacial en agua destilada, con el objetivo de extraer el colorante del interior de las células. Después de 10 minutos de agitación suave, se realizó la lectura de absorbancia de las placas a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad 550).
- *Ensayo de reducción de la sal de formazán MTT.*
 - Fundamento. Es un ensayo colorimétrico basado en la incubación de las células con 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), una sal soluble de color amarillo. Las células captan el MTT por endocitosis y lo reducen a un formazán insoluble de color azul. Aunque siempre se ha considerado que la reducción del MTT a formazán tiene lugar en las mitocondrias, también se ha descrito su reducción en otros compartimentos celulares (Liu y cols., 1997).
 - Preparación del colorante. Se preparó una dilución 1:10 de una solución de MTT (5 µg/ml en PBS) en medio de cultivo RPMI sin FBS ni rojo de fenol 24 h antes de realizar el ensayo y se guardó en la estufa a 37 °C.
 - Protocolo experimental. El ensayo de reducción del MTT se realizó siguiendo el método descrito por Mosmann (1983). Tras el tratamiento de las células con los distintos tensioactivos, se aspiró el medio de cada uno de los pocillos y se añadieron 100 µl por pocillo de la solución de MTT. Después de incubar las células con dicho colorante durante 3 h a 37 °C y 5 % de CO₂, se eliminó el colorante

por aspiración, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se añadieron 100 μ l de DMSO para extraer el colorante del interior de las células. Después de 10 min de agitación suave, se realizó la lectura de absorbancia de las placas a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad 550).

- *Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀)*. Con los resultados de absorbancia para cada concentración se obtuvieron las gráficas concentración-respuesta. En el caso del ensayo de captación del colorante rojo neutro, la viabilidad se expresó como el porcentaje de captación de colorante por los lisosomas respecto a las células control que no habían sido tratadas. En el ensayo MTT, la viabilidad también se expresó como el % de reducción del colorante respecto a las células control. Las curvas obtenidas se ajustaron a una función exponencial y se calcularon los índices de citotoxicidad o concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), que es la concentración de tensioactivo que provocó la muerte del 50 % de células (Figura 3.8).

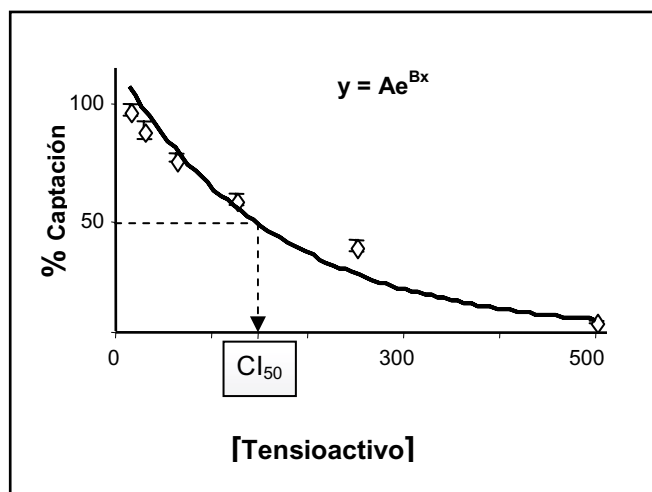


Figura 3.8. Cálculo de la concentración inhibitoria 50 de los tensioactivos a partir de las gráficas concentración-respuesta.

3.2.2.2. Liberación y producción de la citocina proinflamatoria IL-1 α en la línea celular de queratinocitos humanos NCTC 2544

Materiales

La IL-1 α humana recombinante, el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α humana, el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α humana marcado con biotina y el complejo estreptavidina-peroxidasa (HRP) son de Pierce Endogen. El sustrato enzimático de la peroxidasa, la TMB (3,3',5',5'-Tetrametilbenzidina) y el

detergente Triton X-100 son de Sigma. Para la técnica ELISA se utilizaron placas de 96 pocillos de Costar 3690 (Costar, Cambridge, MA).

Protocolo experimental

- *Siembra en placa.* Cuando los queratinocitos alcanzaron un nivel de confluencia aproximado del 80 % se trataron con una solución de tripsina/EDTA para obtener una suspensión celular. A continuación, se utilizó esa suspensión celular para sembrar placas de 24 pocillos de poliestireno a una densidad de 5×10^4 células/ml. Las placas se mantuvieron en estufa a 37 °C y 5 % CO₂ el tiempo necesario para alcanzar la confluencia.
- *Exposición a los productos.* Una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron 300 µl por pocillo de distintas concentraciones de los tensioactivos (de 5 a 120 µg/ml) disueltos en medio RPMI con un 1 % de FBS, 2 mM de L-glutamina y un 1 % de la solución de antibiótico. En cada una de las placas se incluyeron controles, pocillos a los que se les añadió medio únicamente (sin tensioactivo). Después de añadir el tratamiento, se incubaron las placas en estufa a 37 °C y 5 % de CO₂ durante un periodo de 24 h. Después del periodo de incubación, se recogió el medio de cada uno de los pocillos en tubos Eppendorf y se centrifugaron con el objetivo de realizar, posteriormente, la determinación de IL-1α extracelular (IL-1α EX) y la valoración de la actividad LDH. Por otro lado, se lavaron las monocapas de células de los pocillos con PBS, se las trató con 300 µl/pocillo al 0,5 % de Tritón X-100 en PBS para lisar las células y se recogió esa solución para determinar la concentración de IL-1α intracelular (IL-1α IN). Las determinaciones de IL-1α intracelular y extracelular se realizaron mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

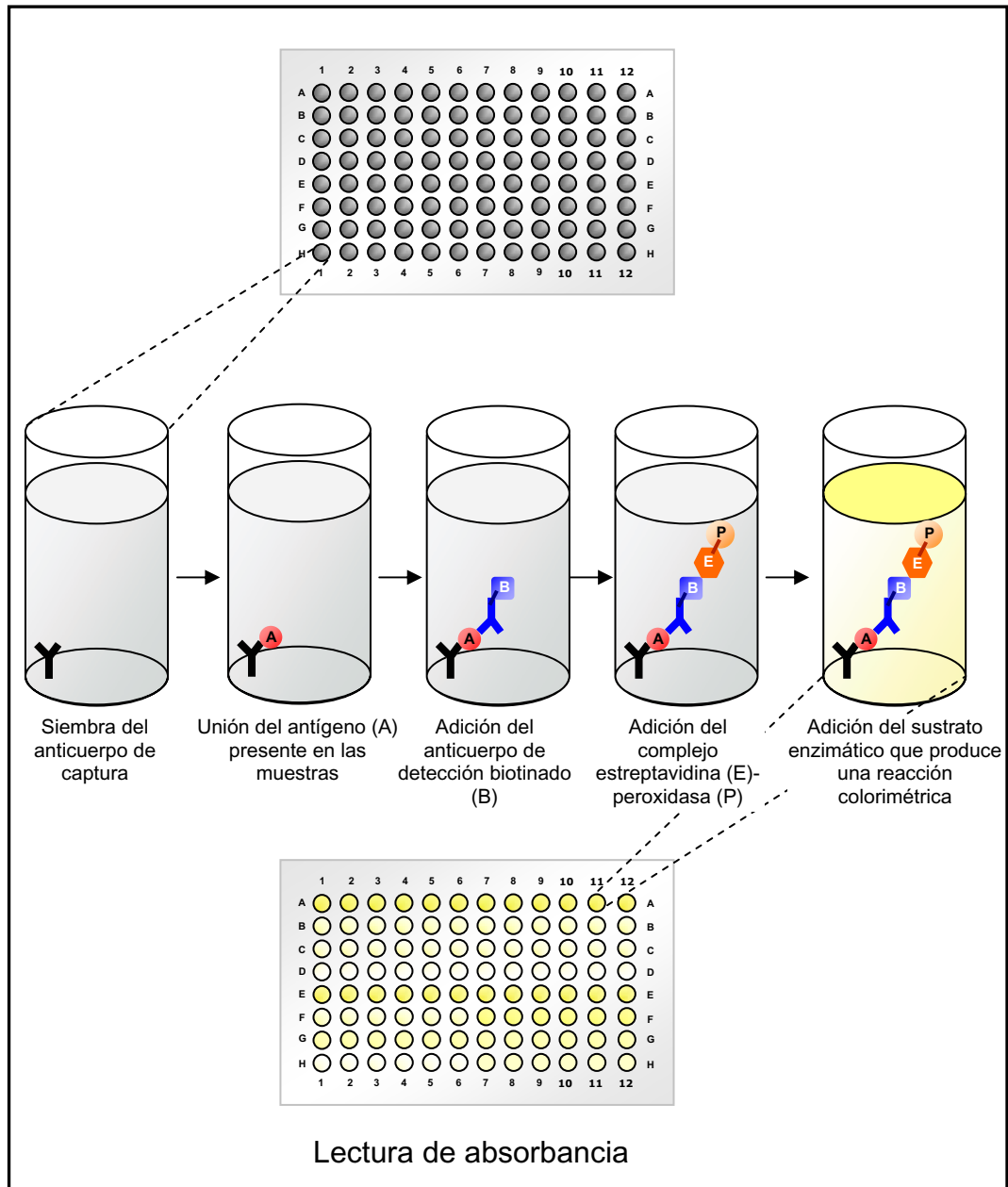


Figura 3.9. Esquema de la técnica ELISA sándwich. El antígeno presente en las muestras queda retenido entre un anticuerpo que está adsorbido a la fase sólida y un anticuerpo marcado con una enzima. Los valores de absorbancia obtenidos tras la reacción del enzima con su sustrato son directamente proporcionales a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

- *ELISA sándwich para la detección de IL-1 α*
 - *Fundamento.* La primera técnica de ELISA fue descrita de forma independiente por Engvall y Perlmann y Van Weemen y Schuurs en el año 1971. Desde entonces se han desarrollado diferentes técnicas de ELISA para detectar un gran número de antígenos y anticuerpos. El ELISA sándwich fue descrito por primera vez en 1977 por Clark y Adams y se trata de un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Es un ensayo muy utilizado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado con una enzima. Así pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Figura 3.9).
 - *Protocolo experimental.* Se utilizaron placas Costar 3690 de 96 pocillos y la técnica escogida fue el ELISA *sándwich*. Para la adsorción del anticuerpo de captura se añadieron 0,1 ml del anticuerpo anti-IL-1 α humana disuelto hasta 1,5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavaron las placas tres veces con PBS y se realizó el bloqueo de los sitios activos no saturados de la placa con 0,2 ml de una solución al 4 % de albúmina bovina en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces, se añadió a cada pocillo 0,05 ml de las muestras o de una solución de IL-1 α humana recombinante junto con 0,05 ml de anticuerpo biotinado anti-IL-1 α humana (anticuerpo de detección) a una concentración de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ en PBS y se incubó la placa durante 2 h a temperatura ambiente. Después de ese periodo se realizaron tres lavados con PBS, se añadieron a cada pocillo 0,1 ml del complejo estreptavidina-HRP diluido 1:16 000 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se utilizó TMB como sustrato de la

reacción y se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 15 pg/ml (Figura 3.10).

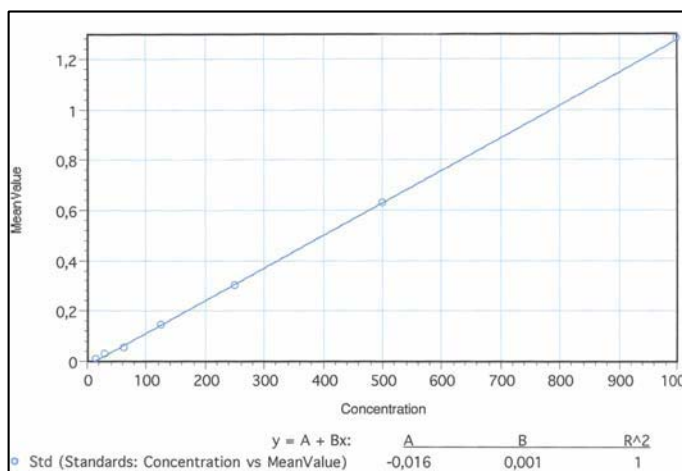


Figura 3.10. Para calcular las concentraciones de IL-1 α de las muestras se realiza una recta patrón a partir de los valores de absorbancia de distintas concentraciones conocidas de la citocina. En la figura se muestra un ejemplo de recta patrón.

3.2.2.3. Acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en la línea de queratinocitos humanos NCTC 2544

Material es

El colorante rojo de nilo (9-dietilamino-5H-benzofenoxazina-5-ona) fue suministrado por Sigma (St Louis, MO) y el formaldehído por Fluka.

Protocolo experimental

- *Siembra en placa.* Cuando los queratinocitos alcanzaron un nivel de confluencia aproximado del 80 % se trataron con una solución de tripsina/EDTA con el fin de eliminar la matriz extracelular que las une a la superficie del frasco y obtener, así, una suspensión celular. A continuación, se utilizó esa suspensión celular para sembrar placas de 12 pocillos. Las monocapas contenían aproximadamente 2×10^6 células. Las placas se mantuvieron en estufa a 37 °C y 5 % CO₂ el tiempo necesario para alcanzar la confluencia.
- *Exposición a los productos.* Una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron 560 μ l por pocillo de distintas concentraciones de los tensioactivos (de 1 a 50 μ g/ml) disueltos en medio RPMI con un 1 % de FBS, 2 mM de L-glutamina y un 1 % de la solución de antibiótico. En

cada una de las placas se incluyeron controles, pocillos a los que se les añadió medio únicamente (sin tensioactivo).

- *Tinción de las gotas lipídicas citoplasmáticas.*
 - Preparación del colorante. Se preparó una solución madre de dicho colorante a una concentración de 1 mg/ml en etanol. Esa solución se diluyó 1:100 en PBS (solución de trabajo).
 - Protocolo experimental. Para analizar la acumulación de gotas lipídicas intracelulares se utilizó el rojo de nilo, un colorante vital excelente para la detección de lípidos neutros mediante microscopía de fluorescencia y citometría (Greenspan y cols., 1985). Después del tratamiento, se lavaron las monocapas con PBS y se tripsinizaron para obtener una suspensión celular. Se fijaron las células en una solución de formaldehído al 2 % durante 20 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se incubaron con 500 µl de la solución de trabajo del colorante rojo de nilo durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de lavar con PBS para eliminar el exceso de colorante, se resuspendieron las células en 0,5 ml de PBS y se guardaron en hielo.
- *Microscopía de fluorescencia.* A partir de las células tratadas y teñidas según el procedimiento anterior, se realizaron preparaciones para su observación en microscopio de fluorescencia. Un volumen de 50 µl de la suspensión de queratinocitos teñidos se centrifugó sobre portaobjetos Permafluor y la observación se realizó con un microscopio de fluorescencia Zeiss provisto de una cámara fotográfica.
- *Análisis mediante citofluorometría de flujo.* Las células teñidas según el procedimiento anterior se analizaron mediante citofluorometría. Se analizaron 10 000 células y el valor medio de fluorescencia se midió con el canal FL2 en escala logarítmica en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Italia).

3.2.2.4. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo

- *Fundamento.* La enzima LDH es una enzima citoplasmática estable que se encuentra en la mayoría de las células. Esta enzima se libera al medio de cultivo cuando se producen daños sobre la membrana plasmática de las células. Por tanto, se puede usar como marcador de la integridad de la membrana celular (Cook y Mitchell, 1989). La determinación se realizó con un kit comercial (Takara) siguiendo las especificaciones suministradas por la casa comercial. El kit consta de dos reactivos:
 - *Reactivo A.* Contiene la diaforasa, que actúa como catalizador, y NAD^+ .
 - *Reactivo B.* Contiene cloruro de yodotetrazolio y lactato sódico.

La reacción enzimática se produce en dos pasos. En primer lugar, el NAD^+ se reduce a NADH/H^+ por la conversión del lactato a piruvato catalizada por la LDH. En segundo lugar, el catalizador (la diaforasa) transfiere H/H^+ del NADH/H^+ a la sal de tetrazolio que se reduce a formazán. Esta reacción produce un cambio de color de amarillo pálido a rojo (Figura 3.11).

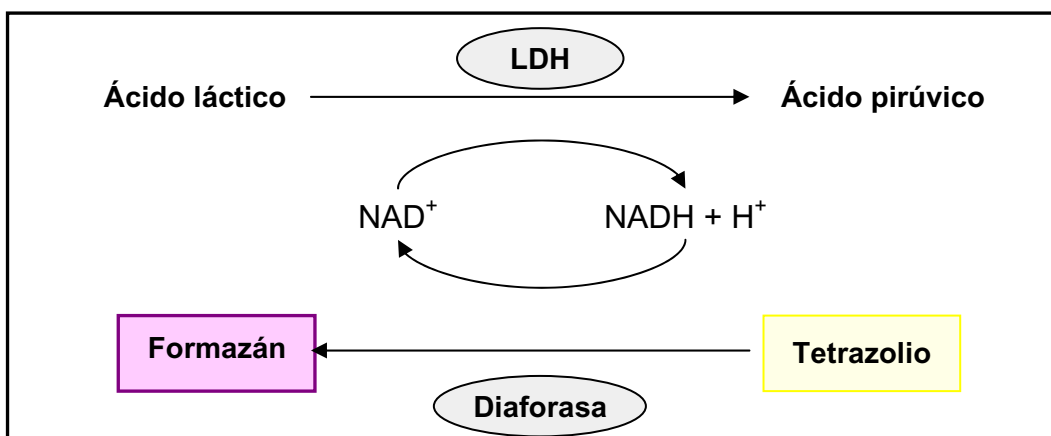


Figura 3.11. Fundamento de la técnica de detección de la actividad lactato deshidrogenasa

- *Protocolo experimental.* La liberación de la LDH se determinó en el medio de cultivo 24 h después del tratamiento con los tensioactivos. Se preparó una solución de trabajo mezclando 250 μl de reactivo A con 11,25 ml de reactivo B. Esta solución debe prepararse y utilizarse inmediatamente. En placas Costar 3690 de 96 pocillos se añadieron 50 μl de las muestras y, a continuación, 50 μl de la solución de trabajo.

Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad y, transcurrido ese periodo, se realizó la lectura de absorbancia a 490 nm (Bio-Rad 550).

3.2.2.5. Determinación de la concentración de proteína

- *Fundamento.* El contenido de proteína se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976) utilizando el reactivo Bio-Rad. Esta técnica se basa en la adición de un colorante de naturaleza ácida (Coomassie Brilliant Blue G-250) que reacciona con las proteínas formando complejos colorimétricos relativamente estables con un pico de absorbancia a 595 nm. Mediante una recta patrón calculada a partir de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) se calcula la concentración de proteína de la muestra.
- *Preparación de la recta patrón con BSA.* Se preparó una solución madre de BSA a 0,1 mg/ml. A partir de esa solución madre se preparó un banco de diluciones de 1 a 15 µg/ml.
- *Protocolo experimental.* El contenido de proteína del lisado celular de cada uno de los pocillos se determinó utilizando un kit comercial (Biorad, Richmond, CA) basado en el método descrito por Bradford antes mencionado. El contenido de proteína de las muestras se calculó a partir de la recta patrón de BSA.

3.3. Ensayos de irritación en un modelo organotípico

La **membrana corioalantoidea** (CAM) del huevo de gallina es una estructura muy vascularizada, utilizada por el embrión de pollo para el intercambio gaseoso a través de la cáscara del huevo. Sus características estructurales la hacen similar a tejidos altamente vascularizados como la conjuntiva y es capaz de responder frente a productos irritantes.

3.3.1. HET-CAM

Materiales

Los huevos se obtuvieron de la Granja Bellavista (Lliçà d'Amunt, Barcelona). El NaOH y el SDS fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) y el azul de tripán, la formamida y la solución salina por Sigma (St Louis, MO, EE. UU.).

Protocolo experimental

Se basa en el protocolo INVITTOX núm. 96 descrito a partir de los trabajos de Luepke (1985).

- *Preparación de la CAM.* Para la realización de este ensayo se utilizaron huevos fecundados de gallina incubados durante 10 días (White Leghorn variedad SA31). En primer lugar se expuso la membrana corioalantoidea al aire. Para eso se colocó el huevo de forma vertical con la parte más ancha hacia arriba que es la zona donde se encuentra la cámara de aire. Con unas tijeras planas se recortó la cáscara del huevo por esa zona en forma circular. Se eliminó con mucho cuidado una primera membrana blanquecina después de humedecerla con solución salina. Una vez eliminada esta primera membrana queda expuesta la CAM, que es transparente y con una abundante irrigación sanguínea (Figura 3.12).

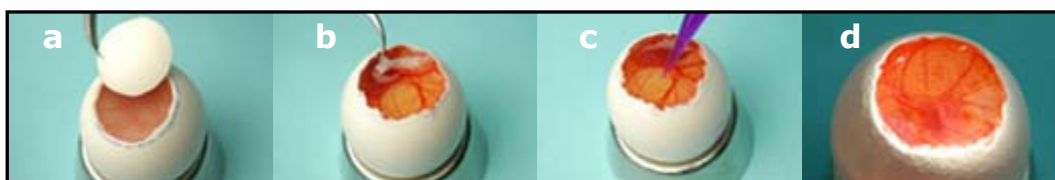


Figura 3.12. En la imagen superior se muestra la preparación de la membrana, primero se recorta la cáscara del huevo (a) y se elimina una primera membrana blanquecina (b) para exponer la CAM. A continuación se aplican los productos (c) y se valoran los fenómenos de forma visual (d) (Imágenes obtenidas de http://www.schrader-institute.de/htm/creachem_tox_ver.htm).

- *Exposición de la membrana a los productos.* Se prepararon soluciones de cada uno de los tensioactivos al 2 % (p/v) en solución salina fisiológica y se aplicaron 0,3 ml de las mismas a la CAM durante un periodo de 20 s. Transcurrido ese tiempo se retiró el exceso de producto lavando con agua destilada y se realizó la observación de la membrana para valorar la posible aparición de los siguientes fenómenos: hemorragia, vasoconstricción y coagulación. Se anotó el tiempo de aparición en segundos durante un tiempo máximo de observación de 5 min.
- *Cálculo del Índice de Irritación ocular.* Cada uno de los productos se ensayó en tres huevos y se realizó la media aritmética de los tiempos de aparición de los fenómenos nombrados anteriormente. El índice de irritación ocular (IIO) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$IIO = \frac{(301-h) \times 5}{300} + \frac{(301-v) \times 7}{300} + \frac{(301-c) \times 9}{300},$$

donde h , v y c corresponden a los tiempos (en segundos) de aparición de hemorragia, vasoconstricción y coagulación, respectivamente. Según el valor de este índice, los tensioactivos se clasifican según la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Clasificación de las sustancias irritantes en función del índice de irritación ocular calculado mediante el método HET-CAM.

IIO	Clasificación
De 0 a 0,9	No irritante
De 1 a 4,9	Ligeramente irritante
De 5 a 8,9	Irritante
De 9 a 21	Muy irritante

3.3.2. Modificación del HET-CAM: CAM-TBS

La valoración de la posible capacidad de un producto de causar irritación ocular utilizando el método HET-CAM presenta el inconveniente de la subjetividad del experimentador a la hora de detectar la aparición de los efectos adversos. Para evitar esto, se desarrolló una nueva estrategia, el CAM-TBS, un método que supone una mejora ya que, en este caso, lo que se valora es la capacidad del colorante azul de tripán de penetrar a través de las membranas lesionadas. En este ensayo se determina la cantidad de colorante que se adsorbe a la CAM después de haber entrado en contacto con el producto (Hagino y cols, 1991, 1993), por tanto, a diferencia del HET-CAM, es un método cuantitativo.

- *Protocolo experimental.* El procedimiento experimental se basa en el protocolo INVITTOX núm. 108. Una vez se expuso la membrana al producto se depositaron 0,5 ml de la solución de azul de tripán (0,1 % en PBS) y se dejó actuar durante 1 min. Después de ese tiempo, la membrana se lavó, se cortó y se colocó en una cápsula de Petri con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. A partir de aquí, el protocolo incorporó una modificación (Vinardell y García, 2000) respecto al protocolo INVITTOX dado que para determinar la cantidad de colorante adsorbido en la membrana lavada, esta se pesó y se introdujo

en un tubo de poliestireno con 3 ml de formamida para extraer el colorante fijado al tejido. Cuando la formamida extrajo todo el colorante, se descartó la membrana y se realizó la lectura de absorbancia de las muestras. Para determinar la longitud de onda apropiada para realizar las lecturas de absorbancia, se analizó el espectro de absorbancia de la solución de azul de tripán (Figura 3.13) para establecer el pico máximo de absorbancia que puede oscilar entre los 580 y los 620 nm en función del lote del colorante.

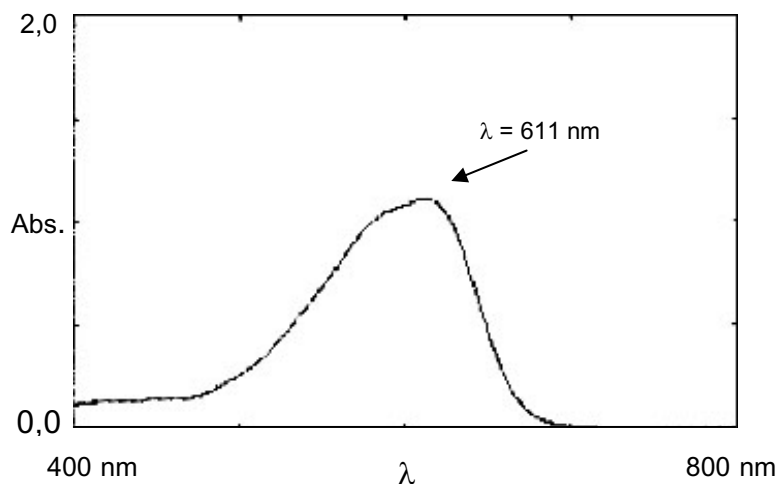


Figura 3.13. Espectro de absorbancia del colorante azul de tripán. En este caso el pico máximo de absorbancia se encuentra a 611 nm.

La concentración final de colorante de las muestras se calculó a partir de una recta patrón calculada a partir de cantidades conocidas del colorante (Figura 3.14). Los resultados se expresaron en nmoles del colorante adsorbido por mg de tejido. El hecho de expresar la cantidad de colorante en función del peso del tejido reduce la variabilidad de los resultados ya que no es necesario cortar siempre la misma cantidad de membrana, una maniobra bastante delicada (Vinardell y García, 2000).

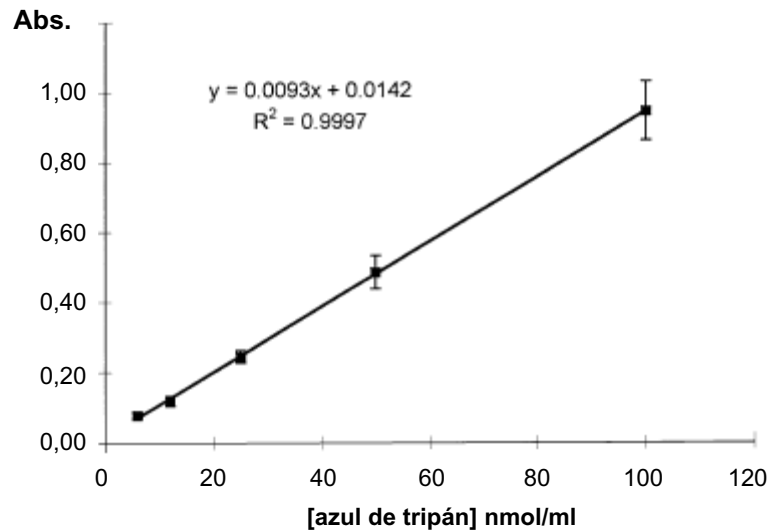


Figura 3.14. Recta patrón calculada a partir de los valores de absorbancia de concentraciones conocidas de azul de tripán.

En función de la cantidad de colorante adsorbido a la membrana, los compuestos pueden clasificarse según se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Clasificación de las sustancias irritantes en función de la cantidad de azul de tripán adsorbido en la membrana.

Colorante adsorbido (nmoles/mg)	Clasificación
<0,100	No irritante
0,100-0,150	Irritante
>0,150	Muy irritante

3.4. Ensayos de irritación *in vivo*

Estos ensayos se han realizado con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, con arreglo a las regulaciones actuales para el uso y la manipulación de animales de experimentación (Decreto 214/97, Generalitat de Catalunya).

Animales de experimentación

Los conejos utilizados eran de la cepa New Zealand (machos albinos, 10 semanas de vida y un peso aproximado de 2,0 kg) y fueron suministrados por Granja San Bernardo (Navarra). Durante el tiempo de experimentación se han

mantenido en el Servicio de Estabulario de la *Facultat de Farmàcia* en condiciones estandarizadas de temperatura (26-28 °C) y humedad relativa (40-60 %), con un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

3.4.1. Ensayo de irritación ocular

- *Protocolo experimental.* Este ensayo se llevó a cabo siguiendo la Guía 405 de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). Para realizar este ensayo se aplicaron 0,1 ml del producto al 1 o 2 % (p/v) en solución salina fisiológica en uno de los ojos del conejo. El ojo contralateral se mantuvo como control sin tratar. Tras 1 h de exposición, se realizó la observación de los ojos para valorar las posibles lesiones en la córnea, la conjuntiva y el iris a las 24, 48 y 72 h. Las lesiones se cuantificaron según las puntuaciones establecidas en la Guía 405 y que se encuentran descritas en la Tabla 3.6. Cada uno de los productos se ensayó en tres animales.

3.4.2. Ensayo de irritación dérmica

- *Protocolo experimental.* Este ensayo se llevó a cabo siguiendo la Guía 404 de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). Se rasuró la piel de la zona dorsal de los animales con mucho cuidado para evitar lesiones con una rasuradora 24 h antes de la exposición a los productos. En un área aproximada de 6 cm² de piel se aplicaron 0,5 ml de una solución de tensioactivo al 5 % (p/v) en solución salina fisiológica y la zona se cubrió con una gasa estéril y se dejó durante un periodo de 4 h. La valoración de las lesiones se hizo 24 h después de retirar los parches. Estas lesiones se cuantificaron según las puntuaciones descritas en la Guía 404 (Tabla 3.7). Cada producto se ensayó en tres animales.

Tabla 3.6. Valoración cuantitativa de las lesiones oculares (Guía 405, OCDE).

Córnea	
<i>Opacidad: grado de densidad (se tendrá en cuenta la zona más densa)</i>	
Sin ulceración ni opacidad	0
Zonas de opacidad diseminadas o difusas (aparte del ligero mate debido a la limpieza habitual); los detalles del iris se aprecian con claridad	1
Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos	2
Zona nacarada; no se ven detalles del iris; el tamaño de la pupila apenas es discernible	3
Córnea opaca; no se distingue el iris a su través.....	4
Máximo posible 4	
Iris	
Normal	0
Pliegues notablemente hundidos, congestión, inflamación, moderada hiperemia o inyección circuncorneal; iris reactivo a la luz (si la reacción es defectuosa se considera como efecto)	1
Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz.....	2
Máximo posible 2	
Conjuntiva	
<i>Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar; se excluye la córnea y el iris)</i>	
Normal	0
Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyectados)	1
Coloración carmesí difusa; no se distinguen fácilmente los vasos individuales	2
Coloración carne difusa	3
Máximo posible 3	
Quemosis	
<i>Inflamación (se refiere a los párpados o a las membranas nictitantes)</i>	
Normal	0
Cierta hinchazón superior a lo normal	1
Hinchazón evidente con eversión parcial de los párpados	2
Hinchazón con párpados medio cerrados	3
Hinchazón con párpados más que medio cerrados.....	4
Máximo posible 4	

Tabla 3.7. Valoración cuantitativa de las reacciones dérmicas (Guía 404, OCDE).

Eritema y formación de escaras	
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (enrojecimiento color carne) o formación de escaras que impide graduarlo	4
----- Máximo posible 4	
Edema	
Sin edema.....	0
Edema muy leve (apenas perceptible)	1
Edema ligero (los bordes de la zona están bien definidos por elevaciones concretas)	2
Edema moderado (elevación de 1 mm aproximadamente).....	3
Edema intenso (elevación superior a 1 mm y extensión que sobrepasa la zona de exposición)	4
----- Máximo posible 4	

3.5. Análisis estadístico

Los resultados de los diferentes ensayos se expresan como la media y el error estándar (EE). Los datos se han comparado utilizando el análisis ANOVA de un solo factor. La prueba estadística de comparación utilizada ha sido la F de Snedecor con un nivel de significación de 0,05. Cuando la comparación ha resultado significativa se han aplicado diferentes análisis *post hoc* para la comparación entre grupos, tal y como se indicará convenientemente para cada caso. En general, un valor $P < 0,05$ se ha considerado significativo aunque, en algunos casos también se ha indicado si el valor $P < 0,01$. Todos los análisis se han realizado con el paquete estadístico SPSS® 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, E.U.A.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de que cualquier producto farmacéutico o cosmético se utilice para consumo humano, en muchas ocasiones se llevan a cabo ensayos en animales para valorar su eficacia y seguridad. Sin embargo, la utilización de animales en los procesos modernos de desarrollo de productos resulta cada vez más cara y menos práctica. Además, los principios éticos de la experimentación animal demandan la aplicación de la estrategia de las 3 erres. Por lo tanto, existe una necesidad creciente de disponer de métodos *in vitro* que sean rápidos y fiables para el cribado y la evaluación de los riesgos potenciales para la salud humana de nuevas formulaciones cosméticas y farmacéuticas. Esta necesidad es especialmente acuciante para la industria cosmética que debe fabricar productos seguros y eficaces, a la vez que se enfrenta a la negativa de los consumidores y de la legislación a que sus productos sean ensayados en animales.

Los ensayos *in vitro* son herramientas valiosas en la industria cosmética y farmacéutica dado que suelen ser técnicas rápidas y de bajo coste para realizar estudios preliminares de toxicidad. Además, permiten el estudio de los efectos tóxicos desde un punto de vista mecanístico. Otra ventaja que presentan los métodos *in vitro* respecto a los sistemas *in vivo* es que son capaces de distinguir pequeñas diferencias entre productos y materiales ligeramente irritantes. Los ensayos de Draize, debido a su naturaleza cualitativa, no permiten detectar esas pequeñas diferencias. Asimismo, tampoco son modelos apropiados para el estudio de las bases mecanísticas de los procesos de irritación que tienen lugar en la piel o el ojo. La elección de una batería apropiada de métodos *in vitro* puede proporcionar unos resultados de toxicidad mucho más informativos que los obtenidos con el Draize.

Por otro lado, los tensioactivos constituyen ingredientes prácticamente esenciales en la formulación de productos cosméticos y farmacéuticos. A pesar de la necesidad de utilizar este tipo de compuestos, muchos de ellos desencadenan reacciones irritantes en la piel y las mucosas. Se conoce este efecto de los tensioactivos desde que en los años 30 se tuvieron datos de los primeros casos de irritación dérmica provocada por jabones (Blank, 1939). Por ese motivo, el efecto de los tensioactivos sobre la piel y las mucosas se ha estudiado en profundidad tanto *in vivo* como en condiciones *in vitro* y se ha demostrado que estos compuestos provocan alteraciones bioquímicas en la piel y las mucosas. Desde entonces, se han utilizado como compuestos de referencia para el estudio de los procesos de irritación (Lee y Maibach, 1995).

4.1. Ensayos Para Evaluar La Irritación Ocular

4.1.1. Ensayo de hemólisis

El ensayo de hemólisis es uno de los métodos alternativos específico para valorar la irritación ocular de tensioactivos y fue desarrollado por Pape y cols. (1987) basándose en estudios previos sobre el efecto de los tensioactivos sobre los eritrocitos (Kondo y Tomizawa, 1968; Gloxhuber, 1974; Kondo, 1976).

En este estudio, el ensayo se ha realizado siguiendo el protocolo INVITTOX número 37 aunque se han incluido algunas modificaciones. En dicho protocolo se establece la utilización de sangre procedente de vacas sacrificadas en el matadero mientras que en este estudio se ha utilizado sangre humana procedente de un banco de donantes. No obstante, otros autores han descrito la utilización de sangre procedente de otros animales como la rata (Sugai y cols., 1991), el cerdo (Pape y Hoppe, 1991) y el conejo (Conduzorgues y cols., 1989; Pape et al. 1999). El uso de un tipo u otro viene condicionado por su disponibilidad. Sin embargo, la utilización de eritrocitos de origen humano tiene la ventaja de ser un modelo más apropiado ya que al menos nos evitaríamos la extrapolación de los resultados del modelo animal a los humanos. Únicamente debería tenerse en cuenta la extrapolación entre el modelo *in vitro* y la situación del organismo.

En el protocolo 37 también se describe la utilización de una solución amortiguadora de fosfatos con un pH 7,4. Sin embargo, en el caso de nuestros tensioactivos ha sido necesaria la utilización de solución salina (NaCl 0,9 %) debido a problemas de solubilidad de los mismos. Estos problemas para disolver los tensioactivos en solución amortiguadora de fosfatos podrían suponer una desventaja de estos productos.

El ensayo de hemólisis es un método *in vitro* propuesto específicamente para la evaluación del potencial irritante de tensioactivos y de preparaciones que contienen este tipo de compuestos como una alternativa fiable al ensayo de Draize (Pape y Hoppe, 1991; Sugai y cols., 1991). El potencial efecto irritante de los tensioactivos está relacionado con la interacción inespecífica del tensioactivo con los lípidos de la membrana que provoca su desestabilización y posterior solubilización (Helenius y Simons, 1975). Cabe destacar que el eritrocito se considera un buen modelo para el estudio de la interacción de las sustancias con las membranas celulares dado que su falta de núcleo le priva de mecanismos de protección propios de otras células para luchar frente a las

agresiones sobre la membrana. Por otro lado, también está relacionado con su interacción inespecífica con las proteínas provocando su desnaturalización (Jones, 1992). Asimismo, este ensayo presenta una sensibilidad y una especificidad que sobrepasa el 80 % y es el que ha mostrado una menor discordancia con los resultados del Draize ocular en estudios de validación (Brantom y cols., 1997; Balls y cols., 1999; Hatao y cols., 1999; Okamoto y cols., 1999; Pape y cols., 1999).

El ensayo de hemólisis es un método sencillo, barato, no se necesita un equipamiento sofisticado para llevarlo a cabo y requiere poco tiempo por producto. Además está bien caracterizado ya que los criterios principales de valoración están bien definidos. Sin embargo, cabe destacar que no se propone como una única alternativa al ensayo de Draize, pero sí como una metodología adecuada para realizar un cribado rápido de nuevas moléculas y clasificarlas en función de su potencial irritante.

Las propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos son factores clave que afectan a las reacciones de irritación. Por ese motivo, se ha realizado ese ensayo con los diferentes tensioactivos derivados de aminoácidos para empezar a caracterizar las propiedades biológicas de esas nuevas moléculas. El objetivo que se persigue es buscar la relación entre la estructura química de estos tensioactivos con su potencial efecto irritante para guiar la síntesis de nuevos compuestos.

Además, en el estudio también se han incluido diversos tensioactivos comerciales que han servido como compuestos de referencia: la Tegobetaína[®], el dodecil sulfato sódico (SDS) y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB).

El SDS es un tensioactivo aniónico que se ha utilizado ampliamente para estudiar los procesos de irritación dérmica. El SDS se utiliza como humectante, detergente y emulsionante en pomadas, productos para el cuidado personal y preparaciones farmacéuticas. Además, también presenta actividad antimicrobiana. Se recomienda el uso del SDS como un compuesto irritante de referencia debido a que actúa rápido, no es alérgico y sus efectos tóxicos son reproducibles. Estas propiedades hacen a este tensioactivo muy apropiado y útil en el estudio de las reacciones de irritación (Lee y Maibach, 1995; Effendy y Maibach, 1996).

El HTAB pertenece a la familia de las sales cuaternarias de amonio. Este tipo de compuestos se utilizan habitualmente como antimicrobianos en preparaciones farmacéuticas debido a su acción sobre muchas bacterias

grampositivas y algunas gramnegativas. Pueden utilizarse por vía tópica sobretodo para la limpieza de heridas. Las soluciones acuosas de estos compuestos se utilizan para la limpieza de utensilios médicos contaminados. En solución acuosa, las sales cuaternarias de amonio se encuentran en forma de cationes anfífilos. Muchos de los compuestos de este grupo se utilizan como pesticidas, especialmente frente a hongos, algas y bacterias. Su diana principal son las membranas biológicas (Przestalski y cols., 2000).

Los tensioactivos anfóteros como la Tegobetaína[®] (cocamidopropil betaína) tienen como mínimo un grupo aniónico y un grupo catiónico. Estas moléculas poseen las propiedades detergentes de los tensioactivos aniónicos y la actividad desinfectante de los catiónicos. Su actividad depende del pH del medio en el que estén disueltos. Estos tensioactivos se consideran no irritantes para el ojo y la piel y por ese motivo se utilizan mucho en champús para niños (Effendy y Maibach, 1996). La Tegobetaína[®] se obtiene a partir de la reacción de ácidos grasos de coco (aceite de coco) con la dimetilaminopropilamina seguida de otras reacciones posteriores. Por tanto, se trata de una mezcla de diversos compuestos entre los que destaca una impureza, la dimetilaminopropilamina que, según los estudios realizados, sería una molécula responsable de reacciones alérgicas (García, 2002). El primer caso fue publicado en 1983 (van Haute y Dooms-Goossens, 1983) debido a un champú. Después se han publicado más casos, incluyendo casos de irritación por líquidos de limpieza de lentes de contacto. También es uno de los principales causantes de sensibilización en personal de peluquería.

En el ensayo de hemólisis se determinan los efectos de los tensioactivos sobre las membranas celulares y también sobre las proteínas, dos marcadores fundamentales en los procesos de irritación. El efecto sobre la membrana citoplasmática del eritrocito se valoró mediante el cálculo de la concentración hemolítica 50 (CH₅₀) que se define como la concentración de producto necesaria para provocar la hemólisis del 50 % de los eritrocitos de una suspensión. Esta parte del ensayo, sería comparable en el caso del ensayo *in vivo* a los daños observados a nivel de la conjuntiva. Por otro lado, el efecto que el tensioactivo ejerce sobre las proteínas se cuantificó mediante el índice de desnaturalización de la hemoglobina (ID). Esta parte del ensayo es esencial porque puede relacionarse con la opacidad observada en la córnea de los animales, uno de los puntos más importantes en el ensayo de Draize. En ambas partes del ensayo se utiliza como marcador los cambios en el espectro de absorbancia de la oxihemoglobina. Asimismo, este protocolo presenta la ventaja de establecer un claro criterio de clasificación del grado de irritación

ocular en función de la relación lisis/desnaturalización (L/D) (Tabla 3.2, pág. 57).

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos con este ensayo para los diferentes tensioactivos. Según el ensayo, todos los tensioactivos derivados de aminoácidos estudiados se clasifican entre las categorías de moderadamente irritantes a no irritantes. Además, resultan menos irritantes que el SDS y el HTAB, compuestos que se clasifican como irritantes. La mayoría de estos tensioactivos tienen un potencial irritante similar a la Tegobetaína.

Por otro lado, si se realiza una clasificación de los tensioactivos según los valores de CH_{50} e ID de forma independiente se obtienen resultados notablemente diferentes (Tabla 4.2). La diferencia fundamental se encuentra en los tensioactivos aniónicos (LAcE y LAcD) los cuales presentan una baja actividad lítica y, por tanto, podría concluirse que en función de su CH_{50} son poco irritantes. En cambio, si tenemos en cuenta su elevado efecto desnaturizante sobre las proteínas (entre un 30 y un 40 %) nos indicaría un potencial irritante elevado. En contraste, los tensioactivos catiónicos estudiados presentan una actividad lítica superior a los aniónicos pero su efecto desnaturizante es inferior. Estos hechos ponen de manifiesto que la carga iónica del tensioactivo determina su diana biológica, de modo que los tensioactivos aniónicos tendrían un mayor efecto sobre las proteínas y los catiónicos sobre las membranas. Por tanto, ambas partes del ensayo son imprescindibles para una clasificación correcta de los tensioactivos en función de su potencial irritante.

Tabla 4.1. Resultados del ensayo de hemólisis para los tensioactivos derivados de aminoácidos y tres tensioactivos comerciales de referencia (Tegobetaina®, SDS y HTAB). Se muestran los valores de CH₅₀ (µg/ml), el ID (%), la relación L/D y su correspondiente clasificación en función de la Tabla 3.3.

Tensioactivo	Longitud de la cadena	Carga iónica	CH ₅₀	ID (%)	L/D	Clasificación
LAE	12	Catiónico	38,4 (1,1)	13,3	2,9	Moderadamente irritante
LAM	12	Catiónico	58,8 (3,7)	22,5	2,6	Moderadamente irritante
MAM	14	Catiónico	52,4 (3,4)	6,2	8,4	Moderadamente irritante
CCR	Variable (8-16)	Catiónico	63,9 (8,6)	1,7	37,9	Ligeramente irritante
C ₃ (OA) ₂	8	Catiónico	>1000	0,3	>100	No irritante
C ₃ (CA) ₂	10	Catiónico	48,1 (0,4)	12,1	4,0	Moderadamente irritante
C ₃ (LA) ₂	12	Catiónico	12,5 (0,4)	8,3	1,5	Moderadamente irritante
C ₃ (OH)(LA) ₂	12	Catiónico	12,1 (0,6)	11,4	1,1	Moderadamente irritante
8,8R	8	Catiónico	24,0 (2,9)	19,1	1,3	Moderadamente irritante
10,10R	10	Catiónico	20,5 (1,3)	11,9	1,7	Moderadamente irritante
12,12R	12	Catiónico	60,1 (4,1)	11,7	5,6	Moderadamente irritante
14,14R	12	Catiónico	64,3 (0,2)	12,8	5,0	Moderadamente irritante

Tensioactivo	Longitud de la cadena	Carga iónica	CH₅₀	ID (%)	L/D	Clasificación
LAcR	12	Catiónico	43,9 (0,9)	3,0	14,6	Ligeramente irritante
LAcN	12	No iónico	>1000	0	>100	No irritante
LAcQ	12	No iónico	45,2	8,5	5,3	Moderadamente irritante
LAcY	12	No iónico	>1000	0	>100	No irritante
LAcE	12	Aniónico	226,4 (15,2)	34,2	6,6	Moderadamente irritante
LAcD	12	Aniónico	401,9 (86,0)	41,7	9,6	Moderadamente irritante
Tegobetaína	Variable (8-18)	Anfótero	34,4 (1,3)	14,4	2,4	Moderadamente irritante
SDS	12	Aniónico	43,6 (0,9)	100	0,4	Irritante
HTAB	16	Catiónico	11,6 (0,1)	46,5	0,2	Irritante

Tabla 4.2. Clasificación de los tensioactivos derivados de aminoácidos en categorías y ordenados en función de su capacidad lítica (columna CH₅₀) y de su efecto desnaturizante sobre las proteínas (columna ID) de mayor a menor. Los símbolos equivalen a la carga iónica del tensioactivo: (+) catiónico, (-) aniónico, (0) no iónico y (±) anfótero.

CH ₅₀ (µg/ml)		ID (%)	
CH ₅₀ <25	C ₃ (OH)(LA) ₂ (+)	25<ID<50	LAcD (-)
	C ₃ (LA) ₂ (+)		LAcE (-)
	10,10R (+)	10<ID<25	LAM (+)
	8,8R (+)		8,8R (+)
LAE (+)	LAE (+)		
LAcR (+)	14,14R (+)		
CH ₅₀ <50	C ₃ (CA) ₂ (+)	10<ID<25	C ₃ (CA) ₂ (+)
	LAcQ (0)		10,10R (+)
	MAM (+)		12,12R (+)
	LAM (+)		C ₃ (OH)(LA) ₂ (+)
CH ₅₀ <100	12,12R (+)	1<ID<10	LAcQ (0)
	CCR (+)		C ₃ (LA) ₂ (+)
	14,14R (+)		MAM (+)
	LAcE (-)		LAcR (+)
CH ₅₀ <1000	LAcD (-)	ID<1	CCR (+)
	C ₃ (OA) ₂ (+), LAcN (0), LAcY (0)		C ₃ (OA) ₂ (+), LAcN (0), LAcY (0)

Existen numerosos trabajos en la bibliografía científica que intentan correlacionar los valores MAS obtenidos mediante el ensayo de Draize ocular con el valor de CH₅₀ (Brantom et al. 1997; Gettings et al. 1996; Okamoto et al. 1999 Por lo comentado anteriormente, esa aproximación podría resultar engañosa dado que la naturaleza fisicoquímica de la sustancia tiene influencia en su mecanismo de acción.

El marcado efecto que presentan todas las moléculas con carácter anfífilo para desestabilizar las membranas indica que es una consecuencia intrínseca de la naturaleza química de esa clase de compuestos. Sin embargo, mientras que las alteraciones producidas sobre las membranas por algunos tensioactivos parecen estar causadas por una interacción inespecífica con los lípidos de la membrana, otras parecen depender de algunas características estructurales específicas del tensioactivo. Por tanto, el mecanismo que desencadena la hemólisis es complejo y puede estar causado por una desestructuración molecular de las membranas o ser consecuencia de un incremento de la permeabilidad de la membrana a solutos extracelulares (Cserhati y cols., 1984; Vinardell e Infante, 1999).

Los lípidos que forman las bicapas lipídicas de las células son complejos y muy variados. Los lípidos suelen poseer dos cadenas hidrocarbonadas y las longitudes de las cadenas suelen oscilar entre C_{12} y C_{24} con distintos grados de insaturación. La estabilidad de la bicapa depende en gran medida de dicha estructura de doble cadena ya que permite el empaquetamiento de los lípidos de forma laminar limitando al máximo las interacciones entre las cabezas polares. Si por la acción de una fosfolipasa se pierde una de las cadenas, las fuerzas de repulsión que se establecen entre los grupos polares provocan la desestabilización de la bicapa en relación a su estructura micelar (Jones, 1992). En ese sentido, cabría esperar que la actividad hemolítica de los tensioactivos que poseen dos cadenas hidrocarbonadas en su estructura fuese inferior en relación a los tensioactivos de una sola cadena. Sin embargo, en el caso de los tensioactivos estudiados en este trabajo no se encuentra esa relación. Los tensioactivos que poseen doble cadena son los que presentan una estructura dimérica ($C_3(OH)(LA)_2$, $C_3(LA)_2$, $C_3(CA)_2$ y $C_3(OA)_2$) y los tensioactivos de estructura glicerolípida de la familia 1,2-O-diacil-rac-glicero-3 (L-arginina) (8,8R, 10,10R, 12,12R y 14,14R), y sus valores de CH_{50} se pueden considerar similares a los valores de los tensioactivos catiónicos de una sola cadena. No obstante, estos tensioactivos de doble cadena presentan otra característica estructural que los diferencia de los tensioactivos de una sola cadena: presentan en su grupo polar dos cargas positivas, es decir, son dicatiónicos. Es posible que, a pesar de presentar doble cadena, el hecho de poseer dos cargas positivas incremente las fuerzas de repulsión que se establecen entre los grupos polares del tensioactivo y los lípidos de la membrana, desestabilizando la membrana de forma similar a un tensioactivo de una sola cadena. De hecho, existen otros autores que proponen que las moléculas con grupos polares de mayor tamaño o con una mayor

concentración de cargas pero con la misma región hidrófoba inducen una desorganización de la membrana mayor (Przestalski y cols., 2000). Es posible que ese sea el motivo del bajo potencial irritante que suelen presentar los tensioactivos no iónicos. En las dos últimas décadas han sido los tensioactivos más utilizados en formulaciones farmacéuticas. Asimismo, su potencial irritante es bajo y los tensioactivos de naturaleza no iónica tienen la ventaja de ser compatibles con el resto de tensioactivos y además el pH no afecta a sus propiedades. Estos tensioactivos se utilizan como emulsionantes en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, como detergentes para el textil, como espumantes en detergentes para lavadoras y lavavajillas y como espesantes en detergentes y champús líquidos. De hecho, los tensioactivos no iónicos incluidos en este estudio (LAcQ, LAcN y LAcY) son los que presentan menor capacidad lítica y menor poder desnaturalizante.

Cuando se analiza el posible efecto de la longitud de la cadena con la actividad lítica de los compuestos se obtienen resultados contradictorios. En el caso de los tensioactivos diméricos, los tensioactivos de C_{12} son más hemolíticos que los que presentan cadenas de C_{10} y C_8 . En cambio, en la familia 1,2-O-diacil-rac-glicero-3 (L-arginina), los tensioactivos C_8 y C_{10} son más hemolíticos que los que presentan cadenas más largas (C_{12} y C_{14}). Existen numerosos estudios donde se ha intentado relacionar la longitud de la cadena de los tensioactivos con su potencial irritante o su capacidad para provocar la lisis celular. En el trabajo publicado por Vinardell e Infante (1999), realizado con tensioactivos no iónicos, concluyen que los tensioactivos con cadenas hidrocarbonadas más largas son menos hemolíticos que los de cadenas más cortas, no obstante, en este trabajo las longitudes de cadena de los tensioactivos oscilan entre C_{14} y C_{22} . Kotani y cols. publicaron en 1994 un trabajo en el que estudiaron una serie de tensioactivos homólogos de naturaleza aniónica pero con cadenas que oscilaban entre C_4 y C_{18} . Los resultados de este trabajo muestran que los tensioactivos con cadenas entre C_{10} y C_{16} presentaban una mayor capacidad hemolítica, los tensioactivos con cadenas de longitud por debajo o por encima de ese intervalo presentaban una capacidad hemolítica mucho menor. Posteriormente, en un estudio de Przestalski y cols. (2000) se confirmaron esos resultados con tensioactivos catiónicos. Los autores observaron que aquellas moléculas anfífilas que pertenecen a la misma familia pero difieren en su región hidrofóbica generalmente muestran una dependencia no lineal entre su actividad y su hidrofobicidad. Dicha dependencia es casi parabólica, es decir, la eficiencia de la interacción entre esos compuestos y las membranas aumenta a medida que

incrementa la longitud de la cadena hasta una determinada longitud de cadena a partir de la cual empieza a disminuir. Probablemente, la longitud de la cadena tenga algún efecto sobre las propiedades biológicas de los compuestos, pero también depende de la combinación de diversas propiedades estructurales. Parece evidente que únicamente existe una relación directa entre longitud de la cadena y potencial irritante dentro de una misma familia de compuestos con propiedades estructurales similares. De hecho, diversos estudios han hallado una baja correlación de los resultados *in vivo-in vitro* cuando se consideran distintas categorías de sustancias. Sin embargo, ese índice mejora mucho cuando solo se considera un único grupo de sustancias similares (Jones y cols., 2001). Este hecho refleja los distintos mecanismos de acción implicados para distintos tipos de sustancias y, en consecuencia, diferentes respuestas del sistema de ensayo.

El ensayo de hemólisis y la irritación dérmica

El ensayo de hemólisis fue propuesto inicialmente como una alternativa al ensayo de Draize para la valorar la irritación ocular. Como ya se ha comentado anteriormente, se propone relacionar los valores de CH_{50} con los daños sobre la conjuntiva y el ID con los daños sobre la córnea. No obstante, recientemente también ha sido propuesto como una alternativa al Draize dérmico. El estrato córneo es una estructura compleja formada por una red proteica interconectada (compuesta por queratina intracelular y conexiones proteicas intercelulares) embebida en una matriz lipídica. La unión de los tensioactivos a la queratina y la subsiguiente desnaturalización de la proteína provocan la hinchazón del epitelio y están relacionados directamente con la inducción de las respuestas cutáneas (Rhein y Simion, 1996). En un estudio reciente se ha observado una buena correlación entre el ID, la CH_{50} , y el índice L/D con los valores de eritema (Pfannenbecker y cols., 2005). Asimismo, está bastante aceptado que la interacción de los tensioactivos con las proteínas del estrato córneo es uno de los mecanismos a través de los cuales pueden provocar daños sobre la integridad del estrato córneo y desencadenar procesos de irritación dérmica (Downing y cols., 1993). No obstante, el papel desempeñado en los procesos de irritación dérmica por la interacción de los tensioactivos con los lípidos es todavía una cuestión controvertida (Downing y cols., 1993; López y cols., 2000; Gloor y cols., 2004). Es importante destacar que las láminas lipídicas del estrato córneo están formadas fundamentalmente por ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres (Gray y cols., 1982) y no se encuentra ninguno de los fosfolípidos típicos de las membranas plasmáticas y las de otros compartimentos intracelulares. Por tanto, se debe ser cauteloso al

interpretar los valores de CH_{50} como un indicador de daños sobre la estructura lipídica del estrato córneo. Según el trabajo publicado por Downing en 1993 se descarta la posibilidad de que la pérdida de la función de barrera del estrato córneo provocada por el SDS *in vivo* se deba a la solubilización de lípidos de las bicapas, hecho que confirma el resultado del trabajo anterior de Froebe y cols. (1990).

4.1.2. Ensayos basados en la membrana corioalantoidea: HET-CAM y CAM-TBS

El objetivo general de los ensayos basados en la utilización de la membrana corioalantoidea es la valoración del posible efecto irritante de un producto sobre una membrana mucosa de forma análoga al ensayo ocular de Draize. En este ensayo se observan cambios en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, como son la hemorragia, la vasoconstricción y la coagulación, después del tratamiento con el producto de ensayo. Se aplica una dosis determinada del producto sobre la CAM de huevos fertilizados de aproximadamente 10 días. Es importante no utilizar huevos que hayan sido fecundados hace más de 10 días ya que se considera que a partir de ese tiempo el embrión ya tiene un sistema nervioso lo suficientemente desarrollado como para sufrir dolor.

Generalmente, la concentración de tensioactivo que se añade en las formulaciones no suele exceder del 5 % (p/v) aunque lo habitual es que oscile entre el 1 y el 2 % (Harry, 1982; Lewandowski y Schwuger, 2003). Por ese motivo, se ha valorado el potencial irritante de los compuestos con estructura lineal, LAM, MAM y CCR, disueltos en solución salina fisiológica al 2 %. Cada compuesto se ha ensayado en tres huevos y los resultados individuales se muestran en el Tabla 4.3. Según el ensayo HET-CAM, los tres nuevos compuestos se clasifican como muy irritantes. De los resultados individuales cabe destacar las diferencias de sensibilidad que pueden presentar las membranas para cada fenómeno considerado individualmente.

Tabla 4.3. Cálculo de Índice de Irritación Ocular por el método HET-CAM (tiempo en segundos)

LAM 2%			
	Huevo 1	Huevo 2	Huevo 3
Vasodilatación	No se observa	275	No se observa
Hemorragia	50	70	39
Coagulación	103	118	82
IIO	11,80	11,31	12,68
MAM 2%			
	Huevo 1	Huevo 2	Huevo 3
Vasodilatación	No se observa	27	60
Hemorragia	30	80	70
Coagulación	120	150	94
IIO	11,75	14,25	15,62
CCR 2%			
	Huevo 1	Huevo 2	Huevo 3
Vasodilatación	224	177	No se observa
Hemorragia	10	61	24
Coagulación	187	91	89
IIO	11,49	13,97	12,82

También se ha valorado el potencial irritante de los productos LAM, MAM y CCR mediante el método CAM-TBS. A diferencia del ensayo HET-CAM, este método es cuantitativo de esa manera se elimina la subjetividad del experimentador a la hora de valorar los efectos sobre la membrana corioalantoidea. También se han ensayado en tres huevos y los resultados se muestran en la Tabla 4.4. Según este ensayo los compuestos se clasifican como muy irritantes. No obstante, no existe una clasificación predefinida del ensayo. Se ha utilizado una clasificación propuesta y publicada previamente (Vinardell y García, 2000). En el CAM-TBS también se detectan diferencias en la sensibilidad de las membranas corioalantoideas.

Tabla 4.4. Cálculo del índice de irritación ocular según el ensayo CAM-TBS. Los resultados se expresan como nmoles de colorante adsorbido por mg de membrana.

LAM 2%			
	Huevo 1	Huevo 2	Huevo 3
Peso de la membrana (mg)	29,8	64,8	31,9
Colorante adsorbido (nmol)	7,2	28,6	6,4
Relación nmol/mg	0,24	0,44	0,20
MAM 2%			
	Huevo 1	Huevo 2	Huevo 3
Peso de la membrana (mg)	36,1	46,0	71,8
Colorante adsorbido (nmol)	16,6	8,6	15,4
Relación nmol/mg	0,46	0,19	0,22
CCR 2%			
	Huevo 1	Huevo 2	Huevo 3
Peso de la membrana (mg)	70,7	57,9	49,2
Colorante adsorbido (nmol)	11,8	10,7	9,9
Relación nmol/mg	0,17	0,18	0,20

Los resultados obtenidos con ambos métodos se presentan resumidos en la Tabla 4.5 junto con los resultados del SDS y NaOH que se utilizan como controles positivos del método para garantizar su correcta realización.

Tabla 4.5. Resumen de los resultados obtenidos mediante los ensayos HET-CAM y CAM-TBS. También se muestran los resultados para el SDS (1 %) y el NaOH (0,1 N) utilizados como controles positivos en el ensayo.

	HET-CAM		CAM-TBS	
	Media (EE)	Clasificación	Media (EE)	Clasificación
LAM	11,9 (0,4)	Muy irritante	0,29 (0,07)	Muy irritante
MAM	13,9 (1,1)	Muy irritante	0,29 (0,09)	Muy irritante
CCR	12,8 (0,7)	Muy irritante	0,18 (0,01)	Muy irritante
SDS	16,0 (0,3)	Muy irritante	0,14 (0,01)	Irritante
NaOH	17,0 (0,4)	Muy irritante	0,14 (0,02)	Irritante

Los ensayos basados en la utilización de la membrana corioalantoidea se han propuesto como métodos alternativos apropiados para valorar el potencial efecto irritante sobre el ojo de todo tipo de productos, pero especialmente para compuestos que contienen tensioactivos (Rougier y cols., 1995; Steiling y cols., 1999). En concreto, el ensayo HET-CAM se ha utilizado ampliamente con anterioridad al estudio de validación realizado en 1999 por COLIPA (Asociación Europea de Perfumería, Higiene y Cosmética) y se consideraba un método predictivo robusto para valorar la irritación ocular inducida por formulaciones e ingredientes (Steiling y cols., 1999). Sin embargo, en el mismo año se publicó otro estudio donde se encontró una mala correlación entre los resultados del HET-CAM y los ensayos de Draize (Doucet y cols., 1999). Actualmente, se pone en duda la relevancia de ese ensayo para predecir la irritación ocular en humanos, en particular para las sustancias poco irritantes. Asimismo, parece ser que los tensioactivos son ingredientes que pueden afectar a los resultados del HET-CAM de las formulaciones que los contienen (De Silva y cols., 1992). En consecuencia, no resulta sorprendente que los resultados obtenidos mediante los dos métodos basados en la CAM discrepen de los obtenidos mediante el ensayo de hemólisis. Los tres compuestos LAM, MAM y CCR que según el ensayo de hemólisis se clasificaban moderada o ligeramente irritantes según estos métodos se clasifican como muy irritantes. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en un estudio reciente de Debbasch y cols. (2005) donde ensayaron distintas formulaciones comerciales. El ensayo HET-CAM las clasificó como muy irritantes cuando dichas formulaciones eran muy poco irritantes según los datos conocidos en humanos. Por tanto, parece que la CAM es un modelo excesivamente sensible a los tensioactivos y puede sobrestimar su potencial irritante.

4.1.3. Ensayo de irritación ocular de Draize

Se ha evaluado el potencial efecto irritante ocular para los tensioactivos LAM, MAM y CCR mediante el ensayo *in vivo* descrito en la Guía 405 de la OCDE. Los productos se ensayaron al 2 % (p/v) disueltos en solución salina fisiológica. Tras un periodo de exposición de 1 h, se realizó la observación de los ojos para valorar las posibles lesiones en la córnea, la conjuntiva y el iris. Las lesiones se cuantificaron según las puntuaciones establecidas en la Guía 405. A partir de las observaciones realizadas a las 24 h de la exposición a los productos se calculó la puntuación media para los tres tensioactivos según la siguiente expresión:

$$\text{Puntuación media} = (\text{Córnea} \times 5) + (\text{Iris} \times 2) + (\text{Enrojecimiento} \times 2) + (\text{Quemosis} \times 2)$$

Los resultados se presentan en la Tabla 4.6 junto con la clasificación de los tensioactivos en función de su potencial irritante. Según este ensayo, los tres tensioactivos se clasifican como ligeramente irritantes según la clasificación propuesta por Draize y cols. (1944).

Tabla 4.6. Puntuación media obtenida mediante el ensayo *in vivo* descrito en la Guía 405 de la OCDE a las 24 h de la exposición. Los resultados se expresan como la media y el error estándar de tres animales.

Tensioactivo	Puntuación (24 h)	Clasificación
LAM 2 %	20,0 (3,3)	Ligeramente irritante
MAM 2 %	17,4 (2,8)	Ligeramente irritante
CCR 2 %	20,0 (1,0)	Ligeramente irritante

Esa clasificación contrasta con los resultados obtenidos con el ensayo de hemólisis en el cual se establecía una diferencia entre el tensioactivo CCR (ligeramente irritante) y LAM y MAM (ambos clasificados como moderadamente irritantes). Este hecho pone de manifiesto la incapacidad de detectar diferencias entre tensioactivos que poseen un potencial irritante similar. Por tanto, parece que el ensayo *in vitro* es más sensible y puede detectar diferencias sutiles en la capacidad irritante de los compuestos.

Por otro lado, si consideramos los resultados obtenidos con los ensayos basados en la CAM para esos tres tensioactivos clasificados como irritantes (HET-CAM) o muy irritantes (CAM-TBS) confirma la excesiva sensibilidad de ese modelo a los tensioactivos.

En la Guía de la OCDE 405 se establece que, con motivo de clasificación, los compuestos químicos deben evaluarse sin diluir. No obstante, en la mayoría de los casos representa una situación poco realista para valorar el riesgo que suponen los compuestos para los humanos dado que, en general, los compuestos se encuentran diluidos en los productos de consumo. Asimismo, ha sido ampliamente demostrado que la acción irritante de los compuestos depende de su concentración (Kastner, 1992). Por ese motivo, el tensioactivo CCR también se ensayó al 1 % en solución salina fisiológica y en dos animales. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7 junto con los resultados obtenidos con el mismo compuesto al 2 % en dos animales. Se muestra la valoración de las lesiones hasta las 72 h posteriores a la exposición para estudiar la evolución de las mismas.

Tabla 4.7. Valoración de las lesiones en el ojo del conejo tras la exposición a dos concentraciones distintas del tensioactivo CCR (1 y 2 %). Se representan los valores individuales para cada tipo de lesión.

	Animal 1				Animal 2			
CCR 1 %	1h	24 h	48 h	72 h	1h	24 h	48 h	72 h
Córnea	2	0	0	0	0	0	0	0
Iris	1	0	0	0	1	1	0	0
Enrojecimiento	3	1	1	0	3	3	1	0
Quemosis	4	1	0	0	4	2	0	0
CCR 2 %	1h	24 h	48 h	72 h	1h	24 h	48 h	72 h
Córnea	1	0	0	0	1	0	0	0
Iris	1	1	1	0	1	1	1	1
Enrojecimiento	3	3	3	2	3	3	3	3
Quemosis	3	3	2	1	4	3	2	2

Cabe resaltar que la valoración de los daños sobre la córnea se realizó con tinción de fluoresceína, un colorante fluorescente que indica lesión sobre el epitelio corneal. Se aplicaron unas gotas del colorante sobre el ojo y se observó si la córnea quedaba teñida. En este caso, se observó que existían pequeñas zonas de la córnea que estaban teñidas, no obstante, en ninguno de los casos se observó opacidad corneal. El hecho de que, en todos los casos, se revertieran las lesiones sobre la córnea a las 24 h pone de manifiesto la capacidad de autorregeneración del epitelio. Este proceso de autorregeneración suele ocurrir gracias al movimiento de las células de alrededor hasta cubrir la herida o mediante el remplazo de las células dañadas por división celular (Curren y Harbell, 1998).

Un aspecto interesante que muestran estos resultados es que si se calculan las puntuaciones medias para el tensioactivo CCR al 1 y 2 % a 1 h de la aplicación se obtendrían resultados muy similares, a pesar de que las concentraciones del tensioactivo son diferentes. Sin embargo, en función de la concentración ensayada, la evolución de los animales es muy distinta. En el caso de la aplicación del compuesto al 1 %, se observa la reversibilidad total de las lesiones a las 72 h mientras que al 2 % no se observa la recuperación

completa de los animales. Este hecho pone de manifiesto la importancia de valorar la reversibilidad de las lesiones y plantearse si sería apropiado clasificar a dos compuestos dentro de la misma categoría únicamente por su valor máximo de puntuación media. El esquema de clasificación de la Unión Europea solo utiliza las categorías discretas R36 (irritante para los ojos) y R41 (riesgo de lesiones muy graves para los ojos) para definir el nivel de riesgo que representa un determinado material basándose en los resultados del ensayo de Draize (Tabla 4.8). A pesar de la importancia que se le otorga al ensayo de Draize porque permite estudiar la reversibilidad de las lesiones, este sistema de clasificación no lo tiene en cuenta. Por tanto, aquellos que plantean como una limitación de los ensayos *in vitro* el hecho de que no permiten estudiar la evolución de las lesiones deben tener en cuenta que esa limitación también es aplicable al sistema de clasificación actual utilizado por la Unión Europea.

Tabla 4.8. Normas de etiquetado de las sustancias peligrosas en función de su capacidad irritante determinada mediante el ensayo de Draize ocular aceptado por la OCDE (Guía 405). Extraído de la Directiva 2001/59/CE del 6 de agosto de 2001.

Etiqueta	Método	Criterio
R36 Irrita los ojos	Draize ocular	Si se cumple alguno de los siguientes resultados: Opacidad de la córnea ≥ 2 pero <3 Lesión del iris ≥ 1 pero $\leq 1,5$ Enrojecimiento de la conjuntiva $\geq 2,5$ Edema de la conjuntiva (quemosis) ≥ 2
R41 Riesgo de lesiones oculares graves	Draize ocular	La media de los resultados tiene alguno de los resultados: Opacidad de la córnea ≥ 3 Lesión del iris $\geq 1,5$ Si el ensayo se realiza en tres animales, cuando en dos animales o más se cumple alguno de los siguientes resultados: Opacidad de la córnea ≥ 3 Lesión del iris = 2

Además, ese sistema de clasificación sería apropiado para valorar el riesgo que supone la exposición accidental a sustancias cuyo uso no está destinado a entrar en contacto con el ojo o las mucosas. Para las industrias cosmética y farmacéutica que desarrollan productos destinados a aplicarse directamente sobre las estructuras oculares, les resultaría mucho más útil una escala de valoración continua como la de Draize que proporciona mucha más información sobre los riesgos de desencadenar una respuesta irritante que un

sistema de clasificación abreviado. Esa capacidad de predicción de muchos niveles de riesgo es lo que la mayoría de la gente espera de un ensayo *in vitro* de remplazo.

Una de las cuestiones más criticadas de este ensayo es la dificultad que plantea la estandarización real de las condiciones de exposición del ensayo (Secchi y Deligianni, 2006). En la Guía 405 de la OCDE se establece que el volumen que debe aplicarse en el ojo del conejo es de 0,1 ml en el caso de las sustancias líquidas. El volumen máximo que el ojo del conejo puede admitir en ausencia de movimiento ocular es de aproximadamente 0,01 ml. Por tanto, el volumen que se aplica durante el ensayo de Draize es diez veces superior a lo que el ojo del conejo puede admitir, de manera que en la mayoría de los casos parte de ese volumen es expulsado. Una de las consecuencias inevitables de la aplicación de un volumen tan grande es que la cantidad de sustancia que queda en contacto con el ojo depende en gran medida de cada aplicación individual y supone una fuente de variabilidad difícil de controlar. Esa fuente de variabilidad, junto con otras, supone una gran limitación para el desarrollo de métodos *in vitro*. Hasta el momento, la validación de métodos *in vitro* se ha basado fundamentalmente en la utilización de los resultados *in vivo* del ensayo de Draize como un estándar de referencia. La enorme variabilidad que presenta el ensayo *in vivo* hace que su correlación con los resultados *in vitro* sea aún más difícil. Es evidente que no tendría sentido desarrollar un nuevo ensayo *in vivo* más reproducible para utilizarlo como estándar de referencia para el desarrollo posterior de métodos *in vitro*. No obstante, sería interesante refinar las condiciones de exposición del método de Draize ya existente. En ese sentido, la variación del método desarrollada por Procter and Gamble (Bruner y cols., 1992) y denominada ensayo ocular con volúmenes pequeños (LVET, *low volume eye test*) utiliza un volumen más pequeño (0,01 ml) que se administra directamente sobre la córnea. Este método, además de estandarizar mejor las condiciones de exposición, supone una aproximación más realista a lo que sucede en humanos. Además, un estudio ha demostrado que el LVET no sobrestima tanto los efectos de los compuestos como el ensayo de Draize tradicional y, por lo tanto, proporciona una valoración prospectiva más segura del riesgo ocular en humanos (Roggeband y cols., 2000).

Otro de los aspectos criticados del ensayo de Draize es si el modelo animal utilizado, el conejo, permite predecir lo que ocurrirá en el ojo humano. Existe gran cantidad de literatura sobre ese aspecto, no obstante, la relación entre anatomía y fisiología ocular y la sensibilidad a los irritantes entre ambas especies todavía no está bien descrita. Un saco conjuntival de mayor tamaño,

una córnea más fina, una mayor proporción de la córnea respecto al globo ocular, así como otras diferencias detectadas en el ojo del conejo podrían ser la causa de una sensibilidad mayor de este animal a los irritantes (Calabrese, 1983; Swanston, 1985). Sin embargo, otras diferencias como la presencia del tercer párpado y una frecuencia de parpadeo menor indicarían que el conejo es igual de sensible que el humano a los irritantes oculares. Algunas comparaciones realizadas entre casos de exposición accidental en humanos con datos obtenidos con el ensayo *in vivo* han demostrado la existencia de diferencias en la respuesta a los irritantes por parte de humanos y conejos, en algunos casos, el humano ha resultado más sensible a una sustancia y en otros ha ocurrido lo contrario (McDonald y cols., 1987). A pesar de todo esto y basándose en su función reguladora, el ensayo desarrollado por Draize todavía es el método aceptado a nivel internacional para evaluar el potencial irritante de sustancias en el ojo humano. No obstante, las discrepancias observadas hacen necesaria la aceptación de métodos alternativos que lo reemplacen.

4.2. Ensayos para valorar la irritación dérmica

Desde el punto de vista histológico y celular, la piel es un órgano muy complejo y heterogéneo. Los mecanismos a través de los cuales los tensioactivos desencadenan procesos de irritación no se conocen en detalle. Entre los factores que tienen influencia en su potencial irritante se encuentran:

- La acción directa sobre los componentes del estrato córneo (lípidos y proteínas).
- Su interacción con las células epidérmicas vivas alterando su capacidad proliferativa.
- La acción sobre componentes dérmicos induciendo la liberación de mediadores inflamatorios.

Las células en cultivo se han convertido en el centro de las investigaciones relacionadas con la irritación dérmica, especialmente los queratinocitos humanos gracias a su localización epidérmica, su importante papel en el mantenimiento de la integridad del estrato córneo y su capacidad para liberar un amplio abanico de mediadores inflamatorios. Los resultados de estudios previos sugieren que la utilización de queratinocitos humanos normales podría ser útil para predecir la irritación causada por tensioactivos en humanos (Korting y cols., 1994). Además, la respuesta de este tipo de cultivos mostraron una buena correlación con datos de irritación dérmica *in vivo*

(Osborne y Perkins, 1994; Benassi y cols., 1999; Wilhelm y cols., 2001). No obstante, también se propone la utilización de líneas celulares establecidas dado que su manejo resulta más sencillo y ofrecen una mayor reproducibilidad ya que se evitan las diferencias interindividuales entre donantes.

Ni un único modelo ni un único método *in vitro* es capaz de reproducir todos los acontecimientos que tienen lugar en la piel humana, por tanto, sería más útil utilizar una batería de métodos para evaluar el potencial irritante de los nuevos compuestos.

4.2.1. Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad se encuentran entre los métodos *in vitro* utilizados con más frecuencia para predecir la toxicidad de una sustancia sobre los diferentes tejidos. Se han aplicado en distintos ámbitos como el estudio de las lesiones órgano-específicas producidas por las sustancias químicas, la valoración de posibles reacciones de inflamación provocadas por dispositivos médicos, o incluso la valoración del potencial irritante ocular o dérmico de los productos químicos. Según el objetivo de cada estudio, se ha utilizado una amplia variedad de tipos celulares, así como diferentes medidas de viabilidad celular.

Muchos tensioactivos son irritantes primarios, es decir, son capaces de iniciar una reacción de irritación mediante una acción citotóxica directa sobre la piel, sin necesidad de una sensibilización inmunológica previa (hipersensibilidad retardada). Por ese motivo, los ensayos de citotoxicidad sobre células en cultivo se han propuesto para predecir posibles reacciones de irritación dérmica desencadenadas por tensioactivos.

4.2.1.1. Captación de rojo neutro y reducción de la sal de tetrazolio

Para predecir los posibles efectos de algunos de los nuevos tensioactivos derivados de aminoácidos sobre la piel se han utilizado diferentes líneas celulares. En esta parte del estudio solo se han incluido los tensioactivos lineales y los diméricos dado que el resto ya habían sido estudiados en trabajos anteriores. Las dos líneas de fibroblastos murinos de origen embrionario 3T6 y 3T3 se han utilizado en muchos trabajos de investigación como modelo para predecir la toxicidad (Clothier y cols., 1988; Dickson y cols., 1993; Korting y cols., 1994). En especial, los fibroblastos 3T3 se utilizan en un método para valorar la fototoxicidad que ya fue validado por ECVAM en 2002 y posteriormente aceptado por la Comisión Europea (Directiva 2000/33/CE Anexo 5 B41 Fototoxicidad - ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU).

Por otro lado, también se ha considerado interesante utilizar dos líneas de queratinocitos, NCTC 2544 y HaCaT, como un modelo más apropiado para predecir la posible irritación dérmica inducida por los nuevos compuestos. Los queratinocitos NCTC 2544 son de origen humano y su ciclo celular dura aproximadamente 21 horas. Estas células expresan el citocromo P450 por lo que se consideran un buen modelo para estudios de citotoxicidad. La línea HaCaT también son queratinocitos de origen humano que derivan de células de melanoma transformadas espontáneamente. Las características de crecimiento y diferenciación de esta línea celular son muy similares a los queratinocitos normales (Ryle y cols., 1989; Breitskreutz y cols., 1998).

En esta parte del estudio, se han seleccionado dos medidas indirectas de la viabilidad celular como criterios de valoración (*endpoints*) de la citotoxicidad: la captación del colorante rojo neutro y el ensayo de reducción de la sal MTT.

La captación del colorante rojo neutro por parte de la célula depende de la capacidad de dicha célula para mantener los gradientes de pH gracias a la producción continua de ATP. Este colorante, a pH fisiológico, presenta una carga neta próxima a cero, por tanto, es capaz de atravesar las membranas plasmáticas. En el interior de los lisosomas el pH es inferior al citoplasmático y ese gradiente de protones que existe en la membrana lisosomal es dependiente de energía. Una vez que el colorante ha llegado al citoplasma puede atravesar la membrana lisosomal pero como el interior del orgánulo es más ácido, la molécula queda cargada y es incapaz de difundir libremente al citoplasma. La pérdida del gradiente de pH existente entre el citoplasma y los lisosomas, ya sea por la muerte de la célula o por un aumento de la permeabilidad de las membranas, puede provocar la liberación del colorante o evitar su acumulación (Filman y cols., 1975). De ese modo, se considera que la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables.

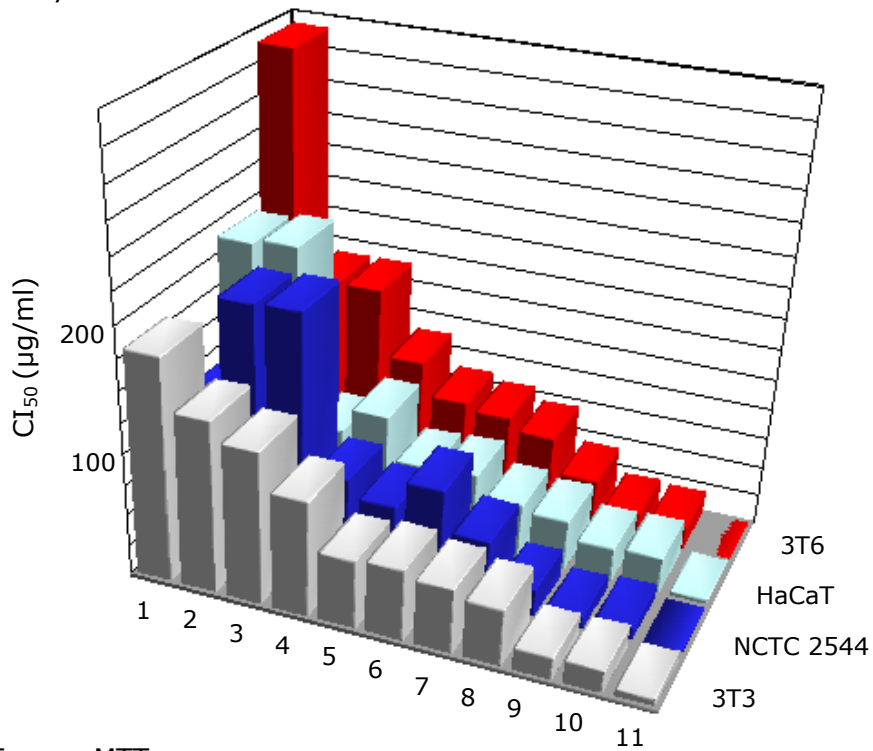
Las sales de tetrazolio, como el MTT, forman un gran grupo de compuestos orgánicos heterocíclicos que, tras su reducción, se transforman en un formazán insoluble de color vivo. Desde su descubrimiento en 1894, esta clase de compuestos se han utilizado ampliamente como indicadores de los sistemas redox y de la viabilidad de sistemas biológicos. No se conoce en detalle el mecanismo celular a través del cual se produce la reducción del MTT aunque se asume que la reacción está catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial (Mosmann, 1983). Sin embargo, en un trabajo posterior se discute el papel exclusivo de la mitocondria en la reducción del

MTT en las células intactas y se propone la participación de otros compartimentos celulares como el compartimento endosomal-lisosomal (Liu y cols., 1997). Como en el caso del ensayo NRU, en condiciones estables y controladas, se considera que la cantidad de MTT reducida es proporcional al número de células viables.

En la Figura 4.1 y en la Tabla 4.9 se muestran los resultados de citotoxicidad de los diferentes tensioactivos estudiados organizados por método y por líneas celulares. En general, se observa que todas las líneas celulares y los dos métodos tienen un comportamiento similar aunque la línea de fibroblastos 3T6 es la que presenta unos valores de CI_{50} superiores y por tanto, parece ser menos sensible al efecto citotóxico de los tensioactivos.

Los tensioactivos derivados de aminoácidos estudiados con un efecto citotóxico menor fueron el $C_3(OA)_2$ de estructura dimérica y el CCR de estructura lineal. En contraste, el resto de tensioactivos diméricos ($C_3(CA)_2$, $C_3(LA)_2$, $C_3(OH)(LA)_2$) tuvieron un efecto citotóxico marcadamente superior. El resto de tensioactivos LAM, MAM y LAE presentaron una citotoxicidad intermedia entre esos dos grupos. A partir de esos resultados, es difícil establecer una relación clara entre el efecto citotóxico de los compuestos y su estructura. Se puede intuir que los tensioactivos con estructura dimérica (si no tenemos en cuenta el $C_3(OA)_2$) parecen tener un mayor efecto citotóxico que los tensioactivos de estructura lineal. Sin embargo, es difícil de explicar porque el tensioactivo dimérico $C_3(OA)_2$ tiene un comportamiento tan diferente al resto de miembros de su familia. La única diferencia estructural que presenta respecto a los otros es la longitud de sus cadenas hidrocarbonadas (C_8). Sin embargo, es interesante destacar que esa diferencia tan marcada en la citotoxicidad no se observa en las estructuras lineales de diferente longitud de cadena poniendo de manifiesto nuevamente la dificultad de establecer una relación clara entre la estructura química de los compuestos y sus efectos sobre los sistemas biológicos.

(A) Ensayo NRU



(B) Ensayo MTT

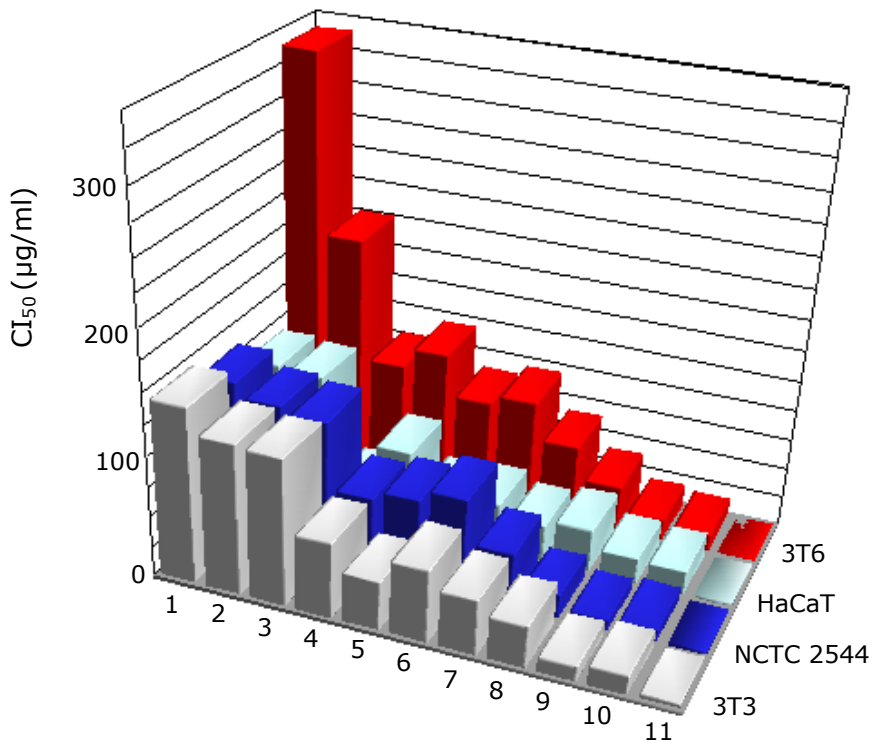


Figura 4.1. Resultados de citotoxicidad en las cuatro líneas celulares estudiadas con los dos ensayos de viabilidad. Se muestran los valores de CI₅₀ para los siguientes tensioactivos: C₃(OA)₂ (1), CCR (2), Tegobetaína (3), LAM (4), LAE (5), MAM (6), SDS (7), C₃(CA)₂ (8), C₃(LA)₂ (9), C₃(OH)(LA)₂ (10) y HTAB (11).

	3T6		HaCaT		NCTC		3T3	
	NRU	MTT	NRU	MTT	NRU	MTT	NRU	MTT
C₃(OA)₂	341,8 (16,6)	340,3 (30,8)	215,6 (7,9)	117,5 (19,8)	155,2 (13,2)	133,8 (20,9)	182,3 (14,3)	145,0 (14,7)
CCR	164,8 (21,2)	200,4 (10,8)	219,5 (21,3)	114,8 (17,5)	201,5 (11,7)	122,6 (4,7)	141,4 (18,7)	124,3 (9,9)
Tegobetaina	165,7 (19,8)	102,6 (4,0)	76,7 (4,5)	28,5 (5,2)	203,2 (21,0)	117,9 (12,7)	125,7 (13,2)	121,9 (8,0)
LAM	112,0 (2,0)	119,6 (2,6)	97,0 (9,3)	67,2 (5,4)	77,7 (6,32)	63,4 (12,6)	95,6 (4,3)	62,9 (5,4)
LAE	85,3 (3,8)	86,5 (5,1)	61,9 (0,7)	37,6 (3,1)	64 (8,6)	70,5 (8,4)	56,7 (1,6)	41,2 (2,9)
MAM	80,6 (15,4)	94,5 (16,6)	64,1 (7,6)	40,3 (6,3)	86,7 (2,7)	80,4 (3,3)	59,2 (1,6)	60,6 (5,9)
SDS	71,1 (5,1)	63,9 (4,6)	47,6 (5,6)	31,4 (2,9)	53,5 (0,7)	44,7 (1,7)	53,5 (3,3)	46,3 (1,7)
C₃(CA)₂	41,9 (0,6)	37,8 (4,2)	42,8 (3,7)	36,5 (1,6)	22,8 (4,7)	19,8 (1,0)	47,2 (3,0)	35,5 (1,5)
C₃(LA)₂	21,9 (1,8)	18,2 (2,0)	28,8 (30,3)	21,4 (4,2)	10,1 (0,5)	9,5 (1,1)	18,5 (2,5)	13,1 (1,4)
C₃(OH)(LA)₂	19,6 (0,3)	14,5 (1,0)	30,3 (1,8)	20,2 (3,0)	11,8 (1,3)	11,1 (0,3)	18,8 (1,0)	16,0 (1,9)
HTAB	0,5 (0,2)	0,8 (0,1)	4,5 (0,1)	1,8 (0,4)	2,1 (0,2)	2,2 (0,2)	6,9 (1,4)	4,3 (0,8)

Tabla 4.9. Valores CI_{50} calculados por los métodos NRU y MTT para los tensioactivos estudiados en las cuatro líneas celulares (n=3, media y error estándar)

Entre las cuestiones más controvertidas de los métodos *in vitro* se encuentra la elección de un modelo celular y de un criterio de valoración que sea apropiado. Con el objetivo de conocer si los resultados de CI_{50} calculados utilizando las diferentes líneas celulares y los dos métodos de citotoxicidad son similares entre sí, se han comparado mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La matriz de coeficientes de correlación se muestra en la Tabla 4.10 donde se observa que todas las correlaciones son significativas.

Tabla 4.10. Matriz de coeficientes de correlación (r) entre los valores CI_{50} calculados mediante los ensayos NRU y MTT en las cuatro líneas celulares estudiadas. Todas las correlaciones son significativas (Coeficiente de correlación de Pearson, n=11, * p < 0,05; ** p < 0,01).

	3T3 _{NRU}						
3T6 _{NRU}	0,957**	3T6 _{NRU}					
NCTC _{NRU}	0,857**	0,757**	NCTC _{NRU}				
HaCaT _{NRU}	0,916**	0,871**	0,749**	HaCaT _{NRU}			
3T3 _{MTT}	0,982**	0,925**	0,884**	0,881**	3T3 _{MTT}		
3T6 _{MTT}	0,935**	0,971**	0,717*	0,937**	0,887**	3T6 _{MTT}	
NCTC _{MTT}	0,808**	0,833**	0,889**	0,738**	0,791**	0,819**	NCTC _{MTT}
HaCaT _{MTT}	0,871**	0,831**	0,654*	0,981**	0,809**	0,923**	0,688*

A pesar de que los resultados de citotoxicidad parecen similares, las distintas líneas celulares presentan una sensibilidad ligeramente distinta a los tensioactivos, tal y como se muestra en la Figura 4.2. Por tanto, la utilización de cuatro líneas celulares diferentes puede proporcionarnos más información de los efectos citotóxicos de los compuestos y permitirnos una clasificación de los tensioactivos más representativa. Para establecer una clasificación de los compuestos, se han utilizado los tres tensioactivos comerciales como referencia: la Tegobetaína como tensioactivo poco irritante, el SDS como irritante y el HTAB como muy irritante (Nicander y cols., 2003).

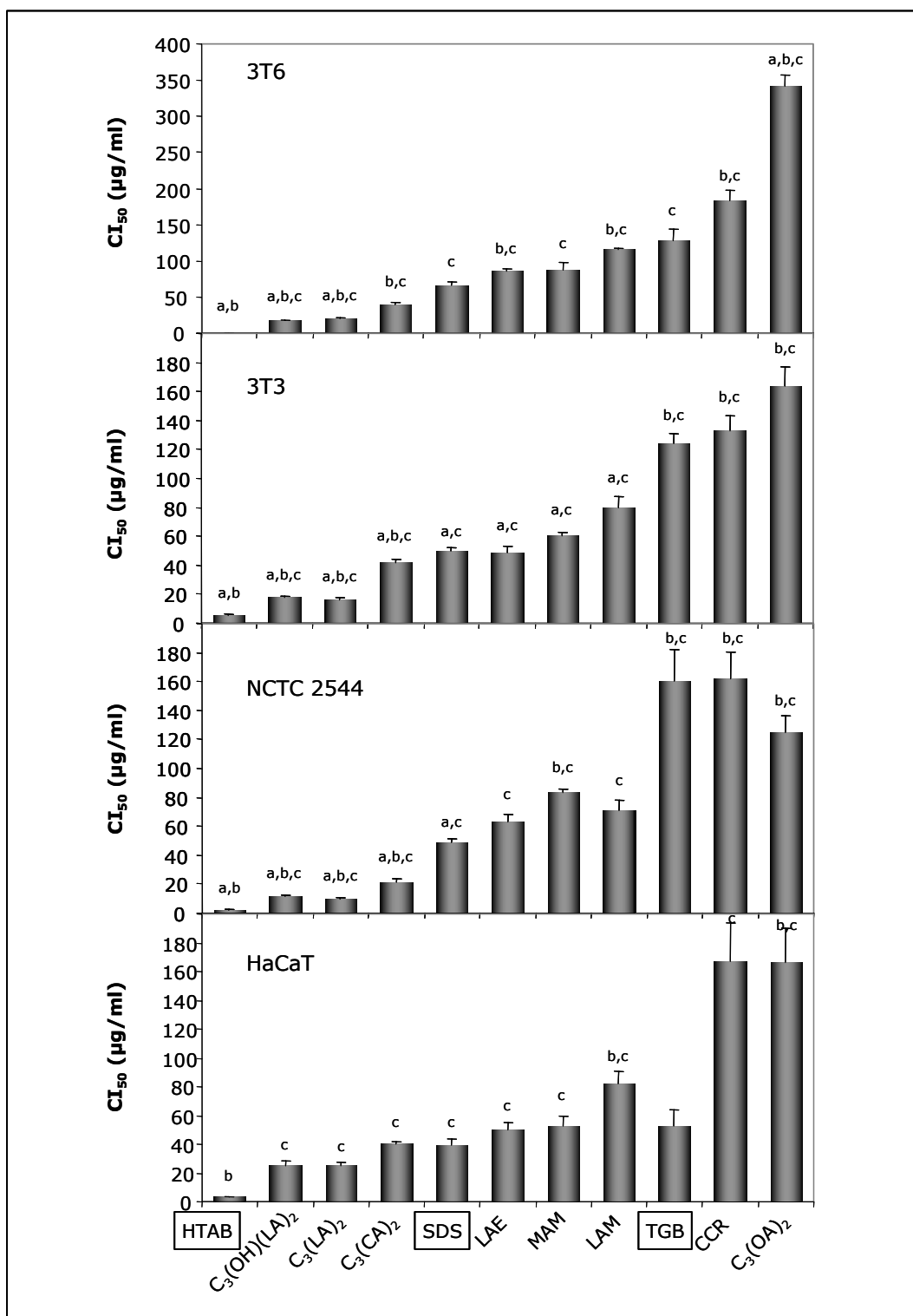


Figura 4.2. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de los diferentes tensioactivos considerando los resultados obtenidos con los ensayos NRU y MTT conjuntamente para cada una de las cuatro líneas celulares utilizadas (^adiferencias significativas respecto a la TGB, ^bdiferencias significativas respecto al SDS, ^cdiferencias significativas respecto al HTAB; análisis *posthoc* Games-Howell, $p < 0,05$).

Asimismo, se han agrupado los resultados de citotoxicidad de las cuatro líneas celulares en función del método (Figura 4.3). Se observa que los ensayos NRU y MTT no son igual de sensibles. Según el ensayo NRU los tensioactivos de referencia quedan bien diferenciados entre ellos en función de su citotoxicidad y nos permiten establecer distintas categorías. Los compuestos $C_3(OA)_2$, CCR y LAM quedarían dentro del grupo de la Tegobetaína; MAM y LAE serían comparables al SDS; y los tensioactivos diméricos $C_3(CA)_2$, $C_3(LA)_2$ y $C_3(OH)(LA)_2$ se situarían entre el SDS y el HTAB. En cambio, con el ensayo MTT la Tegobetaína queda dentro del grupo del SDS y los tensioactivos $C_3(OA)_2$ y CCR se considerarían menos citotóxicos que la Tegobetaína. Este hecho pone de manifiesto que diferentes criterios de valoración de citotoxicidad no necesariamente proporcionan el mismo tipo de información y, por tanto, no siempre son comparables.

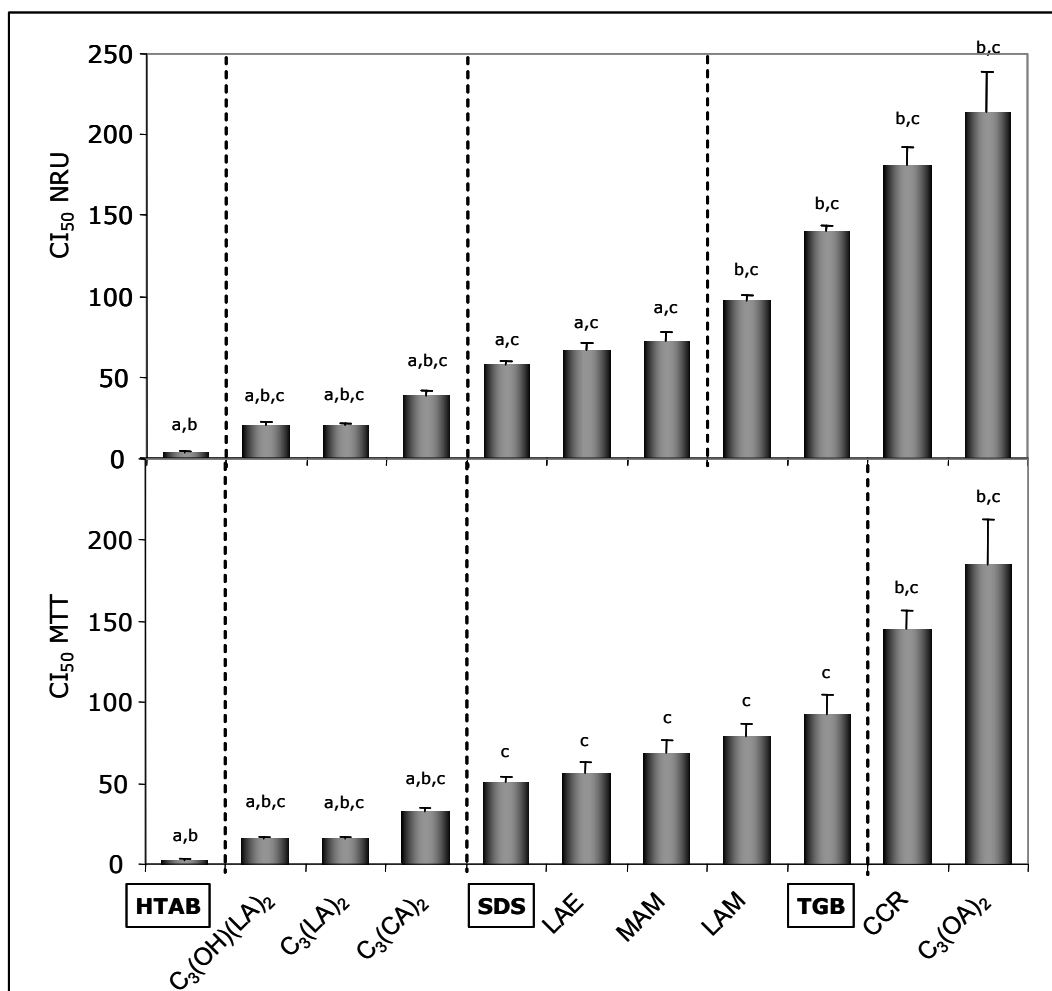


Figura 4.3. Valores medios de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) según los ensayos de NRU y MTT en las cuatro líneas celulares. Los tensioactivos TGB, SDS y HTAB se han utilizado como compuestos de referencia a efectos comparativos (^adiferencias significativas respecto a la TGB, ^bdiferencias significativas respecto al SDS, ^cdiferencias significativas respecto al HTAB; análisis *posthoc* Games-Howell, $p < 0,05$).

Para finalizar, se ha juzgado interesante considerar también de forma conjunta los resultados obtenidos mediante los dos ensayos de citotoxicidad. De ese modo, se combina la información obtenida mediante dos métodos que aportan información ligeramente distinta que puede complementarse. Los resultados se muestran en la Figura 4.4.

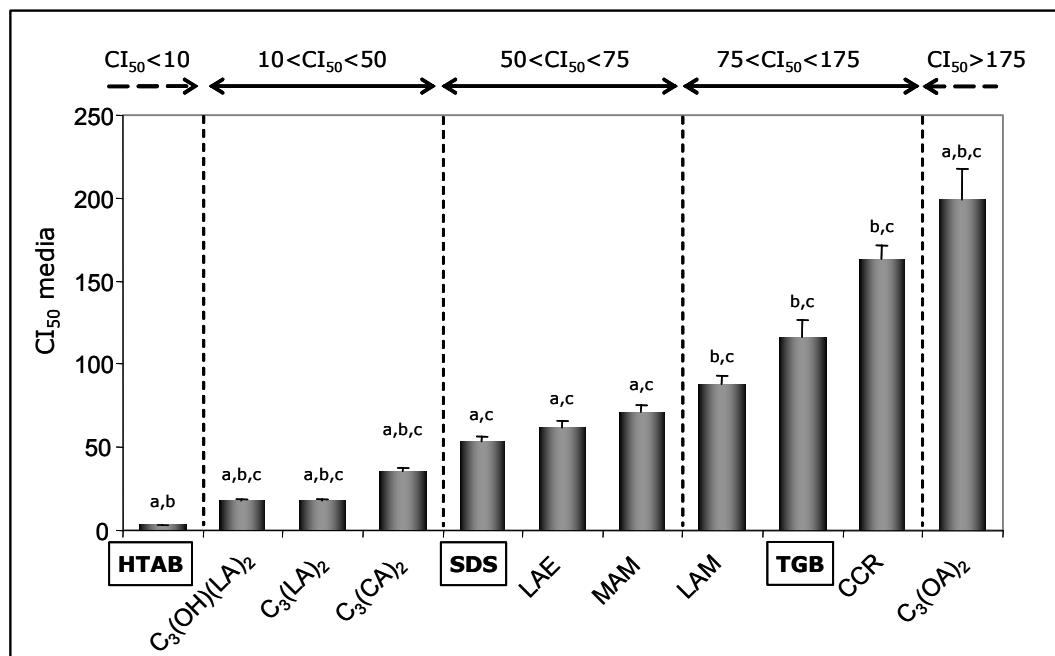


Figura 4.4. Valores medios de CI₅₀ (µg/ml) considerando conjuntamente los resultados obtenidos con los ensayos NRU y MTT en las cuatro líneas celulares (^adiferencias significativas respecto a la TGB, ^bdiferencias significativas respecto al SDS, ^cdiferencias significativas respecto al HTAB; análisis *posthoc* Games-Howell, $p < 0,05$).

Al considerar todos los resultados en conjunto, la clasificación en grupos de los tensioactivos es ligeramente distinta a la obtenida mediante los ensayos NRU y MTT de forma independiente. Nos permite diferenciar claramente entre los tres tensioactivos comerciales utilizados como referencia y agrupar los nuevos compuestos en función de su valor CI₅₀ de manera que nos quedan establecidas cinco categorías.

No obstante, la utilización de cuatro líneas celulares no resultaría práctica ya que generaría un gran volumen de trabajo. En consecuencia, lo ideal es seleccionar una línea que nos proporcione unos valores similares a los obtenidos con todas las líneas. En ese sentido, los fibroblastos 3T3 son los que muestran unos resultados más parecidos a los valores medios con las cuatro líneas celulares y, por tanto, podría ser la línea celular candidata para utilizarse como modelo para valorar la citotoxicidad de los tensioactivos.

Propuesta de un modelo de predicción

Un método alternativo se ha definido como la combinación de un modelo de ensayo experimental y un modelo de predicción (Archer y cols., 2001). El modelo de ensayo es la herramienta que permite generar datos fisicoquímicos o *in vitro* de los productos químicos de interés, mientras que el modelo de predicción es un algoritmo inequívoco que permite transformar esos datos en predicciones sobre un determinado criterio farmacotoxicológico aplicable a animales o humanos. Por tanto, para asegurar la validez de un método alternativo, el desarrollo de un modelo de predicción es tan importante como el desarrollo de un protocolo experimental adecuado (Worth y Balls, 2001; Hartung y cols., 2004).

Hasta el momento, los ensayos *in vitro* comentados presentaban un modelo de predicción ya definido. En el ensayo de hemólisis, el índice L/D permite clasificar los tensioactivos en diferentes categorías y los ensayos basados en la CAM utilizan un índice de irritación ocular calculado a partir de los resultados obtenidos durante el ensayo para realizar dicha clasificación. En los ensayos de citotoxicidad todavía no hay definido un modelo de predicción.

En el caso de nuestro estudio, la línea celular de fibroblastos 3T3 nos ha resultado la candidata más idónea para la valoración del potencial irritante dérmico de tensioactivos. Los tensioactivos de referencia utilizados HTAB, SDS y Tegobetaina, nos han permitido establecer tres categorías (Figura 4.5) en base a los valores de CI_{50} (NRU y MTT):

- A. $CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$: $C_3(\text{CA})_2$, $C_3(\text{LA})_2$ y $C_3(\text{OH})(\text{LA})_2$
- B. $50 \mu\text{g} < CI_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$: LAM, MAM y LAE
- C. $CI_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$: CCR y $C_3(\text{OA})_2$

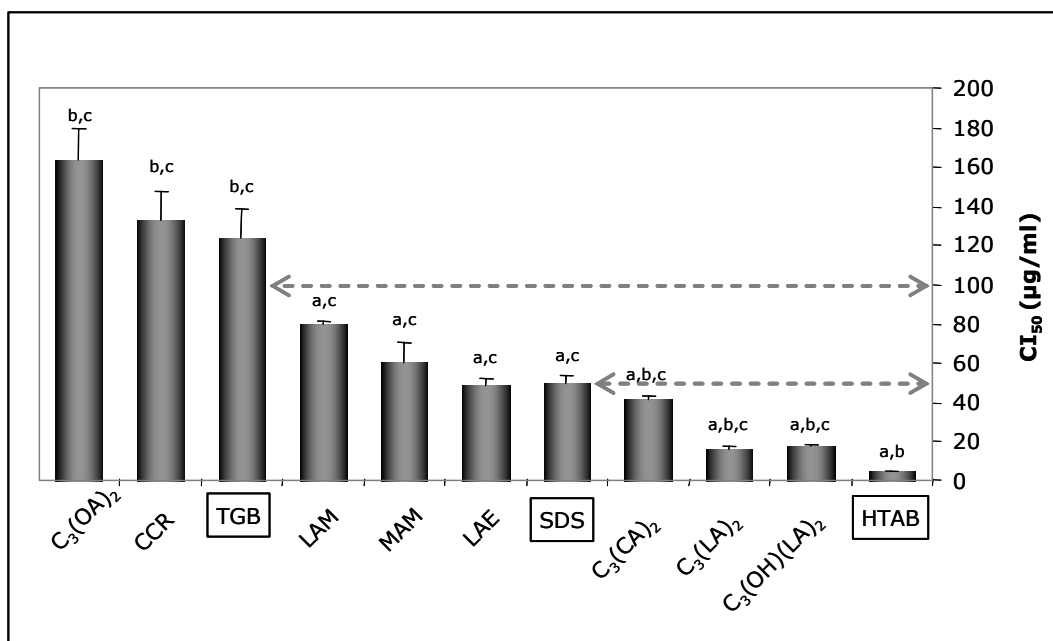


Figura 4.5. Valores de CI₅₀ (µg/ml) de los diferentes tensioactivos considerando los resultados obtenidos con los ensayos NRU y MTT conjuntamente para la línea de fibroblastos 3T3 (^adiferencias significativas respecto a la TGB, ^bdiferencias significativas respecto al SDS, ^cdiferencias significativas respecto al HTAB; análisis *posthoc* Games-Howell, $p < 0,05$).

Teniendo en cuenta dichos resultados, podríamos establecer que aquellos tensioactivos dentro de la categoría A tendrían un potencial irritante elevado; los de la categoría B, un potencial irritante medio; y los de la categoría C, un potencial irritante bajo. Este método de clasificación es similar a la propuesta de Thornback-LeCoq y cols. (1997) en un estudio donde estudiaron la correlación entre la irritación dérmica y la citotoxicidad. En dicho estudio encontraron una buena correlación entre el potencial irritante dérmico ensayado en cobaya y los resultados de citotoxicidad en fibroblastos utilizando los métodos MTT y liberación del rojo neutro (NRR). Según sus resultados, aquellos productos con un valor CI₅₀ superior a 125 mg/ml en el caso del MTT tendrían una probabilidad baja de ser irritantes.

Nuestro sistema de clasificación, que podría aplicarse específicamente a tensioactivos catiónicos, debería ser sometido a validación. Naturalmente, sería necesario realizar un estudio retrospectivo con los datos *in vivo* disponibles actualmente y nuevos datos *in vitro* generados en las mismas condiciones de ensayo. No obstante, la industria cosmética puede considerarlo interesante como una herramienta de preclasificación de los compuestos que permita seleccionar aquellos que se ensayarán, posteriormente, en otros sistemas *in vitro* que supongan una aproximación más fisiológica a la piel.

Idoneidad del modelo para valorar la irritación dérmica

La utilización de cultivos celulares en monocapa para la evaluación *in vitro* del potencial irritante es apropiada especialmente para sustancias solubles en soluciones acuosas. Muchos ingredientes lipófilos o productos acabados como cremas, lociones o polvos no pueden evaluarse de una manera tan eficiente en estos sistemas de cultivo celular sumergido. Sin embargo, se ha propuesto la utilización del método de liberación del colorante rojo neutro (NRR) como una posible alternativa para probar productos lipófilos en cultivos en monocapa tal y como se describe en el protocolo INVITTOX núm. 54. Una de las limitaciones en la aplicabilidad de este método es la dificultad de eliminar el producto del pocillo una vez aplicado.

Además, los sistemas de cultivo en monocapa de células de origen dérmico no conservan las funciones de diferenciación ni las propiedades de barrera de los tejidos dérmicos estratificados y, por tanto, no representan de forma precisa la fisiología de la piel *in vivo*. La función de barrera que ejerce el estrato córneo es esencial en un modelo que esté destinado a predecir el potencial irritante de las sustancias *in vivo*. Este hecho hace que el cultivo en monocapa sea demasiado sensible a las sustancias. A pesar de esta limitación, este modelo puede ser útil para demostrar la falta de potencial irritante de productos no citotóxicos que sean solubles en soluciones acuosas. También puede ser útil para el cribado sistemático de nuevas moléculas que permita seleccionar los mejores candidatos para su evaluación en un sistema más apropiado.

Se han desarrollado modelos tridimensionales de piel reconstituida (EpiDerm™, EPISKIN™ y PREDISKIN™) los cuales presentan estrato córneo y forman una superficie en contacto con el aire que permite la aplicación de productos insolubles y sólidos. No obstante, este tipo de construcciones artificiales presentan una función de barrera deficiente en comparación con la epidermis *in vivo* (Van de Sandt y cols., 1999; Gibbs y cols., 2002). Estos equivalentes de piel presentan una tasa de penetración a las sustancias a través del estrato córneo que es entre 10 y 30 superior que en la piel normal (Ponec, 1992; Perkins y cols., 1999). A pesar de que todavía no se ha demostrado su idoneidad como modelos para predecir la irritación dérmica, sí han sido validados como modelos para valorar la corrosión. En concreto, los modelos EPISKIN™ y EpiDerm™ ya han sido aceptados por la autoridades competentes en la UE para valorar la corrosión dérmica y están incluidos en la Guía de la OCDE núm. 431.

Otra de las limitaciones de la utilización de este tipo de modelos es su elevado coste económico. Puede llegar a resultar hasta 50 veces más caro que la realización de un ensayo de citotoxicidad en cultivo en monocapa.

La valoración de la citotoxicidad aplicada a la irritación ocular

Los ensayos de citotoxicidad también se han propuesto para valorar la irritación ocular (Harbell y cols., 1997). Los ensayos se basan en la observación de que algunas sustancias que causan lesiones oculares provocan citotoxicidad sobre diferentes tipos celulares como el epitelio y endotelio corneales, y el epitelio y endotelio conjuntivales. La toxicidad del compuesto puede manifestarse a causa de esa muerte celular (pérdida del epitelio) o por la liberación de mediadores inflamatorios que son liberados por las células dañadas. Se cree que los compuestos con actividad superficial como los tensioactivos provocan citotoxicidad *in vivo* por su capacidad para romper las membranas celulares.

Dado que el ensayo de hemólisis parece ser bastante apropiado para valorar el efecto irritante de tensioactivos, se ha considerado interesante realizar correlaciones entre los valores de citotoxicidad (CI_{50}) de los compuestos y los valores CH_{50} , ID y cociente L/D calculados mediante el ensayo de hemólisis (Tabla 4.11). En general, la correlación entre los resultados de citotoxicidad y la CH_{50} presentan una buena correlación, excepto en el caso de los queratinocitos NCTC 2544. De estos resultados, el dato más interesante que cabe resaltar es la buena correlación que presentan el cociente L/D con los resultados de citotoxicidad en la línea de queratinocitos HaCaT ($r = 0,909$). Este hecho podría indicar que esta línea celular sería apropiada para valorar el potencial efecto irritante ocular de tensioactivos como ya han propuesto otros autores (Faller y Bracher, 1999).

Tabla 4.11. Coeficientes de correlación (r) entre los valores CI_{50} calculados mediante los ensayos NRU y MTT en las cuatro líneas celulares estudiadas y los valores CH_{50} , ID y L/D obtenidos mediante el ensayo de hemólisis (Coeficiente de correlación de Pearson, $n=11$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

	CH_{50}	ID	L/D
3T3	0,711*	-0,328	0,647*
3T6	0,799*	-0,330	0,713*
NCTC 2544	0,624	-0,311	0,638*
HaCaT	0,764*	-0,388	0,909**

4.2.1.2. Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa y determinación del contenido total de proteína

La liberación de enzimas citoplasmáticas puede ser una medida de la integridad de la membrana y, por tanto, otra medida indirecta de viabilidad celular. La enzima lactato deshidrogenasa se libera al medio de cultivo y puede detectarse cuantitativamente mediante un sustrato cromogénico (Harbell y cols., 1997). Dado que es necesaria la liberación pasiva de la enzima a través de las membranas dañadas, este ensayo detecta células en las últimas etapas de muerte celular.

Por otro lado, la determinación del contenido total de proteína en una población de células es una medida del número relativo de células. Para valorar la toxicidad de un compuesto, se basa en el crecimiento relativo de los controles frente a las células tratadas (Harbell y cols., 1997).

Ambos ensayos se realizaron únicamente sobre la línea de queratinocitos NCTC 2544 y se seleccionaron las estructuras lineales: LAM, MAM y CCR y los tres tensioactivos de referencia SDS, HTAB y Tegobetaína. Estos ensayos se realizaron para controlar la citotoxicidad en los estudios de liberación y producción de la citocina proinflamatoria IL-1 α cuyos resultados se presentarán y discutirán más adelante. Sin embargo, debido a su utilidad como marcadores de citotoxicidad se ha considerado interesante comentar también los resultados de forma independiente.

La liberación de la LDH se valoró en los sobrenadantes de los pocillos tras el tratamiento de las células con concentraciones crecientes de tensioactivos. De forma paralela, se lisaron las células que quedaron adheridas al pocillo y, a partir de ese lisado se determinó la cantidad total de proteína soluble. En la Figura 4.6 se muestran los resultados representados en el mismo gráfico de esos dos marcadores y para cada uno de los tensioactivos ensayados. Se observa una relación concentración-respuesta para todos los tensioactivos, tanto para la liberación de LDH como para la cantidad de proteína presente. Además, se observa que a medida que aumenta la presencia de LDH en el sobrenadante, se produce una disminución de la cantidad de proteína en el lisado celular. Este hecho podría ser indicativo de que ambos métodos nos ofrecen una sensibilidad similar a pesar de que la liberación de LDH valora la integridad de la membrana y el contenido de proteína es una medida indirecta de proliferación. La similitud en los resultados podría explicarse por el hecho de que ambos métodos detectan células en las fases finales de la muerte celular.

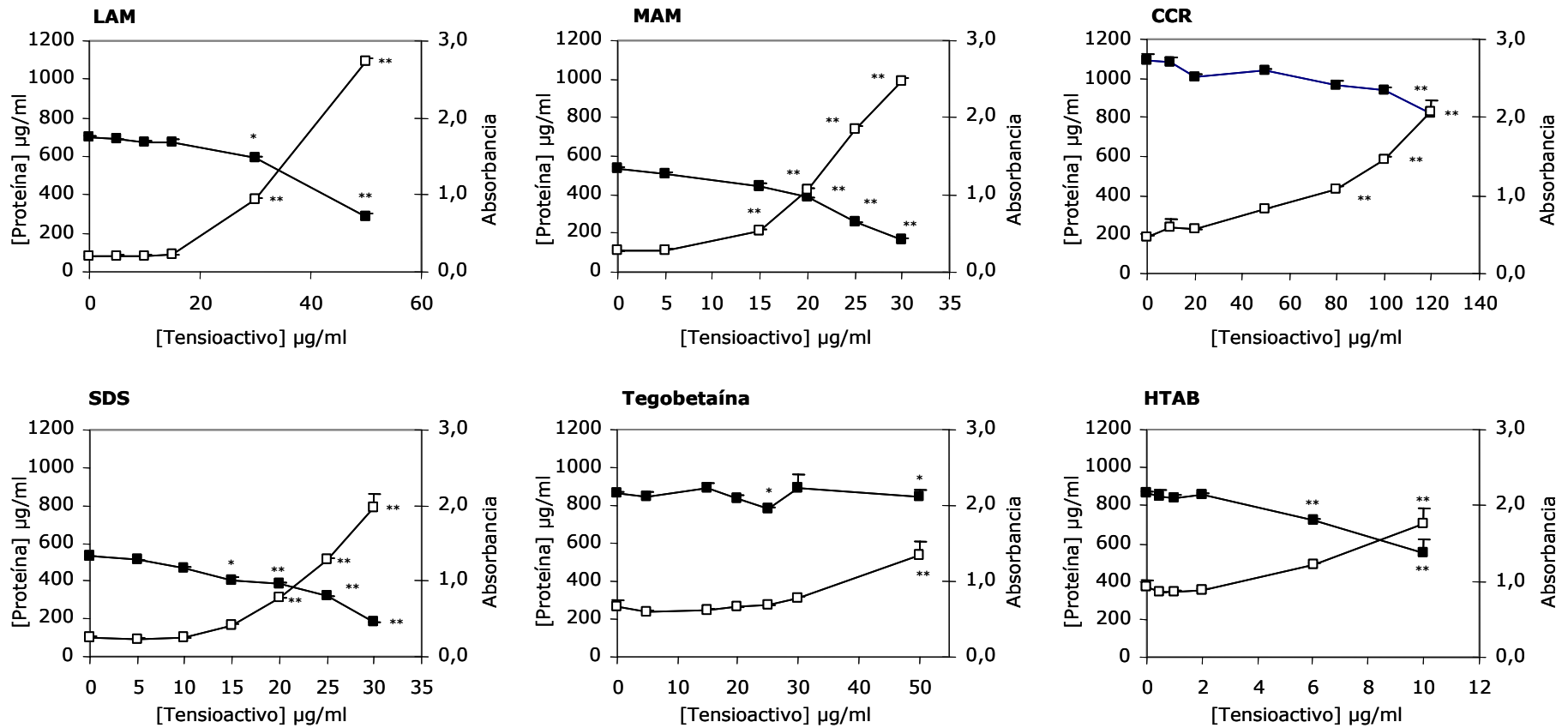


Figura 4.6. Liberación de LDH al medio (—□—) y determinación de la cantidad total de proteína (—■—) tras el tratamiento con los tensioactivos. (n=3; *p<0,05, **p<0,01 diferencias estadísticamente significativas respecto al control; análisis *post-hoc* Dunnett).

4.2.2. Liberación y producción de la citocina proinflamatoria IL-1 α en la línea celular NCTC 2544

Las citocinas desempeñan un papel muy importante en los procesos inflamatorios que tienen lugar en la piel (Steinhoff y Luger, 2004). Diversos estudios han demostrado que tras la exposición de la piel al SDS, el estrato córneo queda dañado (Fartasch, 1997; Jiang y cols., 2003; Ribaud y cols., 1994) y el tensioactivo ejerce un efecto citotóxico directo sobre los queratinocitos. Como respuesta a esos cambios, la citocina IL-1 α , que se sintetiza en los queratinocitos de forma constitutiva, se libera iniciando la cascada del proceso inflamatorio. La IL-1 α estimula a los queratinocitos y los fibroblastos a liberar otras citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Corsini y Galli, 2000; Welss y cols., 2004; Boxman y cols., 1996). La inducción de dicha cascada de citocinas provoca una reacción inflamatoria con vasodilatación de la dermis y la infiltración de células hacia la epidermis (Corsini y Galli, 2000; Elias y cols., 1999; Levin y Maibach, 2002). Por ese motivo, se considera la IL-1 α un marcador candidato para predecir la irritación dérmica inducida por los compuestos químicos.

Los queratinocitos, junto con los fibroblastos, las células endoteliales y las células del sistema inmunitario, desempeñan un papel decisivo en la iniciación, modulación y regulación de los procesos inflamatorios. Se ha estudiado la liberación y producción de la citocina IL-1 α en la línea de queratinocitos humanos NCTC 2544 tras su exposición a diferentes concentraciones de tensioactivo. Los tensioactivos utilizados en esta parte del estudio han sido tres tensioactivos derivados de aminoácidos de estructura lineal: LAM, MAM y CCR; y los tres tensioactivos comerciales: Tegobetaína, SDS y HTAB. Las concentraciones para cada uno de los tensioactivos se seleccionaron a partir de los valores de citotoxicidad en esa línea celular. En general, las concentraciones máximas ensayadas se encuentran próximas a sus CI₅₀ según los ensayos NRU y MTT.

En las Figuras 4.7 y 4.8 se representan las concentraciones de IL-1 α detectadas en el medio extracelular (IL-1 α EX), las concentraciones de interleucina en el lisado de las células para valorar la cantidad de interleucina intracelular (IL-1 α IN) y la suma de ambas concentraciones. Para todos los tensioactivos estudiados se observa una relación concentración-respuesta. Asimismo, se observa un aumento de la cantidad total de citocina respecto a los valores control, hecho que implica la capacidad de los tensioactivos para

inducir la neosíntesis de la citocina. Estos resultados coinciden con estudios publicados recientemente por otros grupos de investigación (Coquette y cols., 2003; Törmä y cols., 2006) y con un estudio también reciente publicado por nuestro grupo de investigación (Sánchez y cols., 2006).

Asimismo, es interesante destacar que, en todos los casos, se observan aumentos de IL-1 α IN estadísticamente significativos a concentraciones de tensioactivo en las que la liberación de interleucina al medio extracelular todavía no es significativa. Por tanto, la valoración de la cantidad de citocina intracelular es un marcador más sensible que su detección en el medio extracelular.

A pesar de utilizar una línea establecida de células, se observaron diferencias en los niveles de basales de la citocina, que oscilaban entre 50 y 500 pg/ml. Es posible que las diferencias en las concentraciones de citocina en los lisados de las células se debieran a la presencia de un número distinto de células. Por ese motivo, además de valorar las concentraciones de IL-1 α , también se determinó la cantidad total de proteína como un indicador indirecto del número de células presentes. Las concentraciones de citocina intracelular se estandarizaron a partir de las concentraciones de proteína. A efectos comparativos, se calcularon las concentraciones efectivas 50 (CE₅₀, la concentración de tensioactivo capaz de incrementar en un 50 % la cantidad de interleucina intracelular) para cada uno de los tensioactivos a partir de las concentraciones de citocina intracelular estandarizadas (Tabla 4.12, Ensayo 1).

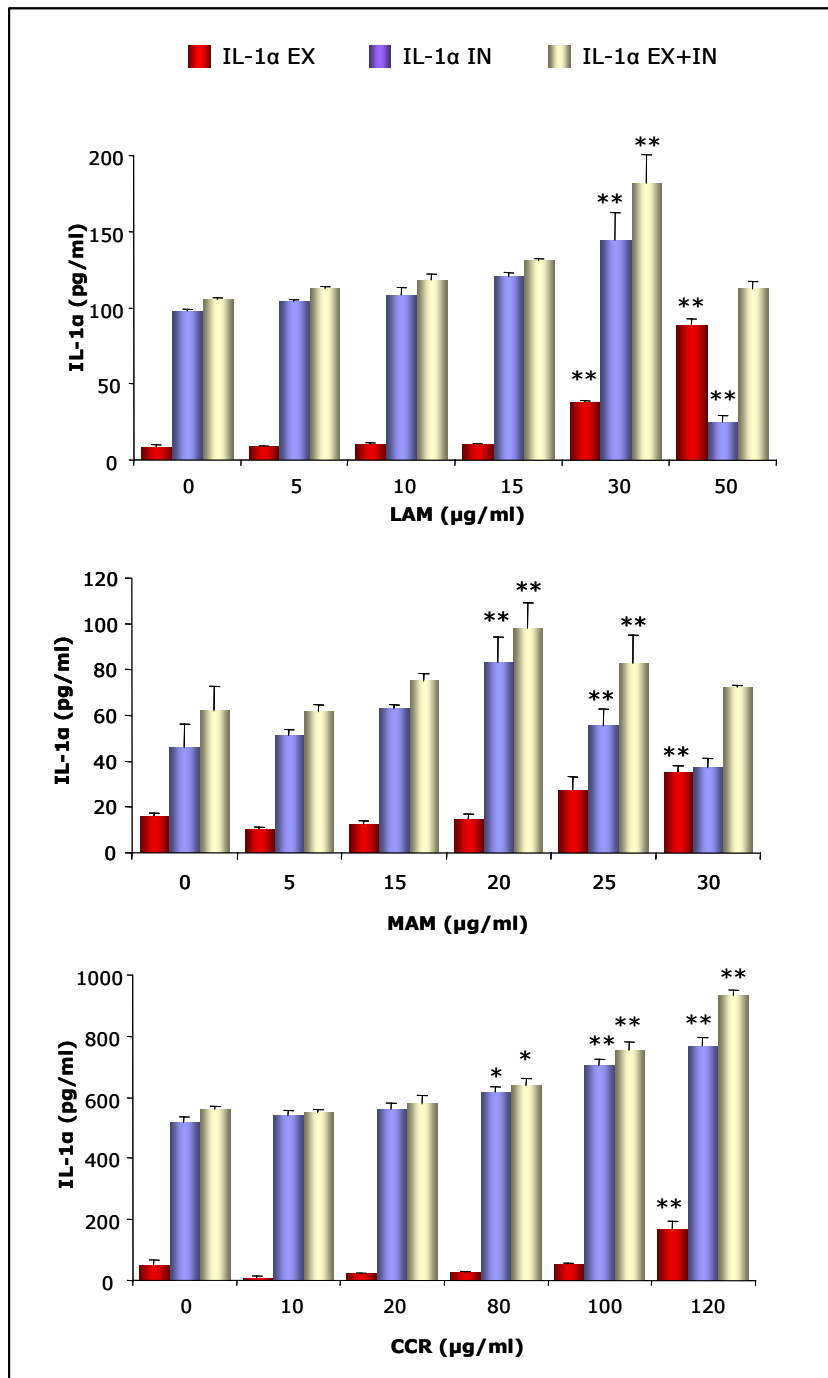


Figura 4.7. Liberación y producción de la citocina IL-1α tras el tratamiento con los tensioactivos derivados de aminoácidos LAM, MAM y CCR. Se representan la media y el error estándar (n=3; *p<0,05, **p<0,01 diferencias estadísticamente significativas respecto al control; análisis *post-hoc* Dunnett).

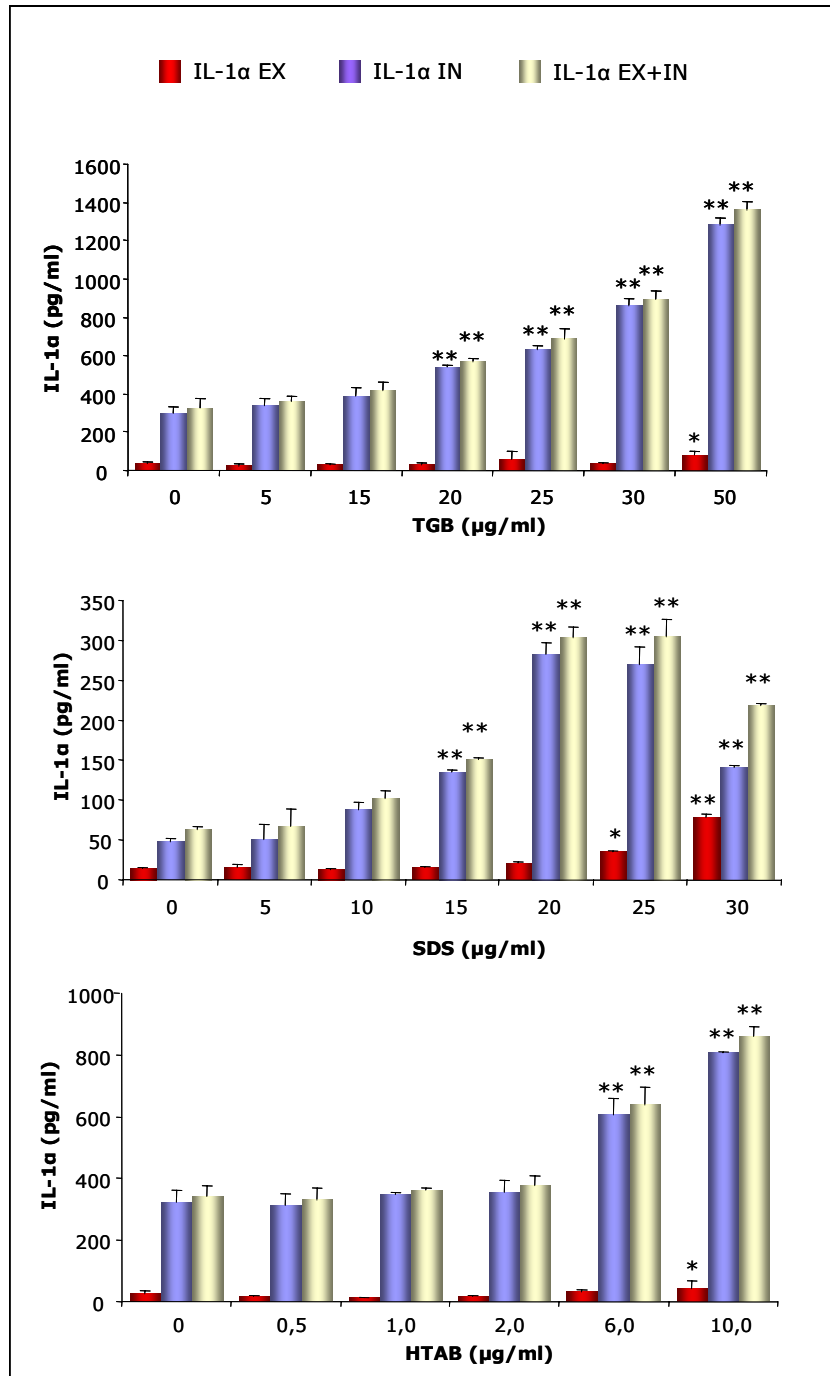


Figura 4.8. Liberación y producción de la citocina IL-1α tras el tratamiento con los tensioactivos comerciales Tegobetaína, SDS y HTAB. Se representan la media y el error estándar (n=3; *p<0,05, **p<0,01 diferencias estadísticamente significativas respecto al control, análisis *post-hoc* Dunnett).

Los valores CE_{50} nos permiten establecer la siguiente clasificación de los productos en función de su capacidad para estimular la neosíntesis de la citocina: HTAB > SDS > Tegobetaína > LAM ~ MAM > CCR. Los tensioactivos derivados de aminoácidos presentan una capacidad menor de estimular la neosíntesis de la citocina. Teniendo en cuenta el papel desempeñado por esta citocina en las reacciones inflamatorias, este hecho podría implicar una menor capacidad de esos tensioactivos para desencadenar un proceso de irritación. Asimismo, esta técnica indica que el tensioactivo CCR, que es una mezcla compuesta fundamentalmente por LAM y MAM, tendría un menor potencial para desencadenar una respuesta inflamatoria que los compuestos puros. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en el resto de ensayos *in vitro* realizados en este trabajo. Además, también coinciden con resultados publicados previamente por nuestro grupo (Mitjans y cols., 2003) y por otros (Benassi y cols., 2003), en los cuales las mezclas de tensioactivos redujeron el potencial irritante respecto a sus componentes puros. Este hecho es muy interesante dado que en la mayoría de las aplicaciones se utilizan mezclas de tensioactivos y no productos puros.

Como ya se ha comentado anteriormente, en los diferentes ensayos se detectaron diferencias en los niveles basales de la citocina. Esas diferencias en la cantidad de IL-1 α preformada en el interior de la célula podrían suponer una interferencia a la hora de utilizar este marcador, dado que niveles ya elevados de citocina en el interior de la célula podrían afectar a su capacidad para inducir su síntesis. Por consiguiente, la clasificación de los tensioactivos en función de su CE_{50} podría verse alterada. Por ese motivo, se realizó un experimento con los tensioactivos LAM, MAM, CCR y SDS utilizando células del mismo pase, de manera que los niveles basales de citocina eran idénticos. Los resultados se muestran en la Figura 4.9. Además, en esta figura se muestran los resultados de IL-1 α IN en pg/ μ g de proteína. Al estandarizar los valores por cantidad de proteína, las diferencias entre el control y los tratamientos son mucho más evidentes. También se calcularon los valores CE_{50} (Tabla 4.12, Ensayo 2) y se compararon con los valores obtenidos en el primer ensayo. A pesar de las diferencias observadas entre los niveles basales de citocina entre los dos ensayos, que son especialmente marcadas en el caso del tensioactivo CCR, los valores de CE_{50} son muy similares. Por tanto, la cantidad basal de citocina intracelular no parece afectar demasiado a la capacidad de la célula para responder frente al tensioactivo.

Tabla 4.12. Concentraciones basales de IL-1 α IN expresadas en valor absoluto y expresadas en función de la cantidad de proteína y concentraciones efectivas 50 (CE₅₀) de los tensioactivos derivados de aminoácidos y del tensioactivo SDS en la línea de queratinocitos NCTC 2544 calculadas a partir de dos ensayos independientes.

		IL-1 α IN (pg/ml)	IL-1 α (pg/ μ g prot)	CE ₅₀ (μ g/ml)
HTAB	Ensayo 1	323,6	0,37	3,12
	Ensayo 2	-	-	-
Tegobetaína	Ensayo 1	296,6	0,34	13,6
	Ensayo 2	-	-	-
LAM	Ensayo 1	97,5	0,14	23,4
	Ensayo 2	74,8	0,10	21,3
MAM	Ensayo 1	45,7	0,09	22,4
	Ensayo 2	74,8	0,10	28,6
CCR	Ensayo 1	516,3	0,47	64,5
	Ensayo 2	74,8	0,10	71,6
SDS	Ensayo 1	47,7	0,09	7,1
	Ensayo 2	74,8	0,10	7,6

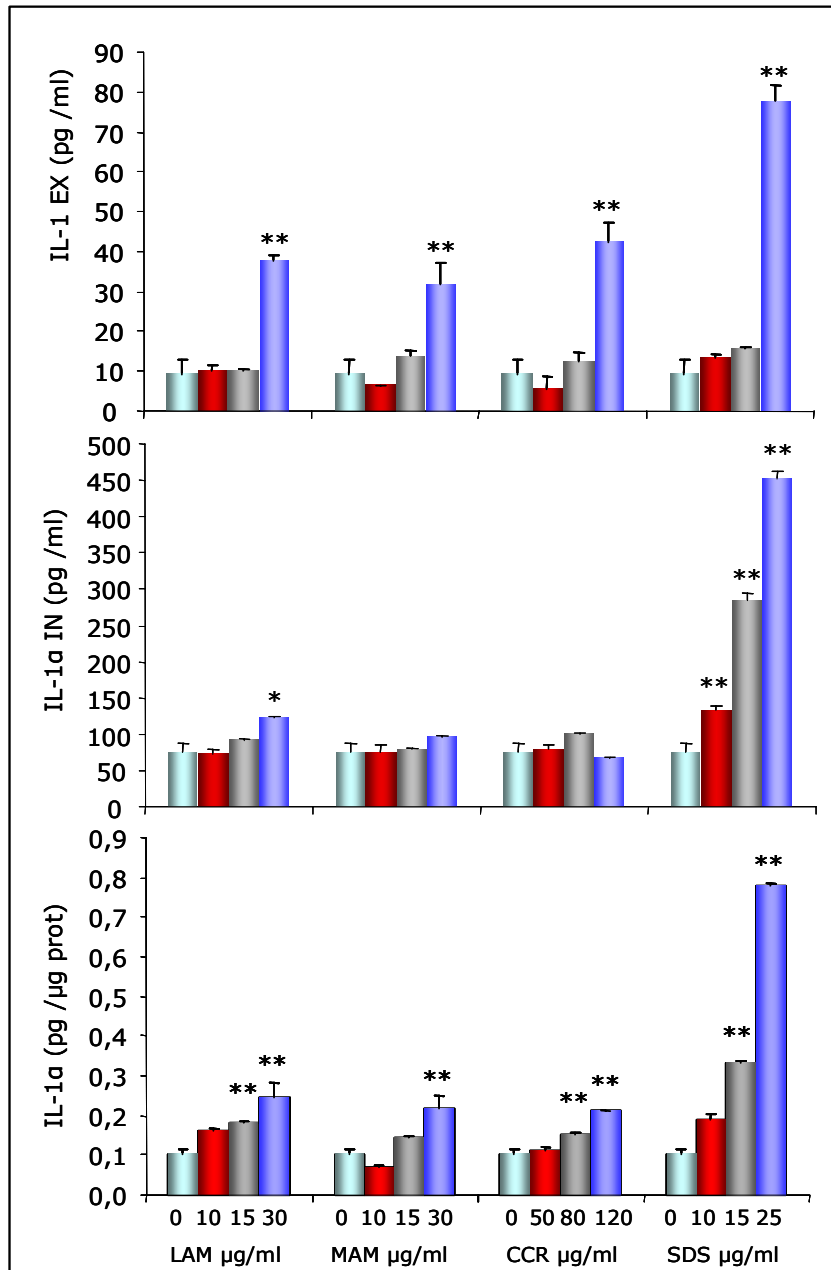


Figura 4.9. Concentraciones de IL-1α IN, IL-1α EX y concentraciones de IL-1α IN estandarizadas con la concentración de proteína (n=3, *p<0,05, **p<0,01 diferencias estadísticamente significativas respecto al control, análisis *post-hoc* Dunnett).

Otra manera de establecer una diferenciación entre los compuestos químicos sería calcular los incrementos máximos de IL-1α IN inducidos por los tratamientos asumiendo la hipótesis de que las variaciones presentes en los niveles inducidos de citocina podrían contribuir a diferencias en la intensidad de las reacciones de irritación (Willis, 2002). A partir de los valores de IL-1α IN en pg de IL-1α por μg de proteína tras los tratamientos con los diferentes tensioactivos, se calcularon los incrementos en % a partir de los valores

basales para cada uno de los ensayos. Los resultados se muestran en la Figura 4.10.

A partir de esos resultados, se podría establecer la siguiente clasificación: SDS > Tegobetaína > HTAB > MAM > LAM ~ CCR. Según este sistema de clasificación, el tensioactivo SDS es el compuesto que presenta una mayor capacidad para inducir la neosíntesis de la citocina con unos niveles muy superiores en comparación al resto de tensioactivos. Además, el tensioactivo HTAB, cuyo efecto irritante se conoce muy bien, tiene un perfil muy similar a la Tegobetaína, un compuesto considerado poco irritante. Los tres tensioactivos derivados de aminoácidos provocan unos incrementos similares que están por debajo de los inducidos por los tensioactivos comerciales.

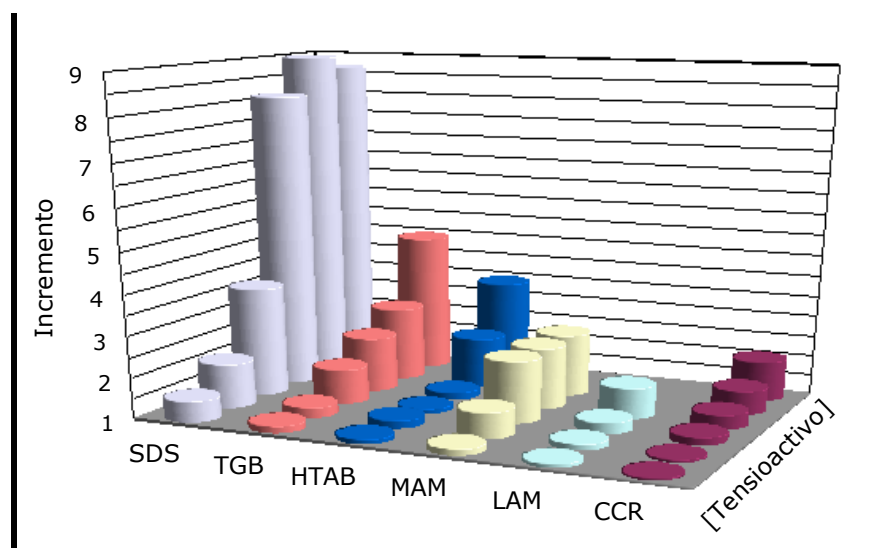


Figura 4.10. Incremento de IL-1 α IN respecto a los valores basales tras el tratamiento con los diferentes tensioactivos. Las concentraciones ensayadas para cada tensioactivo son las mismas que se presentan en las Figuras 4.6 y 4.7.

Como se puede observar, la clasificación de los tensioactivos en función de este último criterio de valoración ofrece unos resultados distintos a los obtenidos con los valores CE_{50} y los resultados de citotoxicidad. La interpretación de estos resultados es compleja. Dado que los incrementos de IL-1 α IN inducidos por el SDS son muy superiores, cabría esperar que la respuesta de inflamación desencadenada por este compuesto *in vivo* fuese más intensa para este compuesto que para el resto. Esto parece ser cierto para el caso de la Tegobetaína (Nicander y cols., 2003) y podría cumplirse para los tensioactivos derivados de aminoácidos, no obstante, los resultados obtenidos con el HTAB contradicen su potencial irritante *in vivo*. Por tanto, a pesar de que la IL-1 α parece un marcador muy apropiado para estimar el potencial irritante

de los compuestos, la interpretación de los resultados no es clara. Esto apunta a la existencia de otros mecanismos causantes de la iniciación e intensidad de las respuestas inflamatorias.

Relación entre la liberación de IL-1 α al medio extracelular y la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

En los ensayos descritos anteriormente para valorar la cantidad de IL-1 α liberada al medio extracelular se valoró, de forma paralela, la liberación de la enzima LDH como una medida indirecta del estado de la membrana citoplasmática. En la Figura 4.11 se han representado en la misma gráfica, la liberación de LDH y de IL-1 α al medio de cultivo. Como ya se ha comentado anteriormente, tanto la liberación de LDH como de la citocina presenta un perfil dependiente de la concentración.

Asimismo, se observa que la liberación de ambas moléculas se produce casi de forma paralela, hecho que sería indicativo de que la liberación de IL-1 α , igual que la liberación de LDH, se produce de forma pasiva cuando aumenta la permeabilidad de la membrana de la célula por efecto del tensioactivo. Este mecanismo también ha sido propuesto por otros autores sobre la base de sus resultados experimentales (Kupper, 1989; Shibata y cols., 1997). Por tanto, la liberación de IL-1 α generalmente refleja daños sobre la membrana inducida por los tensioactivos y no aporta más información que otros marcadores como la liberación de LDH.

De hecho, una de las hipótesis planteadas para explicar la iniciación de la reacción de irritación provocada por los tensioactivos se basa en su capacidad para provocar la liberación pasiva de la IL-1 α . La liberación de IL-1 α induciría la expresión de la propia IL-1 α y de otras citocinas como la IL-6 y la IL-8 que serían las responsables de iniciar el proceso inflamatorio (Welss y cols. 2004). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, en nuestros resultados se observa un aumento significativo de citocina intracelular antes de que se detecte una liberación significativa de la misma al medio extracelular. Esto podría deberse a diversos motivos. Uno de ellos podría ser que nuestro sistema de ensayo no fuese lo suficientemente sensible como para detectar incrementos en los niveles de citocina extracelular a los cuales la célula ya es capaz de responder. Otra explicación podría estar relacionada con la existencia de otros mecanismos responsables de la iniciación de la respuesta inflamatoria. Uno de esos mecanismos podría ser la modulación de las propiedades de la bicapa lipídica de las membranas celulares debido a la interacción con el tensioactivo. A concentraciones subtóxicas de tensioactivo,

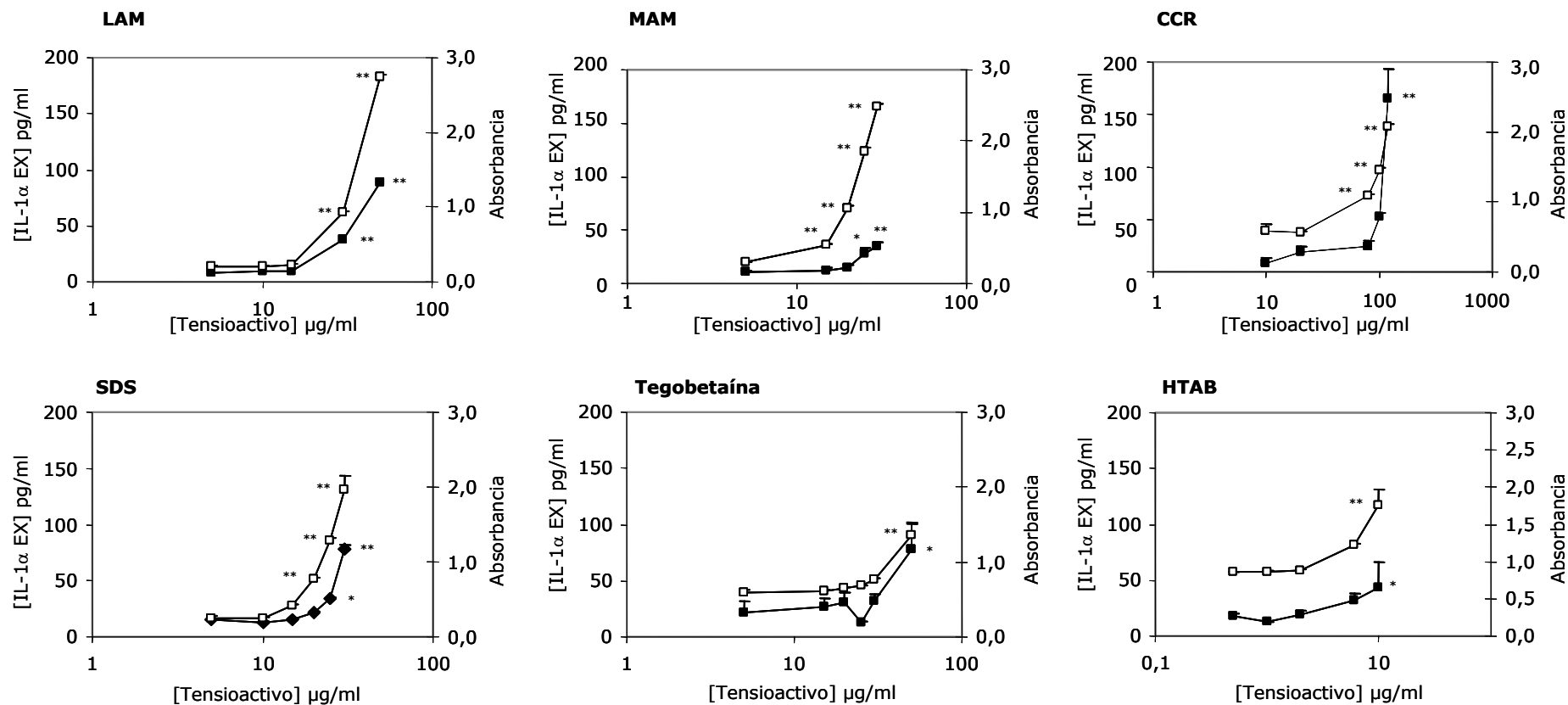


Figura 4.11. Liberación de LDH (—□—) e IL-1α (—■—) al medio extracelular tras el tratamiento con los tensioactivos. Las concentraciones de tensioactivo ensayadas son las mismas que las presentadas en las Figura 4.7 y 4.8. (n=3, *p<0,05, **p<0,01 diferencias estadísticamente significativas respecto al control, análisis *post-hoc* Dunnett).

la interacción de los compuestos irritantes con la membrana celular puede modificar su fluidez (Fulbright y cols., 1997; Zavodnik y cols., 1997) y este hecho, a su vez, tiene un impacto en la transducción de señal mediada por receptor (Rosette y Karin, 1996). En un artículo publicado recientemente por nuestro grupo de investigación, se ha estudiado el efecto de tensioactivos derivados de aminoácidos y del SDS y el HTAB sobre la fluidez de membrana en eritrocitos humanos (Martínez y cols, 2006). Todos los compuestos, a excepción del HTAB, fueron capaces de disminuir la fluidez de la zona externa de la bicapa lipídica, por tanto, es posible que ese efecto pueda tener alguna implicación en la iniciación de la respuesta de irritación. No obstante, a pesar de que el eritrocito se considera un buen modelo para el estudio de los cambios sobre la membrana plasmática, debería estudiarse si esos resultados se repiten en otros tipos celulares como los queratinocitos.

4.2.3. Acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas

La mayor parte de las células de los mamíferos empaquetan lípidos neutros en forma de gotas esféricas. Dichas gotas esféricas están compuestas por un núcleo de triacilgliceroles y ésteres de colesterol rodeado por una cubierta formada por una monocapa de fosfolípidos y proteínas específicas. Este almacenamiento intracelular de lípidos neutros es esencial para los orgánulos citosólicos de las células eucariotas que los utilizan fundamentalmente como reserva energética y para la biogénesis de la membrana (Martin y Parton, 2006). La utilización de los lípidos neutros contenidos en esas gotas intracelulares está regulada por señales extracelulares como hormonas, citocinas y neurotransmisores, y por mecanismos intracelulares que indican la existencia de necesidades energéticas o de materiales para la síntesis de la membrana (Brown, 2001).

En algunas ocasiones, se ha descrito la presencia de gotas lipídicas en queratinocitos tras su observación a nivel ultraestructural tanto en condiciones fisiológicas como en estados patológicos (Grubauer y cols., 1989; El-Shoura y Tallab, 1997). En condiciones fisiológicas, los queratinocitos sintetizan lípidos y los exportan al espacio intercelular para formar una barrera impermeable a nivel de la epidermis. No obstante, la presencia de numerosas gotas lipídicas en los corneocitos también es un marcador de procesos anormales de queratinización y de un efecto hiperproliferativo.

Como ya se ha comentado, los lípidos neutros desempeñan un papel muy importante en la biogénesis de la membrana. Asimismo, parece ser que la formación de esas gotas lipídicas con elevado contenido en lípidos neutros

también son muy importantes como mecanismo de reparación cuando la membrana celular sufre algún tipo de agresión, por ese motivo, puede servir como marcador de daños sobre la membrana celular (Corsini y cols., 2003).

Para la realización de este ensayo se utilizó la línea de queratinocitos humanos NCTC 2544 que fueron sometidos a un tratamiento con los tensioactivos durante 24 h. El colorante rojo de nilo es específico para lípidos neutros, de modo, que la cantidad de fluorescencia era proporcional a la cantidad de lípidos neutros en el interior de las células. Paralelamente, se valoró la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes como indicador de citotoxicidad tras el tratamiento.

4.2.3.1. Análisis mediante citofluorometría de flujo

En la Figura 4.12 (A) se muestran los valores de fluorescencia de las células tras el tratamiento con los diferentes tensioactivos. Se seleccionó una concentración de 15 µg/ml de SDS como control positivo sobre la base de un estudio previo publicado por Corsini y cols. (2003). En ese estudio se observó que a partir de dicha concentración se producían aumentos significativos de la liberación de LDH al medio que sería indicativo de daños sobre la membrana y muerte celular.

En general, se observa una relación concentración-respuesta para todos los tensioactivos. Asimismo, en la Figura 4.12 (B), se muestra la liberación de la enzima LDH al medio extracelular. Es interesante destacar que se observan aumentos significativos de la fluorescencia antes de que se detecte una liberación significativa de LDH. Aunque según el estudio antes mencionado (Corsini y cols., 2003), los lípidos neutros son marcadores de reparación de la membrana celular, el hecho de que aparezcan antes de que se produzca la liberación de la LDH es indicativo de que el tensioactivo está ejerciendo un efecto sobre la membrana de la célula. De esta manera, se puede observar el efecto tóxico del producto antes que exista un daño irreversible en la célula. Este hecho podría indicar que la acumulación de lípidos neutros en el interior de la célula podría servir como un marcador de daños sobre la membrana previo a la muerte celular.

La utilización de un marcador temprano de daños sobre la membrana podría ser interesante para la detección de aquellas concentraciones de tensioactivo que, a pesar de no ejercer un efecto citotóxico sobre la célula, están alterando su membrana. Asimismo, podrían servir para el estudio de tensioactivos con un potencial irritante bajo o moderado.

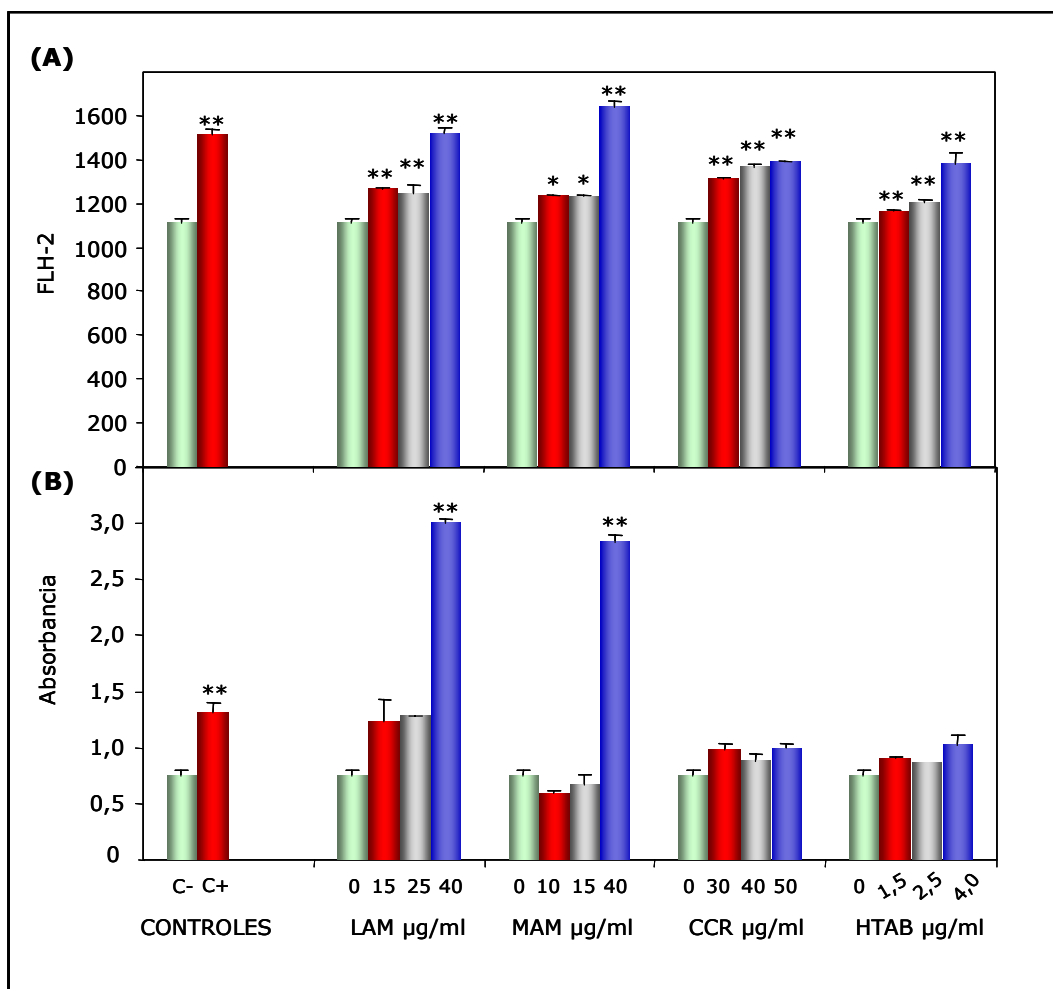


Figura 4.12. Determinación de la cantidad de fluorescencia (A) y liberación de LDH al medio extracelular (B) tras el tratamiento de las células con los diferentes tensioactivos. En los ensayos se ha utilizado el SDS (15 µg/ml) como control positivo y células que no recibieron ningún tratamiento con tensioactivo como control negativo. Se representa la media y el error estándar (n=3; *p<0,05; **p<0,01; test de Dunnett).

Existen pocos estudios en la literatura que relacionen la acumulación de lípidos neutros con el posible efecto citotóxico o irritante de los compuestos químicos. No obstante, en un estudio publicado recientemente por Törma y cols. (2006) se demostró que concentraciones no citotóxicas de SDS (7,5 µg/ml) eran capaces de alterar la expresión de mRNA de diversas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico en queratinocitos humanos diferenciados. También se ha demostrado el mismo efecto con otros tensioactivos como la Tegobetaína (Wei y cols., 2006). Por tanto, parece ser que los irritantes tienen la capacidad de alterar el metabolismo lipídico de los queratinocitos *in vitro*. Teniendo en cuenta que los queratinocitos son los encargados de la formación de la matriz lipídica del estrato córneo, esta alteración podría ser indicativa de alteraciones en la regeneración normal del

estrato córneo. Es evidente que estos resultados deberían confirmarse *in vivo* aunque ya existe algún estudio al respecto (Harris y cols., 1997). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el papel exacto de los lípidos neutros en la regeneración de la membrana y en la formación del estrato córneo.

4.2.3.2. Microscopía de fluorescencia

Además de la cuantificación de la fluorescencia mediante citometría de flujo se hicieron microfotografías para confirmar los resultados obtenidos. Las gotas citoplasmáticas formadas por lípidos neutros aparecen como puntos brillantes dispersos en el interior de las células.

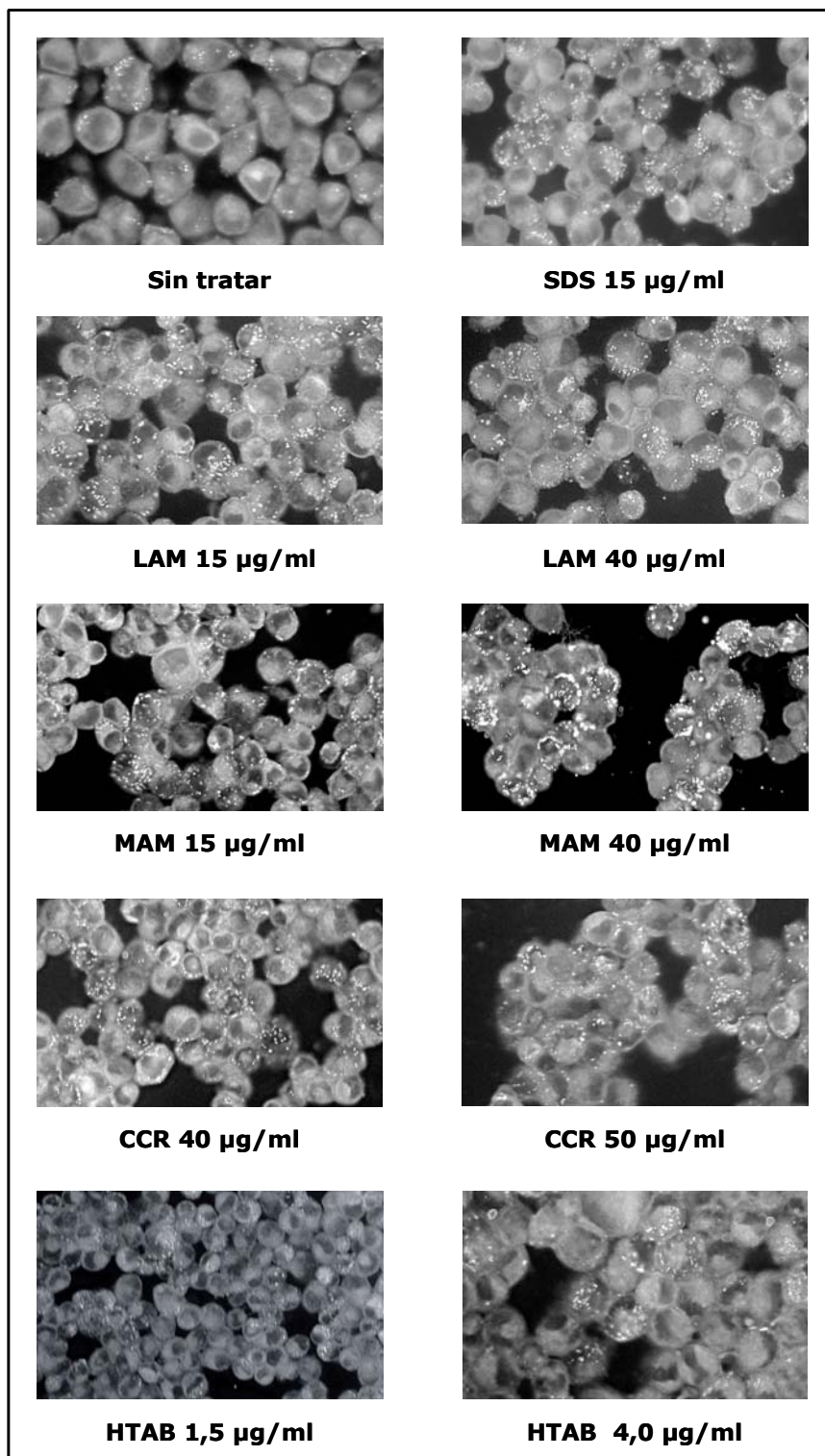


Figura 4.13. Fotomicrográficas de las células tras el tratamiento con los tensioactivos. Se realizaron con un microscopio equipado con una cámara fotográfica. Se muestran las microfotografías de los controles negativo (sin tratar) y positivo (SDS 15 µg/ml). También se muestran fotografías representativas de los tratamientos con los tensioactivos derivados de aminoácidos de estructura lineal (LAM, MAM y CCR) y con el HTAB como tensioactivo catiónico de referencia.

4.2.4. Ensayo de irritación dérmica de Draize

Se ha evaluado el potencial efecto irritante dérmico para los tensioactivos LAM, MAM y CCR mediante el ensayo *in vivo* descrito en la Guía 404 de la OCDE. Los productos se ensayaron al 5 % (p/v) disueltos en solución salina fisiológica. Tras un periodo de exposición de 4 h, se realizó la observación de la zona para valorar la aparición de eritema o edema. Las lesiones se cuantificaron según las puntuaciones establecidas en la Guía 404. A partir de las observaciones realizadas a las 24 h de la exposición a los productos se calculó la puntuación media teniendo en cuenta todos los animales (Tabla 4.13). En función de los valores de eritema y edema, los tres compuestos se clasificaron como ligeramente irritantes. Además, en todos los casos los efectos revertieron completamente a las 72 horas.

Tabla 4.13. Valoración de la aparición de eritema y edema 24 h después de la exposición a los tensioactivos. La valoración de las lesiones se hizo en función de la escala establecida en la Guía 404 de la OCDE.

Tensioactivo	Eritema	Edema	Clasificación*
LAM 5 %	0,83	0,33	Ligeramente irritante
MAM 5 %	0,67	0,67	Ligeramente irritante
CCR 5 %	1,67	0,67	Ligeramente irritante

*Sistema de clasificación propuesto por Draize y cols. (1945).

En la Guía 405 de la OCDE se establece que para ensayar sustancias sólidas, estas deben hidratarse con la cantidad mínima de agua posible. En el caso de nuestros tensioactivos, en cambio, se ha seleccionado una concentración del 5 % porque, como ya se ha comentado anteriormente, las concentraciones de tensioactivo utilizadas en las formulaciones no suelen exceder del 5 %. Por tanto, a efectos prácticos esa concentración se ajustaría más a la situación real, además se evita un sufrimiento innecesario al animal dado que la sustancia pura es más probable que ejerza un efecto irritante sobre el animal.

De igual modo que ocurría para los resultados de los ensayos para valorar la irritación ocular, los resultados *in vivo* para irritación dérmica no han revelado diferencias en la toxicidad de estos tres compuestos mientras que todos los ensayos *in vitro* se establecía una diferencia clara entre los tensioactivos puros LAM y MAM y la mezcla CCR. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de todos los ensayos *in vitro* y de los ensayos *in vivo* (dérmico y ocular) parece ser que los sistemas *in vitro* son más sensibles y permiten de detectar pequeñas diferencias en el potencial irritante de los compuestos,

sobretudo cuando se trata de compuestos con un potencial irritante ligero o moderado.

De manera similar a lo dicho anteriormente sobre irritación ocular, también en el caso de irritación dérmica, la clasificación de la UE utiliza la categoría discreta R38 (Irrita la piel) para definir el nivel de riesgo que representan los compuestos basándose en los resultados del ensayo de Draize (Tabla 4.14). Por consiguiente, tampoco se tiene en cuenta la reversibilidad de las lesiones.

Tabla 4.14. Normas de etiquetado de las sustancias peligrosas en función de su capacidad irritante determinada mediante el ensayo de Draize dérmico aceptado por la OCDE (Guía 405). Extraído de la Directiva 2001/59/CE del 6 de agosto de 2001.

Etiqueta	Método	Criterio
R38 Irrita la piel	Draize dérmico	El valor medio de los resultados de formación de eritema o edema (teniendo en cuenta todos los animales) es igual o superior a 2 o; si el ensayo se ha realizado en tres animales, cuando se observe en dos o más animales la formación de eritema o edema equivalente a un valor medio igual o superior a 2 calculado por cada animal individualmente.

Se ha discutido mucho sobre la idoneidad del conejo como modelo apropiado para predecir la irritación dérmica en humanos. La Guía de la OCDE menciona el uso del conejo albino como la especie preferente para la evaluación de la irritación dérmica, sin embargo, se admite la utilización de otras cepas de conejo o incluso otras especies animales. No obstante, deben tomarse con precaución estas recomendaciones dado que en la bibliografía se ha descrito la existencia de variaciones interespecíficas considerables en las respuestas de irritación (Davies y cols., 1972). Por tanto, es posible encontrar variaciones en los resultados del ensayo *in vivo* en función del modelo animal utilizado.

La extrapolación de los resultados en animales a humanos es complicada. Siempre que se realiza una extrapolación entre diferentes especies se deben tener en cuenta dos componentes fundamentales: un componente de naturaleza cualitativa y otro de naturaleza cuantitativa. La extrapolación cualitativa se refiere a si los criterios de valoración aplicados en el modelo animal son aplicables en el hombre. En este caso, la aparición de eritema y edema parecen criterios de valoración apropiados para ambas especies, tanto

los humanos como el conejo responden a los irritantes con esas reacciones. Sin embargo, la extrapolación cuantitativa resulta más complicada. En general, se considera al conejo como un animal más sensible que los humanos, especialmente a los irritantes ligeros y moderados. Por consiguiente, un resultado negativo en el ensayo de Draize garantizaría la seguridad de ese compuesto para humanos. Sin embargo, una clasificación errónea de los compuestos sobre la base del ensayo en conejo también puede dar como resultado una subestimación del peligro. Existen datos que indican que los ensayos en animales pueden dar lugar a errores en la clasificación de los productos químicos (York y cols., 1996; Basketter y cols., 1999). Por todos esos motivos y a pesar de ser el ensayo aceptado por la legislación, la necesidad de métodos alternativos que reemplacen la utilización de animales para valorar la irritación dérmica se hace evidente.

4.3. Últimas consideraciones

El área de la toxicología reguladora es un área fascinante. La negativa de ciertos sectores de la población a la utilización de animales en experimentación pone de manifiesto la existencia de cuestiones éticas y sociales relacionadas con la investigación científica. Lógicamente, la mayor presión social en lo que se refiere a la oposición al uso de animales en investigación se produce cuando se trata de ensayar cosméticos, debido a que no se consideran productos absolutamente necesarios para la salud humana.

Es posible que la fuerza que impulsa el desarrollo de métodos alternativos sea en gran medida de carácter ético, pero también influyen otros factores. La utilización de animales de laboratorio es cara y la realización de experimentos con animales lleva mucho tiempo y con frecuencia es difícil de estandarizar. Pero, quizá, el motivo más importante sea la necesidad real de disponer de métodos mecánicos y científicamente más avanzados que aporten información más relevante para la predicción de riesgos sobre la salud humana. Por tanto, es evidente que se hace necesaria una revolución en el modo de pensar y de poner en práctica una nueva toxicología reguladora si se quiere obtener una auténtica protección de los seres humanos y del medio ambiente. La clave está en el desarrollo de nuevos métodos que tengan una mayor relevancia que los procedimientos actuales basados en animales. Estos nuevos métodos deben basarse en el conocimiento de las bases mecánicas del propio método y del fenómeno toxicológico que evalúa, utilizar los nuevos avances en las técnicas de biología celular y molecular junto con los sistemas

informáticos y computacionales más avanzados y entender el valor de un buen modelo de predicción.

A pesar del enorme esfuerzo que ha realizado la comunidad científica y las instituciones reguladoras para sustituir los ensayos de Draize por métodos *in vitro* de remplazo, todavía no se ha alcanzado el éxito. Quizá, la falta de éxito se deba a la existencia de una contradicción inherente al propio concepto de «método *in vitro* de remplazo» y que supone un obstáculo para su aceptación por parte de las instituciones reguladoras. Un método *in vitro* no es más que un modelo que supone una simplificación fisiológica de algún órgano o tejido. Esa simplificación es de gran utilidad cuando se están investigando las respuestas de ese tejido u órgano a una sustancia. No obstante, es muy difícil que ese sistema simplificado reproduzca fielmente la respuesta del organismo en su conjunto. Esto plantea un inconveniente, al igual que las diferencias entre especies limitan la aplicación al hombre de los datos obtenidos en experimentos con animales. Además, a nivel práctico, existen otras barreras que obstaculizan el desarrollo de métodos alternativos de remplazo para valorar la irritación ocular y dérmica:

- Una falta de resultados *in vivo*, ya sea en animales o en humanos, de calidad que permitan calibrar y, por tanto, validar los ensayos *in vitro* propuestos y sus correspondientes modelos de predicción.
- Unos conocimientos insuficientes de los procesos implicados en las lesiones oculares y dérmicas en humanos. Este hecho impide el avance de los ensayos actuales para predecir de una forma más precisa el riesgo en humanos.
- Un modelo *in vitro* robusto debe ser apropiado para productos y sustancias que abarquen un amplio abanico de niveles de toxicidad y de características fisicoquímicas.
- Una comprensión adecuada de los procesos implicados en la reparación de las lesiones, una parte que no se tiene en cuenta en los ensayos existentes.

A pesar de todo esto, existen muchas buenas razones para continuar la búsqueda de alternativas a los ensayos con animales, incluyendo aspectos políticos, sociales, legales, éticos, logísticos, económicos y científicos. Uno de los aspectos más reconfortantes de trabajar en este campo es que tanto los seres humanos como los animales obtendrán grandes beneficios.

5. CONCLUSIONES

1. Estudios de la irritación ocular

1.1. Los tensioactivos derivados de aminoácidos han mostrado mediante el ensayo de hemólisis ser menos irritantes oculares que el SDS y el HTAB y del orden de la Tegobetaína, tensioactivo aceptado como poco irritante ocular.

1.2. Los resultados obtenidos en el ensayo de hemólisis han revelado que la carga iónica del tensioactivo determina su diana biológica, de modo que los tensioactivos aniónicos presentan un mayor efecto desnaturalizante sobre las proteínas y los catiónicos sobre la membrana del eritrocito provocando su lisis. Por tanto, la valoración de ambos efectos es imprescindible para una clasificación correcta de los tensioactivos en función de su potencial irritante.

1.3. La presencia de cadenas de diferente longitud tiene algún efecto sobre la actividad lítica de los tensioactivos, si bien no es el único factor responsable dado que también depende de la combinación de otras propiedades estructurales. Únicamente existe una relación directa entre longitud de la cadena y el potencial irritante dentro de una misma familia de compuestos con propiedades estructurales similares.

1.4. Los métodos basados en el uso de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina resultan modelos excesivamente sensibles a los tensioactivos y pueden sobrestimar su potencial irritante por lo que se descarta su uso para evaluar estos compuestos.

1.5. Existe una buena correlación entre el cociente L/D del ensayo de hemólisis con los resultados de citotoxicidad en la línea de queratinocitos HaCaT. Por tanto, esta línea celular es apropiada para valorar el potencial efecto irritante ocular de tensioactivos.

2. Estudios de irritación dérmica

2.1. En los ensayos de citotoxicidad, los fibroblastos 3T3 establecen una diferenciación de los compuestos similar a la ofrecida por las cuatro líneas celulares consideradas en su conjunto. Por tanto, se propone como una línea celular candidata para utilizarse como modelo para valorar el efecto irritante de tensioactivos.

2.2. En función de los resultados de citotoxicidad en líneas celulares de origen dérmico, se ha propuesto un modelo de predicción considerando tres categorías: categoría A con una CI_{50} inferior a 50 $\mu\text{g/ml}$ y potencial irritante elevado; categoría B potencial irritante medio y CI_{50} comprendida entre 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$; y categoría C, un potencial irritante bajo y CI_{50} superior a

100 µg/ml. Según este modelo de predicción los tensioactivos $C_3(CA)_2$, $C_3(LA)_2$ y $C_3(OH)(LA)_2$ muestran un potencial irritante elevado; LAM, MAM y LAE, un potencial irritante medio; y CCR y $C_3(OA)_2$, un potencial irritante bajo.

2.3. El cultivo en monocapa es demasiado sensible a las sustancias pero se propone para el cribado sistemático de nuevos tensioactivos que permita seleccionar los mejores candidatos para su evaluación en un sistema más complejo.

2.4. La liberación de IL-1 α al medio se extracelular se produce de forma pasiva cuando aumenta la permeabilidad de la membrana de la célula por efecto del tensioactivo. Por tanto, es un marcador que refleja daños sobre la membrana.

2.5. Todos los tensioactivos mostraron la capacidad de inducir la neosíntesis de la IL-1 α en función de su concentración. No obstante, la implicación de ese mecanismo en la intensidad de las reacciones de irritación no está clara. Por ese motivo, se debería considerar conjuntamente con otros marcadores.

2.6. La acumulación de lípidos neutros en el interior de la célula podría servir como un marcador de daños sobre la membrana previo a la muerte celular. La utilización de este marcador nos permitiría detectar concentraciones de tensioactivo que, a pesar de no ejercer un efecto citotóxico sobre la célula, están alterando su membrana. Asimismo, podría servir para el estudio de tensioactivos con un potencial irritante bajo o moderado que son los que utilizan mayoritariamente las industrias cosmética y farmacéutica.

6. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS

A

Abraham MH, Hassanisadi M, Jalali-Heravi M, Ghafourian T, Cain WS, Cometto-Muniz JE, 2003. Draize rabbit eye test compatibility with eye irritation thresholds in humans: a quantitative structure-activity relationship analysis. *Toxicological Sciences* 76, 384-392.

Abraham MH, Kumarsingh R, Cometto-Muniz JE, Cain WS, 1998. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) for a Draize eye irritation database. *Toxicol in Vitro* 12, 201-207.

Adriaens E, Remon JP, 2002. The evaluation of an alternative mucosal irritation test using slugs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182, 169-175.

Andresen O, Kirk O, 1995. *Prog Biotechnol* 10, 343-351.

Archer G, Balls M, Bruner LH, Curren RD, Fentem JH, Holzhütter HG, Liebsch M, Lovell DP, Southee JA, 1997. The validation of toxicological prediction models. *ATLA* 25, 505-516.

Attwood D, Florence AT (1983). *Surfactant systems: Their chemistry, pharmacy and biology*. Ed. Chapman & Hall, London.

B

Bagley DM, Rizvi PY, Kong BM, Salva SJ, 1991. Factors affecting use of the hens eggs chorioallantoic membrane as a model for predicting eye irritation potential. *Journal of Toxicology -Cutaneous and Ocular Toxicology* 10, 95-104.

Balls M, Berg N, Bruner LH, Curren R, de Silva O, Earl LK, Esdaile DJ, Fentem JH, Liebsch M, Ohno Y, Prinsen MK, Spielmann H, Worth AP, 1999. Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop 34. *ATLA* 27, 53-77.

Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, Fielder RJ, Guillouzo A, Lewis RW, Lovell DP, Reinhardt CA, Repetto G, Sladowski D, Spielmann H, Zucco F, 1995. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 23, 129-147.

Balls M, Botham PA, Bruner LH, Spielmann H, 1995. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol in Vitro* 9, 871-929.

Barratt MD, Brantom PG, Fentem JH, Gerner I, Walker AP, Worth AP, 1998. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicol in Vitro* 12, 471-482.

Basketter DA, Reynolds FS, York M, 1999. Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis. *Clinics in Dermatol* 15, 637-644.

- Benassi LC, Bertazzoni G, Magnoni C, Rinaldi M, Fontanesi C, Seidenari S, 2003. Decrease in toxic potential of mixed tensides maintained below the critical micelle concentration: an *in vitro* study. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16, 156-164.
- Benassi LC, Bertazzoni G, Seidenari S, 1999. *In vitro* testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers. *Contact Dermat* 40, 38-44.
- Benavides T, Martínez V, Mitjans M, Infante MR, Morán C, Clapés P, Clothier RH, Vinardell MP, 2004b. Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by *in vitro* methods as alternative to the animal tests. *Toxicology* 201, 87-93.
- Benavides T, Mitjans M, Martínez V, Clapés P, Infante MR, Clothier RH, Vinardell MP, 2004a. Assessment of primary eye and skin irritants by *in vitro* cytotoxicity and phototoxicity models: and *in vitro* approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. *Toxicology* 197, 229-237.
- Berardesca E, Distante F, 1994. The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis* 31, 281-287.
- Berthod A. Physicochemical structures of liquid disperse systems. *J Chem Phys* (1983) 80: 407- 424.
- Blank IH, 1939. Action of soap on the skin. *Arch Dermatol* 39, 811-817.
- Bliss CI, 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Appl Biol* 26, 585-615.
- Borenfreund E, Puerner JA, 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 9, 7-9.
- Borenfreund E, Puerner JA, 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24, 119-124.
- Botham P, Osborne R, Atkinson K, Carr G, Cottin M, van Buskirk RG, 1997. IRAG working group 3. Cell function-based assays. *Food Chem Toxicol* 35, 67-77.
- Botham PA, Earl LK, Fentem JH, Roguet R, Van de Sandt JJM, 1998. Alternative methods for skin irritation testing: the current status. *ATLA* 26, 195-211.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE, 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771.
- Boxman IL, Ruwhof C, Boerman OC, Lowik CW, Ponc M, 1996. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch Dermatol Res* 288, 391-398.
- Bradford MA, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem* 72, 248-254.

Bradlaw J, Gupta K, Green S, Hill R, Wilcox N, 1997. Practical application of non-whole animal alternatives: summary IRAG workshop on eye irritation. Food and Chemical Toxicology 35, 175-178.

Brantom PG, Bruner LH, Chamberlain M, de Silva O, Dupuis J, Earl LK, Lovell DP, Pape WJW, Uttley M, Bagley DM, Baker FW, Brachter M, Courtellemont P, Declercq L, Freeman S, Steiling W, Walker AP, Carr GJ, Dami N, Thomas G, Harbell J, Jones PA, Pfannenbecker U, Southee JA, Tcheng M, Argembeaux H, Castelli D, Clothier R, Esdaile DJ, Itigaki H, Jung K, Kasai Y, Kojim H, Kristen U, Larnicol M, Lewis RW, Marenus K, Moreno O, Peterson A, Rasmussen ES, Robles C, Stern M, 1997. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. Toxicol in Vitro 7, 141-179.

Breitkreutz D, Boukamp P, Ryle CM, Stark H-J, Roop DR, Fusening NE, 1991. Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line. Cancer Research 51, 4402-4409.

Brinch DS, Elvig SG, 2001. Evaluation of an *in vitro* human corneal model as alternative to the *in vivo* eye irritation testing of enzymes. Toxicology Letters 123 suppl. 1, 22.

Brown DA, 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. Current Biol 11, R446-R449.

Bruner LH, Miller KR, Owicki JC, Parce JW, Muir VC, 1991. Testing ocular irritancy *in vitro* with the silicon microphysiometer. Toxicol in Vitro 5, 277-284.

Bruner LH, Parker RD, Bruce RD, 1992. Reducing the number of rabbits in the low volume eye test. Fundamental and Applied Toxicology 19, 330-335.

C

Calabrese EJ, 1983. Principles of animal extrapolation. New York: Wiley Interscience.

Cannon CL, Neal PJ, Southee JA, Kubilus J, Klausner M, 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxicol in Vitro 8, 889-891.

Casterton PL, Potts LF, Klein BD, 1996. A novel approach to assessing eye irritation potential using the bovine corneal opacity and permeability assay. Journal of Toxicology -Cutaneous and Ocular Toxicology 15, 147-163.

Catroux P, Rougier A, Dossou KG, Cottin M, 1993. The silicon microphysiometer for testing ocular toxicity *in vitro*. Toxicol in Vitro 7, 465-469.

Clapés P, Morán C, Infante MR, 1999. Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. Biotechnol Bioeng 63, 333-343.

Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen Virol 34, 475-483.

Clothier RH, Hulme L, Ahmed AB, Reeves HL, Smith M, Balls M, 1988. In vitro cytotoxicity of 150 chemicals to 3T3-L1 cells, assessed by the FRAME kenacid blue method. ATLA 16, 84-95.

Clothier RH, 1990. INVITTOX Protocol 3: The FRAME Modified Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission JRC. Website <http://ecvam-sis.jrc.it>

Clothier RH, 1992. Protocolo Invittox núm. 54. The FRAME neutral red release assay. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia, ECVAM, European Comission JRC. Sitio web: <http://ecvam-sis.jrc.it>

Conduzorgues J, Hagege M, Dumas M, Meybeck A, 1989. Participation of the membrane effect to the cytotoxicity of tensio-active agents comparison with ocular irritation in vivo. Lens Eye Toxic Res 6, 375-378.

Cook JA, Mitchell JB, 1989. Viability measurements in mammalian cell systems. Anal Biochem 179, 1-7.

Coquette A, Berna N, Vandebosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y, 2003. Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. Toxicol in Vitro 17, 311-321.

Corsini E, Galli CL, 2000. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. Toxicology 142, 203-211.

Corsini E, Viviani B, Zancanella O, Lucchi L, Visioli F, Serrero G, Bartesaghi S, Galli CL, Marinovich M, 2003. Induction of adipose differentiation related protein and neutral lipid droplet accumulation in keratinocytes by skin irritants. J Invest Dermatol 121, 337-344.

Cottin, M, Zanvit A, 1997. Fluorescein leakage test: a useful tool in ocular safety assessment. Toxicol in Vitro 11, 399-405.

Cronin MTD, Basketter DA, York M, 1994. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) investigation of a Draize eye irritation database. Toxicol in Vitro 8, 21-28.

Cronin MTD, Dearden JC, Walker JD, Worth AP, 2003. Quantitative structure-activity relationships for human health effects: commonalities with other endpoints. Environmental and Toxicological Chemistry 22, 1829-1843.

Cserhati T, Szogyi M, Bordas M, Dobrovlszky A, 1984. Structural requirements for the membrane damaging effects of non-homologues series of non-ionic tensides. Quant Struct-Act Relatsh 3, 56-59.

Curren RD, Harbell JW, 1998. *In vitro* alternatives for ocular irritation. Environ Health Persp 106 Suppl 2, 485-492.

D

Davies RE, Harper KH, Kynoch SR, 1972. Inter-species variation in dermal reactivity. J Soc Cosm Chem 23, 371-381.

de Brugerolle de Fraissinette A, Picarles V, Chibout S, Kolopp M, Medina J, Burtin P, Ebelin ME, Osborne S, Mayer FK, Spake A, Rosdy M, De Wever B, Ettlin RA, Cordier A, 1999. Predictivity of an *in vitro* model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles. Cell Biology and Toxicology 15, 121-135.

Debbasch C, Ebenhahn C, Dami N, Pericoi M, Van den Berghe C, Cottin M, Nohynek GJ, 2005. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition. Food Chem Toxicol 43, 155-165.

De Silva O, Rougier A, Dossou KG, 1992. The HET-CAM test: a study of the irritation potential of chemicals and formulations. ATLA 20, 432-437.

Dickson FM, Lawrence JN, Benford DJ, 1993. Surfactant-induced cytotoxicity in cultures of human keratinocytes and a commercially available cell line (3T3). Toxicol in Vitro 7, 381-384.

Dinarello CA, 1998. Interleukin 1, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist. Intern Rev Immunol 16, 457-499.

Diz M, Manresa A, Pinazo A, Erra P, Infante MR, 1994. Synthesis, surface active properties and antimicrobial activity of new bis-quaternary ammonium compounds. J Chem Soc Perkin Trans 2, 1871-1876.

Doucet O, Lanvin M, Zastrow L, 1999. Comparison of three *in vitro* methods for the assessment of the eye irritation potential of formulated products. In vitro Mol Toxicol 12, 63-76.

Downing DT, Abraham W, Wegner BK, Willman KW, Marshall JL. 1993. Partition of sodium dodecyl sulfate into stratum corneum lipid liposomes. Arch Dermatol Res. 285, 151-157.

Draize JH, Lang RB, Calvery HO, 1945. Toxicity studies of substances applied topically to the skin. Fed Proc 4, 116-117.

Draize JH, Woodard G, Calvery HO, 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharm Exptl Ther 82, 377-390.

E

Earl LK, Hall-Manning TJ, Holland GH (1999). The determination of acute chemically induced skin irritation using a human skin model. *Alternatives to Animal Testing II. Proceedings of the Second International Scientific Conference Organised by the European Cosmetic Industry*. Eds. DG Clark, SG Lisansky, R Macmillan. CPL Press, Newbury, UK.

ECVAM (1998), *ECVAM News & Views*, ATLA 26, págs. 275-280.

Effendy I, Maibach HI, 1996. Detergent and skin irritation. *Clin Dermatol* 14, 15-21.

Elias PM, Wood LC, Feingold KR, 1999. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am J Contact Dermat* 10, 119-126.

El-Shoura SM, Tallab TM, 1997. Richner-Hanhart's syndrome: New ultrastructural observation on skin lesions of two cases. *Ultrastruct Pathol* 21, 51-57.

Engvall E, Perlmann P, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobuline G. *Immunochemistry* 8, 871-874.

F

Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R, 2002. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol in Vitro* 16, 557-572.

Faller C, Bracher M. Evaluation of in vitro tests batteries for assessment of the eye irritation potential of cosmetics. Presentación en el congreso: *Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences*. Agosto de 1999 (Bologna, Italia).

Fartasch M, 1997. Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microsc Res Tech* 37, 193-199.

Fentem JH, Archer GEB, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Holzhutter HG, Liebsch M, 1998. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicol in Vitro* 12, 483-524.

Fentem JH, Briggs D, Chesné C, Elliot GR, Harbell JW, Heylings JR, Portes P, Roguet R, van de Sandt JJM, Botham PA, 2001. A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicol in Vitro* 15, 57-93.

Filman DJ, Brawn RJ, Dandliker WB, 1975. Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *J Immunol Meth* 6, 189-207.

Froebe CL, Simion FA, Rhein LD, Cagan RH, Kligman A, 1990. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to *in vivo* irritation. *Dermatologica* 181, 277-283.

Fulbright RM, Axelrod D, Dunham WR, Marcelo CL, 1997. Fatty acid alteration and the lateral diffusion of lipids in the plasma membrane of keratinocytes. *Exp Cell Res* 233, 128-134.

G

García Abujeta JL, 2002. Nuevos contactantes en alergología. *Alergol Inmunol Clin* 17, 111-115.

Gettings SD, Bagley DM, Chudlowski M, Demetrualias JL, DiPasquale LD, Galli CL, Gay R, Hintze KL, Janus J, Marenus KD, Muscatiello MJ, Pape WJW, Renskers KJ, Roddy MT, Schnetzinger R, 1992. Development of potential alternatives to the Draize eye test. The CTFA evaluation of alternatives program (Phase II). Review of materials and methods. *ATLA* 20, 164-171.

Gettings SD, DiPasquale LC, Bagley DM, Casterton PL, Chudkowski M, Curren RD, 1994. The CFTA evaluation of alternatives program: and evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase II), oil/water emulsions. *Food and Chemical Toxicology* 32, 943-976.

Gettings SD, Lordo RA, Hintze KL, Bagley DM, Casterton PL, Chudkowski M, Curren RK, Demetrualias JL, DiPasquale LC, Earl LK, Feder PI, Galli CL, Glaza SM, Gordon VC, Janus J, Kurtz PJ, Marenus KD, Moral J, Pape WJW, Renskers KJ, Rheins LA, Roddy MT, Rozen Mg, Tedeschi JP, Zyracki J, 1996. The CFTA evaluation of alternatives to the Draize primary eye irritation test. (phase III) Surfactant-based formulations. *Food and Chemical Toxicology* 34, 79-117.

Gettings SD, Teal JJ, Bagley DM, Demetrualias JL, DiPasquale LC, Hintze KL, Rozen MG, Weise SL, Chudkowski M, Marenus KD, Pape WJW, Roddy M, Schnetzinger R, Silber PM, Glaza SM, Kurtz PJ, 1991. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test (phase I) hydro-alcoholic formulations; (part 2) data analysis and biological significance. *In Vitro Toxicology* 4, 247-288.

Generalitat de Catalunya, 1995. Llei 5/1995 de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques. DOGC núm. 2073.

Generalitat de Catalunya, 1997. Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

Gibbs S, Vietsch H, Meier U, Ponc M, 2002. Effect of skin barrier competence on SLS and water-induced IL-1 α expression. *Exp Dermatol* 11, 217-223.

Gloor M, Senger B, Langenauer M, Fluhr JW, 2004. On the course of the irritant reaction after irritation with sodium lauryl sulfate. *Skin Res Technol* 10, 144-148.

- Gloxhuber Ch, 1974. Toxicological properties of surfactants. Arch Toxicol 32, 245-270.
- Goldberg AM, Frazier JM, 1989. Alternatives to animals in toxicity testing. Scientific American 261, 16-22.
- Gray GM, White RJ, Williams RH, Yardley HJ, 1982. Lipid composition of the superficial stratum corneum cells of the epidermis. Br J Dermatol 106, 59-63.
- Green S, 1993. Regulatory agency considerations and requirements for validation of toxicity test alternatives. Toxicol Lett 68, 119-123.
- Greenspan P, Mayer EP, FowlerSD, 1985. Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J Cell Biol 100, 965-973.
- Griffith JF, Nixon GA, Bruce RD, Reer PJ, Bannan EA, 1980. Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. Toxicology and Applied Pharmacology 55, 501-513.
- Grubauer G, Feingold KR, Harris RM, Elias PM, 1989. Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. J Lipid Res 30, 89-96.

H

- Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, 1993. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals. Toxicol in Vitro 7, 35-39.
- Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, Tanaka M, 1991. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using Trypan Blue. Toxicol in Vitro 5, 301-304.
- Hagino S, Kinoshita S, Tani N, Nakamura T, Ono N, Konishi K, Iimura H, Kojima H, Ohno Y, 1999. Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients: (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. Toxicol in Vitro 13, 99-113.
- Harbell JW, 1994. Protocolo INVITTOX núm. 100: Neutral Red Bioassay Using BALB/c 3T3 Cells. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Comisión JRC. Sitio web <http://ecvam-sis.jrc.it>
- Harbell JW, Koontz SW, Lewis RW, Lovell D, Acosta D, 1997. Cell cytotoxicity assays. Irag Working Group 4. Food Chem Toxicol 35, 79-126.
- Harbell JW, Osborne R, Carr GJ, Peterson A, 1999. Assessment of the cytosensor Microphysiometer assay in the COLIPA *in vitro* eye irritation validation study. Toxicol in Vitro 13, 313-323.
- Harris IR, Farrell AM, Grunfeld C, Holleran WM, Elias PM, Feingold KR, 1997. Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of

cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the epidermis. *J Invest Dermatol* 109, 783-787.

Harry RG. *Harry's cosmetology*. 7th edition, 1982. Eds. JB Wilkinson, RJ Moore. Chem Publ Comp. Inc, New York.

Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S, Gribaldo L, Halder M, Hoffman S, Roi AJ, Prieto P, Sabbioni E, Scott L, Worth A, Zuang V, 2004. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *ATLA* 32, 467-472.

Hatao, M., Murakami, N., Sakamoto, K., Ohnuma, M., Matsushige, C., Kakishima, H., Ogawa, T., Kojima, H., Matsukawa, K., Masuda, K., Chiba, K., Yoshizawa, K., Kaneko, T., Iwabuchi, Y., Matsushima, Y., 1999. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (4) Haemoglobin denaturation test. *Toxicol in Vitro* 13, 125-137.

Helenius A, Simons K, 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 425, 29-79.

Heylings JR, Clowes HM, Hughes L, 2001. Comparison of tissue sources for the skin integrity function test (SIFT). *Toxicol in Vitro* 13, 597-600.

Heylings JR, Diot S, Esdaile DJ, Fasano WJ, Manning LA, Owen HM, 2003. A prevalidation study on the *in vitro* skin irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation *in vivo*: results and evaluation of ECVAM Phase III. *Toxicol in Vitro* 17, 123-138.

Hulzebos EM, Maslankiewicz L, Walker JD, 2003. Verification of literature-derived SARs for skin irritation and corrosion. *QSAR and Combinatorial Science* 22, 351-363.

Hutt P, 1984. A history of government regulation of adulteration and misbranding of food. *Food Drug Cosmet Law J* 39, 2-73.

I

Infante MR, Erra P, Julià MR, García Domínguez JJ, Prats M, 1984. Surface active molecules: preparation and properties of long chain N^α-acyl-L-α-amino-ω-guanidine alkyl acid derivatives. *Int J Cosm Sci* 6, 275-282.

Infante MR, Molinero J, Bosch P, Julià MR, Erra P (1988). Synthesis and properties of new N^α-acyl peptidic surfactants. En: *Proceedings of the Second World Surfactants Congress*, págs. 196-203.

Itagaki H, Hagino S, Kato S, 1995. Protocolo INVITTOX núm. 108: CAM-TBS ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission JRC. Sitio web <http://ecvam-sis.jrc.it>

J

Jiang SJ, Zhou XJ, Sun GQ, Zhang Y, Jiang SJ, Sun GQ, Zhang Y, 2003. Morphological alterations of the stratum corneum lipids induced by sodium lauryl sulfate treatment in hairless mice. *J Dermatol Sci* 32, 243-246.

Jones MN, 1992. Surfactant interactions with biomembranes and proteins. *Chem Soc Rev* 21:22, 127-136.

Jones PA, Budynsky E, Cooper KJ, Decker D, Griffiths HA, Fentem JH, 2001. Comparative evaluation of five *in vitro* tests for assessing the eye irritation potential of hair-care products. *ATLA* 29, 669-692.

K

Kahn CR, Young E, Lee IH, Rhim JS, 1993. Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: *in vitro* model for ocular studies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34, 3429-3441.

Kappler R, Kristen U, 1987. Photometric quantification of *in vitro* pollen tube growth: a new method suited to determine the cytotoxicity of various environmental substances. *Environmental and Experimental Botany* 27, 305-309.

Kappler R, Kristen U, 1990. INVITTOX Protocol 55: The Pollen Tube Growth Test (PTG-TEST). ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission JRC. Website <http://ecvam-sis.jrc.it>

Kastner W. Local tolerance (animal tests): mucous membranes and skin. En: *Anionic Surfactants*, 2nd edition, ed. Ch Gloxhuber y K Kunstler, Capítulo 5. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, Hong Kong, págs. 127-291 (1992).

Kelly CP, 1989. EYTEX: an *in vitro* method of predicting ocular safety. *Pharmacopeial Forum* 15, 4815-4824.

Kondo T, 1976. Mechanisms of haemolysis by surface active agents. *Adv Colloid and Interface Sci* 6, 139-172 .

Kondo T, Tomizawa M, 1968. Haemolysis by nonionic surface-active agents. *J Pharm Sci* 57, 1246-1248.

Korting HC, Herzinger THA, Kersch A, Angerpointner T, Maibach HI, 1994. Discrimination of the irritancy potential of surfactants *in vitro* by two cytotoxicity assays using normal human keratinocyte, HaCat cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with *in vivo* data from a soap chamber assay. *J Dermatol Sci* 7, 119-129.

Kotani M, Masamoto Y, Watanabe M, 1994. An alternative study of the skin irritant effect of an homologous series of surfactants. *Toxic in Vitro* 8, 229-233.

Kral F, Schwartzman RM, 1964. *Veterinary and Comparative Dermatology*. J.B. Lippincott, Filadelfia.

Kruszewski FH, Walker TL, Ward SL, Dipasquale LC, 1995. Progress in the use of human ocular tissues for *in vitro* alternatives methods. *Comments in Toxicology* 5, 203-224.

Kupper TS, 1989. Mechanisms of cutaneous inflammation: interaction between epidermal cytokines, adhesion molecules and leukocytes. *Arch Dermatol* 125, 1406-1412.

Kupper TS, 1990. Immune and inflammatory process in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 86, 1783-1789.

L

Lee CH, Maibach HI, 1995. The sodium lauryl sulfate model: an overview. *Contact Dermatitis* 33, 1-7.

Leighton J, Nassauer J, Tchao R, 1985. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food and Chemical Toxicology* 23, 293-298.

Levin CY, Maibach HI, 2002. Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? *Int Immunopharmacol* 2, 183-189.

Lewandowski H, Schwuger MJ. 2nd edition (2003). Chapter 13: α -Sulfomonocarboxylic esters. En: *Novel surfactants. Preparation, applications, and biodegradability*, vol. 114. Ed. K Holmberg. Inc, Marcel Dekker, New York.

Lewis W, 1994. INVITTOX Protocol 99: Red Blood Cell Lysis and Protein Denaturation. ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission JRC. Website <http://ecvam-sis.jrc.it>

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D, 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69, 581-593.

López O, Cócera M, de la Maza A, Coderch L, Parra JL, 2000. Different stratum corneum lipid liposomes as models to evaluate the effect of sodium dodecyl sulfate. *Biochim Biophys Acta* 1508, 196-209.

Luepke NP, 1985. Hen's Egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* 23, 287-291.

M

Martin S, Parton RG, 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 373-378.

Martínez V, Corsini E, Mitjans M, Pinazo A, Vinardell MP, 2006. Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different *in vitro* endpoints as alternatives to the *in vivo* assays. *Toxicol Lett* 164, 259-267.

Martínez V, Sánchez L, Busquets MA, Infante MR, Vinardell MP, Mitjans M, 2006. Disturbance of erythrocyte lipid bilayer by amino acid-based surfactants. *Amino Acids* (en prensa, doi: 10.1007/s00726-006-0447-2).

McConnell HM, Owicki JC, Parce JW, Miller DL, Baxter GT, Wada HG, Pitchford S, 1992. The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science*, New York 257, 1906-1912.

McDonald TO, Seabaugh V, Shadduck JA, Edelhauser HF (1987). Eye irritation. En: *Dermatotoxicology*. Eds. FN Marzulli, HI Maibach. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, págs. 641-696.

McKenzie RC, Sauder DN, 1990. The role of keratinocytes cytokines in inflammation and immunity. *Journal of Investigative Dermatology* 95, 1055-1075.

Mitjans M, Martínez V, Clapés P, Pérez L, Infante MR, Vinardell MP, 2003. Low potential ocular irritation of arginine-based surfactants and their mixtures with nonionic and zwitterionic surfactants. *Pharm Res* 20, 1697-1701.

Morán C, Infante MR, Clapés P, 2001. Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of *rac*-1-*O*-(*N*^α-acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 2063-2070.

Morán C, Infante MR, Clapés P, 2002. Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 2. Lipase-catalysed synthesis of 1-*O*-lauroyl-*rac*-glycero-3-*O*-(*N*^α-acetyl-L-amino acid) and 1,2-di-*O*-lauroyl-*rac*-glycero-3-*O*-(*N*^α-acetyl-L-amino acid) derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1124-1134.

Morán MC, Pinazo A, Pérez L, Clapés P, Angelet M, García MT, Vinardell MP, Infante MR, 2004. "Green" amino acid-based surfactants. *Green Chem* 6, 233-240.

Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay to cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 5, 55-63.

Muir CK, Flower C, Abb NJ van, 1983. A novel approach to the search for *in vitro* alternatives to *in vivo* eye irritancy testing. *Toxicology Letters* 18, 1-5.

N

Neufahrt A, Förster FJ, Gottschalk K, Leonhardi G, 1978. Long-term tissue culture of epithelial-like cells from human skin (NCTC strain 2544); II. Viscosity changes after enzyme treatment. *Arch Dermatol Res* 261, 27-31.

Neufahrt A, Förster FJ, Heine H, Schaeg G, Leonhardi G, 1976. Long-term tissue culture of epithelial-like cells from human skin (NCTC strain 2544); I. Measurement of viscosity. *Arch Dermatol Res* 256, 255-260.

Nguyen DH, Beuerman RW, De Weber B, Rosdy M (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In *Alternative Methods for the*

new millenium (Eds.: H Salem y SA Katz), Chapter 14, págs. 145-157, FL, USA: CRC Press.

Nicander I, Rantanen I, Rozell BL, Soderling E, Ollmar S, 2003. The ability of betaine to reduce the irritating effects of detergents assessed visually, histologically and by bioengineering methods. *Skin Res Tech* 9, 50-58.

O

OECD (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. OECD Publication Office, Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development

OECD, 2002. Acute dermal irritation/corrosion. Method 404. OECD Guidelines for testing of chemicals.

OECD, 2002. Acute eye irritation/corrosion. Method 405. OECD Guidelines for testing of chemicals.

Ohno Y, Kaneko T, Inoue T, Morikawa Y, Yoshida T, Fuji A, Masuda M, Ohno T, Hayashi M, Momma J, Uchiyama T, Chiba K, Ikeda N, Imanashi Y, Itakagaki H, 1999. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicol in Vitro* 13, 73-98.

Okamoto, Y., Ohkoshi, K., Itagaki, H., Tsuda, T., Kakishima, H., Ogawa, T., Kasai, Y., Ohuchi, J., Kojima, H., Kurishita, A., Kaneko, T., Matsushima, Y., Iwabuchi, Y., Ohno, Y., 1999. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation test for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test. *Toxicol. Vitro* 13, 115-124.

Osborne R, Perkins MA, 1994. An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food Chem Toxicol*, 32, 133-142.

Oser BL, 1987. Toxicology then and now. *Regul Toxicol Pharmacol* 7, 427-443.

P

Pape WJ, Hoppe U, 1991. *In vitro* methods for the assessment of primary local effects of topically applied preparations. *Skin Pharmacol* 4, 205-212.

Pape WJ, Pfannenbecker U, Hoppe U, 1987. Validation of the red blood cell test system as *in vitro* assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol Toxicol* 1, 525-536.

Pape WJW, Pfannenbecker U, 1992. INVITTOX Protocol 37: The Red Blood Cell Test System. ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission JRC. Website <http://ecvam-sis.jrc.it>

Pape WJW, Pfannenbecker U, Argembeaux H, Bracher M, Esdaile DJ, Hagino S, Kasai Y, Lewis RW, 1999. COLIPA validation project on *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (Phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status. *Toxicol in Vitro* 13, 343-354.

Pape WJW, Pfannenbecker U, Hoppe U, 1990. 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.

Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA, 1979. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *P Natl Acad Sci USA* 76, 1162-1166.

Patlewicz G, Rodford R, Walker JD, 2003. QSARs for predicting skin and eye irritation. *Environmental and Toxicological Chemistry* 22, 1862-1869.

Patrick E, Maibach HI (1989). Comparison of the time course, dose response and mediators of chemically induced skin irritation in three species. En: *Current Topics in Contact Dermatitis*, ed. P Frosch, A Dooms-Goosens, R Lachapelle, R Rycroff, and R Scheper, págs. 399-404. Springer-Verlag, Berlín.

Pérez L, García MT, Ribosa I, Vinardell MP, Manresa A, Infante MR, 2002a. Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environ Toxicol Chem* 21, 1279-1285.

Pérez L, Infante MR, Angelet M, Clapés P, Pinazo A, Glycerolipid arginine-based surfactants: synthesis and surface active properties, XV Conference European Colloid and Interface Society, Coimbra, Portugal, septiembre de 2001.

Pérez L, Pinazo A, Vinardell P, Clapés P, Angelet M, Infante MR, 2002b. Synthesis and biological properties of dicationic arginine-diglycerides. *New J Chem* 26, 1221-1227.

Perkins MA, Osborne R, Rana FR, Ghassemi A, Robinson MK, 1999. Comparison of *in vitro* and *in vivo* human skin response to consumer products and ingredients with a range of irritancy potential. *Toxicol Sci* 48, 218-229.

Pfannenbecker U, Ennen J, Wenck H, Diembeck W. Screening of skin irritation potential of surfactants with the red blood cell test. Comparison to EpiDerm™ skin model and human patch test data. 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 2005 Berlin (Germany).

Piera E, Infante MR, Clapés P, 2000. Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnol Bioeng* 70, 323-331.

Ponec M, 1992. *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int J Cosm Science* 14, 245-264.

Porter MR. *Handbook of surfactants*. 2nd edition, Blackie Academic & Professional, London, 1994, págs. 26-93.

Portes P, Grandidier M-H, Cohen C, Roguet R, 2002. Refinement of the EPISKIN™ protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicol in Vitro* 16, 765-770.

Prinsen MK, 1996. The chicken enucleated eye test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food and Chemical Toxicology* 34, 291-296.

Prinsen MK, Koëter HBWM, 1993. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food and Chemical Toxicology* 31, 69-76.

Przestalski S, Sarapuk J, Kleszczynska H, Gabrielska J, Hladyszowski J, Trela Z, Kuczera J, 2000. Influence of amphiphilic compounds on membranes. *Acta Biochim Pol* 47, 627-638.

R

Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE núm. 252.

Rhein LD, Simion FA, 1991. Surfactant interactions with skin. *Surfact Sci Ser* 32, 33-49.

Rhoads LS, Cook JR, Patrone LM, Buskirk RG van, 1993. A human epidermal model can be assayed employing a multiple fluorescent endpoint assay and the CytoFluor 2300. *Journal of Toxicology –Cutaneous and Ocular Toxicology* 12, 87-102.

Ribaud C, Garson J, Doucet J, Leveque JL, 1994. Organization of stratum corneum lipids in relation to permeability: influence of sodium lauryl sulfate and preheating. *Pharm Res* 11, 1414-1418.

Riddell RJ, Clothier RH, Balls M, 1986. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. *Food Chem Toxicol* 24, 469-471.

Robinson MK, Cohen C, de Brugerolle A, Ponc M, Whittle E, Fentem JH, 2002. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food Chem Toxicol* 40, 573-592.

Roggeband R, York M, Pericoi M, Braun W. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. *Food Chem Toxicol* 38, 727-734.

Roguet R, Cohen C, Dossou KG, Rougier A, 1994. EPISKIN, a reconstituted epidermis for assessing *in vitro* the irritancy of topically applied compounds. *Toxicol in Vitro* 8, 49-59.

Rosdy M, Clauss LC, 1990. Complete human epidermal cell differentiation in chemical defined medium at the air-liquid interface on inert filter substrates. *Journal of Investigative Dermatology* 95, 409-414.

- Rosen MJ. Gemini, 1993. A new generation of surfactants. *Chemtech* 23, 30-33.
- Rosen MJ (2004). *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Wiley-Interscience, 3rd edition, New York.
- Rosette C, Karin M, 1996. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274, 1194-1197.
- Rougier A, Cottin M, de Silva O, Roguet R, Catroux P, Toufic A, 1995. *In vitro* methods: their relevance and complementarity in ocular safety assessment. *Lens and Eye Toxicity Research* 9, 239-246.
- Ruckman SA, Rocabayera X, Borzelleca JF, Sandusky CB, 2004. Toxicological and metabolic investigations of the safety of N- α -Lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE). *Food Chem Toxicol* 42, 245-259.
- Ryle CM, Breikreutz D, Stark H-J, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fusening NE, 1989. Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCaT in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 40, 42-54.

S

- Salager, JL. *Surfactants: types and uses*. Firm booklet # E300-A: Teaching aid in surfactant science & engineering. Laboratory of formulation, interfaces rheology and processes. Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, 2002.
- Sánchez L, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP, 2004. Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharm Res* 21, 1637-1641.
- Sánchez L, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP, 2006. Determination of interleukin-1 α in human NCTC 2544 keratinocyte cells as a predictor of skin irritation from lysine-based surfactants. *Toxicol Lett* (en prensa, doi: 10.1016/j.toxlet.2006.08.006).
- Sánchez L, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP, 2006. Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability, *Toxicol Lett* 161, 53-60.
- Scheuplein R, Ross L, 1970. Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis. *J Soc Cosmet Chem* 21, 853-873.
- Schlatter C, Reinhardt CA, 1985. Acute irritation tests in risk assessment. *Food Chem Toxicol* 23, 145-148.
- Secchi A, Deligianni V, 2006. Ocular toxicology: the Draize eye test. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6, 367-372.

Seguer J, Allouch M, Vinardell MP, Infante MR, Mansuy L, Selve C, 1994. Synthesis and evaluation of non-ionic amphiphilic compounds from amino acids: molecular mimics of lecithins. *New J Chem* 18, 765-774.

Shaw AJ, Clothier RH, Balls M, 1990. Loss of trans-epithelial impermeability of a confluent monolayer of Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells as a determinant of ocular irritancy potential. *ATLA* 18, 145-151.

Shibata M, Tsuda T, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, Ichikawa H, Morikawa Y, 1997. Interleukin-1 α and interleukin-8 by human keratinocyte cell culture treated with surfactants. *ATLA* 25, 161-171.

Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK, 1993. Inteleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 90, 6155-6159.

Southee JA, McPherson JP, Osborne R, Carr GJ, Rasmussen E, 1999. The performance of the tissue equivalent assay using the Skin²TM ZK1200 model in the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. *Toxicol in Vitro* 13, 355-373.

Spielmann H, 1992a. Protocolo INVITTOX núm. 47: HET-CAM Test. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission JRC. Sitio web: <http://ecvam-sis.jrc.it>

Spielmann H, 1992b. Protocolo INVITTOX núm. 46: BALB/c 3T3 Cytotoxicity Test. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission JRC. Sitio web: <http://ecvam-sis.jrc.it>

Spielmann H, Kalweit S, Liebsch M, Wirnserberger T, Gerner I, Bertram-Neis E, Krauser K, Kreiling R, Miltenburger HG, Pape W, Steiling W, 1993. Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. *Toxicol in Vitro* 7, 505-510.

Spielmann H, Liebsch M, Kalweit S, Moldenhauer F, Wirnserberger T, Holzhuetter HG, Schneider B, Glaser S, Gerner I, Pape WJW, Kreiling R, Krauser K, Miltenburger HG, Steiling W, Luepke NP, Mueller N, Kreuzer H, Muermann P, Spenger J, Bertram-Neis E, Siegemund B, Wieber FJ, 1996. Results of a validation study in Germany on two *in vitro* alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. *ATLA* 24, 741-858.

Steiling W, 1994. INVITTOX Protocol 96: The Hen's EggTest on the Chorioallantoic Membrane. ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission JRC. Website <http://ecvam-sis.jrc.it>

Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, de Silva O, 1999. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicol in Vitro* 13, 375-384.

Steinhoff M, Luger TA (2004). The skin cytokine network. En: Skin immune system (SIS): Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology, 3rd edition. Ed. JD Bos. Boca Raton, CRC Press LLC, págs. 350-365.

Sugai S, Murata K, Kitagaki T, Tomita I, 1991. Studies on eye irritation caused by chemicals in rabbits. II. An in vitro testing method using rat red blood cells for the prediction of eye irritation potential of chemicals. *J Toxicol Sci* 16, 131-144.

Swanston DW, 1985. Assessment of the validity of animal techniques in eye-irritating testing. *Food Chem Toxicol* 23, 169-173.

T

Thornback-LeCoq SJ, Bettemms M, Zijlstra JA, 1997. Correlation between skin irritation and cytotoxicity. *In Vitro Toxicol* 10, 49-53.

Todaro GJ, Green H, 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.

Todaro GJ, Green H, Goldberg BD, 1963. Transformation of properties of an established cell line by SV 40 and Polyoma Virus. *P Natl Acad Sci USA* 51, 66-73.

Törmä H, Geijer S, Gester T, Alholm K, Berne B, Lindberg M, 2006. Variations in the mRNA expression of inflammatory mediators, markers of differentiation and lipid-metabolizing enzymes caused by sodium lauryl sulphate in cultured human keratinocytes. *Toxicol in Vitro* 20, 472-479.

U

UE, 1986. Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE).

UE, 2000. Directiva 2000/33/CE de la Comisión de 25 de abril de 2000 por la que se adapta por 27a vez al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas.

V

Vallverdú J, 2005. La evolución de la Toxicología: de los venenos a la evaluación de riesgos. *Rev Toxicol* 22, 153-161.

Van de Sandt J, Roguet R, Cohen C, Esdaile D, Ponc M, Corsini E, Barker C, Fusening N, Liebsch M, Benford D, de Brugerolle de Fraissinette A, Fortasch M, 1999. The use of keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *ATLA* 27, 723-743.

Van Haute N, Dooms-Goossens A, 1983. Shampoo dermatitis due to cocobetaine and sodium lauryl ether sulphate. *Contact Dermatitis* 9, 169.

Van Weemen BK, Schuurs AHWM, 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letts* 15, 232-236.

Vinardell MP, García L, 2000. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. *Toxicol in Vitro* 14, 551-555.

Vinardell MP, Infante MR, 1999. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. *Comp Biochem Phys C* 124, 117-120.

W

Wasserman SJ (1983). The mast cell and its mediators. En: *Biochemistry and Physiology of the Skin*, ed. LA Goldsmith, págs. 878-898. Oxford University Press, Nueva York

Wei T, Geijer S, Lindberg M, Berne B, Törmä H, 2006. Detergents with different chemical properties induce variable degree of cytotoxicity and mRNA expression of lipid-metabolizing enzymes and differentiation markers in cultured keratinocytes. *Toxicol in Vitro* (en prensa, doi: 10.1016/j.tiv.2006.06.002).

Welss T, Basketter DA, Schroder KR, 2004. *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol in Vitro* 18, 231-243.

Wilhelm KP, Bottjer B, Siegers CP, 2001. Quantitative assessment of primary skin irritants *in vitro* in a cytotoxicity model: comparison with *in vivo* human irritation test. *Br J Dermatol* 145, 709-715.

Wilhelmus KR, 2001. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol* 45, 493-515.

Willis CM, Stephens CJM, Wilkinson JD, 1989. Epidermal damage induced by irritants in man: a light and electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 93, 695-699.

Willis CM, 2002. Variability in responsiveness to irritant: thoughts on possible underlying mechanisms. *Contact Dermatitis* 47, 267-271.

Worth AP, Balls M, 2001. The importance of the prediction model in the validation of alternative tests. *ATLA* 29, 135-141.

Worth AP, Balls M, eds. (2002). *Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects. A report prepared by ECVAM and the ECVAM working group on chemicals. ATLA* 30, Suppl. 1, 1-115.

Y

York M, Griffiths HA, Whittle E, Basketter DA, 1996. Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. *Contact Dermatitis* 34, 204-212.

York M, Steiling W, 1998. A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. *J Appl Toxicol* 18, 233-240.

Z

Zana R (1997). Bolaform and dimeric (gemini) surfactants. Ed. D Robb. *Specialist Surfactants*. 1st edition, Blackie Academic, London, UK, págs. 81-103.

Zavodnik IB, Zaborowski A, Niekurzak A, Bryszewska M, 1997. Effect of free acids on erythrocyte morphology and membrane fluidity. *Biochem Mol Biol Int* 42, 123-133.

Zuang V, 2001. The neutral red release assay: a review. *ATLA* 29, 575-599.

Zuang V, Balls M, Botham PA, Coquette A, Corsini E, Curren RD, Elliott GR, Fentem JH, Heylings HR, Liebsch M, Medina J, Roguet R, van de Sandt H, Wiemann C, Worth AP, 2002. Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* 30, 109-129.

BIBLIOGRAFÍA

Harry Salem, Sidney A Katz (Eds.) (2003). Alternative toxicological methods. CRC Press, Florida.

Burkitt HG, Young B, Heath JW (1993). Histología funcional. 3ª Ed. Alhambra Longman.

Nevell FW (1996). Ophtalmology: Principles and Concepts. 8ª Ed. St Louis: Mosby.

Russel WMS, Burch RL (1959). The Principles of Human Experimental Techniques, Methuen, London.

Tadros F (2005). Applied Surfactants: Principles and Applications, John Wiley and Sons Inc.

Tortora GJ, Derrickson B (2006). Principios de anatomía y fisiología. 11ª Ed. Panamericana.

ANEXO |

Publicaciones originadas a partir de los resultados obtenidos en esta tesis

Parte de los resultados derivados de la realización de este trabajo de investigación han dado lugar a cuatro artículos publicados en revistas científicas y que se muestran en este anexo.

Publicación 1

Martínez V, Mitjans M, Corsini E, Pinazo A, Vinardell MP, 2006. Evaluation of eye and skin irritation of arginine derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays. *Toxicology Letters* 163, 259-267.

Publicación 2

Benavides T, Martínez V, Mitjans M, Infante MR, Morán C, Clapés P, Clothier R, Vinardell MP, 2004. Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. *Toxicology* 201, 87-93.

Publicación 3

Benavides T, Mitjans M, Martínez V, Clapés P, Infante MR, Clothier RH, Vinardell MP, 2004. Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. *Toxicology* 197, 229-237.

Publicación 4

Mitjans M, Martínez V, Clapés P, Pérez L, Infante MR, Vinardell MP, 2002. Low Potential Ocular Irritation of Arginine-Based Gemini Surfactants and their Mixtures with Non-ionic and Zwitterionic Surfactants Determined by the Red Blood Cell Assay as Alternative to the Draize Test. *Pharmaceutical Research* 20, 1697-1701.



Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays

V. Martinez^a, E. Corsini^b, M. Mitjans^a, A. Pinazo^c, M.P. Vinardell^{a,d,*}

^a Dept. Fisiologia, Facultat de Farmacia (UB), Av Joan XXIII, s/n, 08028, Barcelona, Spain

^b Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Via Balzaretti 9, 20133 Milan, Italy

^c Dept. Tecnología de Tensioactivos, IIQA-CSIC, Jorge Girona, Barcelona, Spain

^d Unidad Asociada CSIC-8004, Spain

Received 9 November 2005; received in revised form 11 January 2006; accepted 12 January 2006

Available online 10 February 2006

Abstract

Arginine-derivative surfactants constitute a novel class of surfactants, which can be regarded as an alternative to conventional surfactants. Prior to human exposure, it is necessary to assess their irritation potential. The classical in vivo evaluation of the irritancy potential via the Draize test has been extensively criticized. In that regard, a great number of in vitro alternatives have been developed. Erythrocytes were chosen as the target cells for eye irritation assessment and hemolysis and hemoglobin denaturation were selected as appropriate endpoints. For skin irritancy assessment, the keratinocyte cell line NCTC 2544 was used and different in vitro endpoints were measured: two cytotoxicity assays (NRU and MTT) and the synthesis of the proinflammatory cytokine IL-1alpha. The eye and skin Draize tests were also performed for comparative purposes. The results point out that, according to in vivo and in vitro assays, the new arginine-derivative surfactants have lower eye and skin irritation potential than the synthetic surfactant SDS. Furthermore, in vitro methods were also able to detect differences in irritancy among the new surfactants not noticeable by the Draize tests, indicating that in vitro methods can be more sensitive than the in vivo test, offering the opportunity to detect subtle differences in irritancy.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Arginine-derivative surfactant; Skin irritation; Eye irritation; Cytotoxicity; Cytokine; IL-1alpha

1. Introduction

Surfactants, due to their surface or interface activities, are among the most versatile and frequently used excipients in cosmetic and pharmaceutical products. However, the application of pharmaceutical or cosmetic prepa-

rations containing these compounds may result in eye and skin irritation or other side reactions (Barany et al., 1999). As a consequence, it is of great interest to identify surfactants with low irritant properties, and during this screening process, it is also necessary to have rapid assays to assess potentially damaging effects. The evaluation of the irritant potential of chemicals in vivo is traditionally conducted in animals, particularly in rabbits using the Draize test method (Draize et al., 1945). However, due to increasing concern over animal use and in light of its potential ban in the near future, alongside with the obvious ethical implications of using directly human subjects, in vitro alternative

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 45 05; fax: +34 93 403 59 01.

E-mail addresses: veronicamartinez@ub.edu (V. Martinez), emanuela.corsini@unimi.it (E. Corsini), montsemitjans@ub.edu (M. Mitjans), apgste@iiqab.csic.es (A. Pinazo), mpvinardellmh@ub.edu (M.P. Vinardell).

methods should now be encouraged (Eun and Suh, 2000).

Different *in vitro* approaches have been proposed for assessing eye irritation as an alternative to the Draize eye irritation test, including the use of cultured cells, isolated organs, or fertilized hen eggs (Herzinger et al., 1995). The red blood cell lysis assay (RBC) (Pape et al., 1987) is a specific *in vitro* tool for evaluating the acute irritation potential induced by surfactants or surfactant-containing preparations and has been proposed as a reliable alternative to the Draize test for this class of chemicals (Pape and Hoppe, 1991; Sugai et al., 1991). This assay presented a sensitivity and specificity exceeding 80% and showed the least discordance with the Draize eye test in different validation studies (Brantom et al., 1997; Balls et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Hatao et al., 1999; Pape et al., 1999). It distinguishes damage to the membrane and damage to proteins as endpoints that correlate with lesions on the conjunctiva, iris and cornea in the rabbit eye.

The skin is highly complex and heterogeneous in both histological and cellular terms. The mechanism by which surfactants cause skin irritation is not fully understood. Factors contributing to their irritation potential include (a) direct action on the stratum corneum components (lipids and proteins), (b) interaction with living epidermal cells altering their proliferative capacity and (c) action on dermal components inducing mediator release and inflammation. No single *in vitro* model and no single assay will be able to mimic all the events that occur *in vivo* in the human skin, thus, a battery of methods may be useful to evaluate irritation of pharmaceutical and cosmetic ingredients.

Human keratinocytes have become the focus of attention in skin irritation by virtue of its epidermal location, its importance in maintaining the integrity of the stratum corneum barrier, and its ability to produce a wide range of inflammatory mediators. Previous studies have suggested that cultured normal human keratinocytes may be predictive of irritancy caused by various surfactants in human subjects (Korting et al., 1994) and the response of these cultures showed a good correlation with *in vivo* skin irritation data (Osborne and Perkins, 1994; Benassi et al., 1999; Wilhelm et al., 2001). Cell cytotoxicity assays are amongst the most common *in vitro* endpoints used to predict the toxicity of a substance in cell culture. Besides, the major mechanisms used by epidermal cells to participate in immune and inflammatory skin reactions are the production of cytokines and responses to cytokines (William and Kupper, 1996). Keratinocytes contain large quantities of biologically active IL-1 α which can be released in response to a range of stimuli.

The hypothesis is that every time the epidermis is damaged, active IL-1 α is released, as a primary event in skin defence (Nickoloff et al., 1990). IL-1 α is widely accepted as such an early marker for irritation both *in vivo* and *in vitro* test systems (Muller-Decker et al., 1994; Corsini et al., 1996; Corsini and Galli, 1998).

The potential of a chemical to elicit an irritative response can thus be successfully predicted using appropriate endpoints because they parallel the degree of damage caused by the chemical (Sánchez et al., 2004).

The research of new surfactants with low irritancy potential derived from amino acids is of great interest (Benavides et al., 2004; Mitjans et al., 2003; Xia et al., 1995). Amino acid and peptide lipid conjugates constitute an interesting class of surfactants with good surface properties, antimicrobial activity and high biodegradability.

The purpose of this work was to evaluate the potential eye or skin irritation of new arginine-derivative surfactants and a mixture of these compounds using different *in vitro* assays for comparing with the *in vivo* results. For predicting eye irritation the red blood cell test was used and for skin irritation a keratinocyte cell line (NCTC 2544) was employed taking into account different endpoints, such as cell viability and IL-1 α production.

2. Materials and methods

2.1. Materials

L-Arginine monohydrochloride, methanol and sodium dodecyl sulphate (SDS) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Fatty acids mixture was kindly supplied by Cailà and Parés (Barcelona, Spain). RPMI 1640 medium without glutamine, RPMI 1640 without phenol red and glutamine, L-glutamine, phosphate buffered saline (PBS), trypsin/EDTA and fetal bovine serum (FBS) were supplied by Reactiva (Beit Haemek, Israel). Neutral Red (NR) dye, MTT salt, dimethylsulphoxide (DMSO) were supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Penicillin (10,000 U/ml), streptomycin (10,000 μ g/ml) mixture were purchased from Bio-Whittaker (Verviers, Belgium). 75 cm² culture flasks, 24-well and 96-well plates were obtained from TPP (Trasadingen, Switzerland).

2.2. Animals

Rabbits (New Zealand, white, male, 10 weeks old, and approximately 2.0 kg body weight) were purchased from a local supplier (Granja San Bernardo, Navarra, Spain).

2.3. Synthesis of surfactants

Three different N $^{\alpha}$ -acyl arginine derivatives were tested. N $^{\alpha}$ -lauroyl-L-arginine methyl ester (LAM), N $^{\alpha}$ -myristoyl-

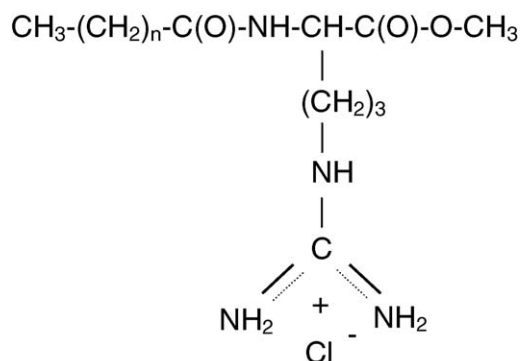


Fig. 1. Molecular structure of arginine-derivative surfactants. n represents the fatty acyl chain length (LAM: $n = 10$; MAM: $n = 12$; mixture: $n = 6$ (5.8%), 8 (4.6%), 10 (53.0%), 12 (18.1%), 14 (8.7%), 16 (9.5%).

L-arginine methyl ester (MAM) and a mixture of different N^α -acyl-L-arginine methyl derivatives (Fig. 1). LAM and MAM were synthesized in our laboratory as previously described (Infante et al., 1984, 1988). The surfactant mixture was synthesized for the first time in our laboratory using a fatty acid mixture from coconut extract (caprylic acid, 5.84%; capric acid, 4.62%; lauric acid, 53.04%; myristic acid, 18.12%; palmitic acid, 8.68%; stearic acid, 9.47%). The procedure used was the introduction of fatty acid residues as acid chlorides (Sims and Fioriti, 1975).

2.4. Red blood cell assay

2.4.1. Preparation of erythrocyte suspensions

Human blood was obtained from the Blood Bank of the Hospital Clinic (Barcelona, Spain). The erythrocytes were washed three times in saline solution (0.9% NaCl). The cells were then suspended at a cell density of 8×10^9 cell/ml.

2.4.2. Hemolysis assay

Different volumes ranging from 10 to 80 μl of surfactant solution (from 1 mg/ml) were introduced in polystyrene tubes to assay various concentrations (from 5 to 1000 $\mu\text{g/ml}$) of these surfactants. Aliquots of 25 μl of erythrocyte suspension were added to the tubes and incubated for 10 min, with constant shaking, at room temperature. After incubation, the tubes were centrifuged (5 min at $1500 \times g$), and, finally, the percentage of hemolysis was determined by comparing the samples totally hemolyzed with distilled water (Pape et al., 1987). From the hemolysis results, the dose–response curve was determined, and the concentration that induces the hemolysis of 50% of the cells (HC_{50}) in the erythrocyte suspension was subsequently calculated.

2.4.3. Potential ocular irritation

The potential ocular irritation of the surfactants was studied with a method based on the use of red blood cells to quantify adverse effects of surfactants and detergents products on the cytoplasmic membrane (hemolysis) in combination with the

damage to liberated cellular proteins (denaturation). The irritation index was determined according to the lysis/denaturation ratio (L/D) obtained dividing the HC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) by the denaturation index (DI) of each surfactant was determined by comparing the hemoglobin denaturation induced by the surfactant and SDS as positive control. Hemoglobin denaturation was determined after inducing hemolysis by adding 10 mg/ml of the surfactant or SDS and measuring the absorption ratio of the supernatant at 575 and 540 nm. The resulting L/D ratio is used instead of the ocular irritancy score in the acute phase of in vivo evaluation. The surfactants can be classified according to this L/D ratio as non-irritant (>100), slight irritant (>10), moderate irritant (>1), irritant (>0.1), and very irritant (<0.1) (Pape et al., 1987).

2.4.4. Culture of NCTC 2544 cells

The keratinocyte cell line NCTC 2544 was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and 1% penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin (10,000 $\mu\text{g/ml}$) and maintained at 37 °C, 5% CO_2 . For experiments, the cells were grown to confluency in 24-well or 96-well plates and then incubated at 37 °C, 5% CO_2 for 24 h.

2.5. Cytotoxicity assays

2.5.1. Chemical exposure

Cells were exposed to increasing concentrations (from 7 to 500 $\mu\text{g/ml}$) of the surfactants (sterilized by filtration) dissolved in RPMI medium supplemented with 5% FCS, 2 mM glutamine, and 1% antibiotic mixture. Controls, containing culture medium only, were included in each plate. Cells were then incubated at 37 °C, 5% CO_2 for 24 h.

2.5.2. NRU assay

The NRU assay was performed as described by Borenfreund and Puerner (1985) modified to remove the use of formaldehyde (Riddell et al., 1986). Following treatment, the medium was removed and Neutral Red solution (50 $\mu\text{g/ml}$ in culture medium) was added. After 3 h of incubation at 37 °C, 5% CO_2 medium was removed, cells were washed twice with PBS and a solution containing 50% ethanol absolute–1% acetic acid in distilled water was added to extract the dye. After 10 min on a microtitre-plate shaker, the absorbance of neutral red was measured at a wavelength of 550 nm in a Bio-Rad 550 microplate reader. Results are expressed as percentage of control.

2.5.3. MTT assay

The MTT assay was performed according to the method of Mosmann (1983). After treatment with the surfactants, medium was removed and replaced with 100 μl per well of the MTT solution (dissolved at 5 mg/ml in PBS and diluted 1:10 in cell culture medium without phenol red). At the end of the 3 h incubation, cultures were washed once with PBS and 100 $\mu\text{l/well}$ of dimethylsulphoxide (DMSO) was added to dissolve the purple formazan product while shaking for 10 min at room

temperature. The absorbance of the resulting solutions was read at a wavelength of 550 nm in a Bio-Rad 550 microplate reader. Results are expressed as percentage of control.

2.6. IL-1alpha determination

2.6.1. Chemical exposure

Various concentrations of the surfactants dissolved in phosphate buffered saline solution (PBS) were used. The chemicals or vehicle controls were applied to the cell culture (24-well plates) in a volume of 300 μ l per well. After 24 h of exposure, conditioned medium was recovered, centrifuged and used for the determination of extracellular IL-1alpha (IL-1alpha release). Monolayers were washed with PBS, then lysed in 300 μ l of PBS containing 0.5% of Triton X-100 and used for the determination of intracellular IL-1alpha (cell-associated IL-1alpha). IL-1alpha was determined by specific ELISA.

2.6.2. IL-1alpha ELISA

Costar 3690 plates (Costar, Cambridge, MA) were coated overnight at room temperature with 0.1 ml of monoclonal anti-human IL-1alpha antibody (Pierce Endogen) diluted to 1.5 μ g/ml in PBS. The washed plates were blocked with 0.2 ml of PBS containing 4% bovine albumin for 1 h at room temperature. Then, 0.05 ml samples or recombinant human IL-1alpha was added to each well and incubated with 0.05 ml of the biotinylated anti-human IL-1alpha antibody diluted to 0.4 μ g/ml in PBS during 2 h at room temperature. After three washes, 0.1 ml of the complex HRP–streptavidin diluted 1:16,000 was added and incubated for 30 min at room temperature. TMB was used as a substrate. The absorbance was measured at 595 nm. The limit of sensitivity for this assay was 15 pg/ml. Results are expressed in pg/ml.

2.7. LDH leakage

LDH leakage was determined in the conditioned medium 24 h after treatment using a commercially available kit (Takara) according with the instructions provided by the manufacturer. Results are expressed as percentage of control.

2.8. Protein determination

The protein content of the cell lysate was determined using a commercial kit (Biorad, Richmond, CA) based on the method described by Bradford (1976).

2.9. Draize's test

Experimental animal management was carried out in accordance with the Animal Experimentation Ethical Committee Guidelines of the Universitat de Barcelona.

2.9.1. Acute eye irritation

About 0.1 ml aqueous solution of the test substances was applied to the right eyes of male New Zealand white rabbits.

Left eyes remained untreated as a control. Eyes were observed after 4 h of surfactant exposure. Three rabbits were used for each test substance. Cornea, conjunctiva and iris lesions were scored and recorded according to the grades described in the OECD Guideline 405 (2002) and the maximal average score (MAS) was calculated.

2.9.2. Acute dermal irritation

Primary skin irritation was evaluated in albino rabbits using the visual Draize scores (Draize et al., 1944). The substances tested were applied in a single dose to the skin of three animals, untreated areas of the test animals serving as a control. Approximately 24 h before the test, fur was removed by close-clipping the dorsal area of the trunk of the animals. A dose of 0.5 ml of each surfactant was applied to a small area (approximately 6 cm²) of skin and covered with a gauze patch during an exposure period of 4 h. The visual Draize scores were determined 24 h after patch removal. Dermal irritation was scored and recorded according to the grades described in the OECD Guideline 404 (2002).

2.10. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E. of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's *t*-test, Dunnett's multiple comparison tests or one-way analysis of variance (ANOVA) using the SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) as indicated.

3. Results

3.1. Red blood cell test

Table 1 shows the HC₅₀ values, the denaturation index (DI), the lysis/denaturation ratio (L/D), and the potential ocular irritation of the different surfactants. The new arginine-derivative surfactants showed lower hemolytic activities and lower capability to denature hemoglobin in comparison with SDS. SDS is an anionic tenside widely used as a reference compound for studying acute irritation (Effendy and Maibach, 1995). According to L/D

Table 1
HC₅₀ values, denaturation index (DI), lysis/denaturation ratio (L/D) and classification of the surfactants by their potential ocular irritation according to their L/D ratio

Surfactant	HC ₅₀ (μ g/ml)	DI (%)	L/D	Classification
LAM	58.8 \pm 3.6*	22.5 \pm 1.9	2.6	Moderate irritant
MAM	52.4 \pm 3.4*	6.21 \pm 0.5	8.4	Moderate irritant
Mixture	63.9 \pm 8.6*	1.68 \pm 0.4	37.9	Slightly irritant
SDS	43.6 \pm 1.5 ^a	100	0.4	Irritant

The results are expressed as mean \pm S.E. of three experiments.

^a Benavides et al. (2004).

* Statistically different from SDS (Student's *t*-test, *p* < 0.05).

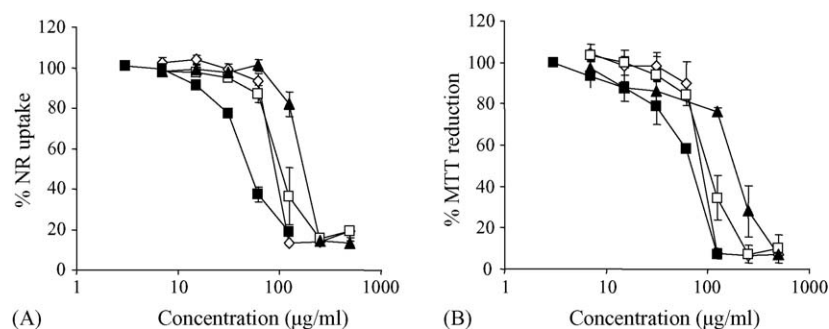


Fig. 2. Comparative cytotoxicity of the compounds LAM (\diamond), MAM (\square), mixture (\blacktriangle), and SDS (\blacksquare) in human keratinocytes NCTC 2544 as detected with NRU (A) and MTT (B) assays. Results are expressed as mean \pm S.E. ($n = 3$).

ratio, LAM and MAM were classified as moderate irritants, the mixture as slightly irritant, and SDS as irritant.

3.2. Cytotoxicity of surfactants in NCTC 2544 as determined by MTT and NRU assays

The effect of the new surfactants on cell membrane integrity was assessed using the NRU method and the MTT method and SDS was used as a reference compound. Both the NRU and MTT methods have been used as indirect measures of cell viability. The cells were exposed to a wide concentration range of each surfactant for 24 h.

The results relative to NRU and MTT assay are reported in Fig. 2. A clear dose–response relationship was established for all test substances. Uptake of neutral red dye by lysosomes and the reduction of the formazan salt decreased with increasing surfactant concentration. The calculated IC_{50} values (the concentration to inhibiting viability to 50%) are reported in Table 2. All arginine-derivatives surfactants tested showed higher IC_{50} values than SDS. The differences were statistically significant ($p < 0.05$) except in the case of the MTT assay for LAM which could be attributed to the high standard deviation.

3.3. Synthesis of the proinflammatory cytokine IL-1alpha

Cultured cells were exposed to a concentration range of each compound and the IL-1alpha production was assessed. Untreated cells were included as a control in each assay. The intracellular content of IL-1alpha and the release of this cytokine to the culture medium were measured by ELISA. The intracellular amount of IL-1alpha was standardized with the total protein content and the results were expressed in picogram of cytokine per microgram of protein.

The concentrations of the compounds were selected according to preliminary experiments where the LDH

activity was determined in the culture medium as an indicator of cell viability. Three different surfactant concentrations were selected according to their LDH leakage (Fig. 3). The results related to the cell-associated IL-1alpha (presented in Fig. 4) showed a concentration dependent profile for all the compounds. SDS was the surfactant with the highest capability of increasing this proinflammatory cytokine. The concentration that induces an increase of 50% in cell-associated IL-1alpha (EC_{50}) was calculated for comparative purposes. The EC_{50} values (Table 2) revealed that new surfactants are less potent than SDS to stimulate the synthesis of IL-1alpha, and the mixture was the compound that showed the highest EC_{50} .

The results concerning the release of IL-1alpha in culture medium are presented in Fig. 5. For all the compounds tested, only the highest concentration induced a significant IL-1alpha release. As the LDH leakage assay, the IL-1alpha release was used as indicator of cell via-

Table 2
Cytotoxicity of surfactants (IC_{50}) and cell-associated IL-1alpha increase (EC_{50}) in NCTC 2544 cells and classification of surfactants according to Draize test

Surfactant	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		EC_{50}^a ($\mu\text{g/ml}$)	Draize
	NRU	MTT		
LAM	$77.7 \pm 6.3^*$	63.4 ± 12.6	21.3	Slightly irritant ^b
MAM	$86.7 \pm 2.7^*$	$80.4 \pm 3.3^*$	28.6	Slightly irritant ^b
Mixture	$201.5 \pm 4.7^*$	$122.6 \pm 4.8^*$	71.6	Slightly irritant ^b
SDS	53.5 ± 0.7	44.7 ± 1.7	7.6	Moderate irritant ^c

IC_{50} values are expressed as mean \pm S.E. of three experiments.

^a Concentration of each surfactant to increase cell-associated IL-1alpha by 50%.

^b Classification according visual Draize scores presented in Table 4.

^c Classification based on literature (Duffy et al., 1986).

* Statistically different from SDS (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

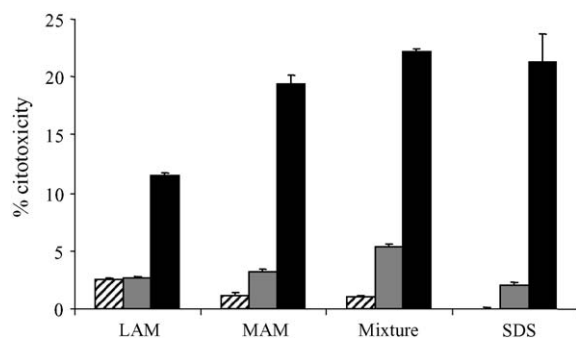


Fig. 3. Cytotoxicity rates measured by the LDH assay. The concentrations tested were 10, 15 and 30 $\mu\text{g/ml}$ for LAM; 10, 15 and 30 $\mu\text{g/ml}$ for MAM; 50, 80 and 120 $\mu\text{g/ml}$ for the mixture; 10, 15 and 25 $\mu\text{g/ml}$ for SDS.

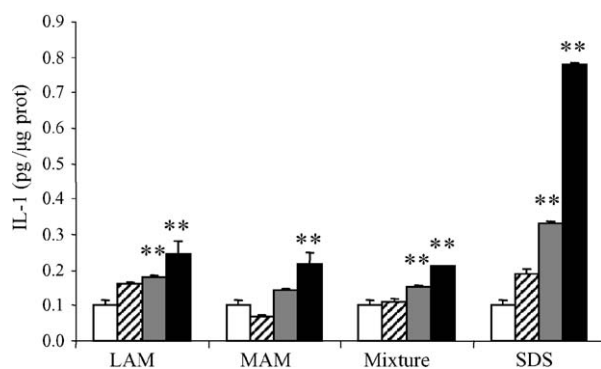


Fig. 4. The treatment with surfactants stimulated keratinocytes to synthesize IL-1 α . The concentrations assayed were 0, 10, 15 and 30 $\mu\text{g/ml}$ for LAM; 0, 10, 15 and 30 $\mu\text{g/ml}$ for MAM; 0, 50, 80 and 120 $\mu\text{g/ml}$ for the mixture; 0, 10, 15 and 25 $\mu\text{g/ml}$ for SDS. (**Significantly different from control ($p < 0.01$), Dunnett's test.)

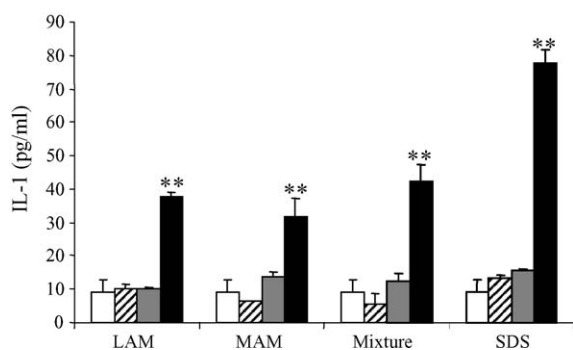


Fig. 5. The treatment with surfactants induced the release of IL-1 α to the culture medium. The concentrations assayed were 0, 10, 15 and 30 $\mu\text{g/ml}$ for LAM; 0, 10, 15 and 30 $\mu\text{g/ml}$ for MAM; 0, 50, 80 and 120 $\mu\text{g/ml}$ for the mixture; 0, 10, 15 and 25 $\mu\text{g/ml}$ for SDS. (**Significantly different from control ($p < 0.01$), Dunnett's test.)

Table 3

Maximal average score of surfactants and their classification according OECD guideline 405

Surfactant	MAS	Classification
LAM 2%	20.0 \pm 3.3	Slightly irritant
MAM 2%	17.4 \pm 2.8	Slightly irritant
Mixture 2%	20.0 \pm 1.0	Slightly irritant

The results are expressed as mean \pm S.E. of three animals.

Table 4

Dermal irritation scores of surfactants in terms of erythema and edema

Surfactant	Erythema	Edema
LAM 5%	0.83 \pm 0.31	0.33 \pm 0.21
MAM 5%	0.67 \pm 0.33	0.67 \pm 0.33
Mixture 5%	1.67 \pm 0.33	0.67 \pm 0.33

The results are expressed as mean \pm S.E. of three animals.

bility. Given membrane leakage is required, both assays were used to detect cells in the last stages of cell death.

3.4. In vivo testing

MAS were determined for the new surfactants after 4 h of exposure as shown in Table 3. All the compounds caused slight irritation in the rabbit eye with no appreciable differences among them.

Table 4 shows visual Draize scores for erythema and edema 24 h after removal of surfactant treated patches. The arginine-derivative surfactants caused slight erythema and edema.

According the 3Rs principle, SDS was not tested in this study because its irritant effect on the eye and skin is widely described in the literature (Duffy et al., 1986; Pape et al., 1987, 1999) and its evaluation is not justified.

4. Discussion

The use of surfactants in everyday life is almost unavoidable. The development of less irritant, less toxic, consumer-friendly single surfactants or surfactant systems is, therefore, of general interest. Arginine-derivative surfactants constitute a novel class of bio-based surfactants. They can be regarded as an alternative to conventional synthetic surfactants due to their multifunctionality and the renewable source of raw materials used during the synthesis process. These characteristics make them candidates of choice as additives in pharmaceutical, food and cosmetic formulations. Due to their potential application it is necessary to evaluate their adverse local irritation potential.

The classical *in vivo* evaluation of the irritancy potential using the Draize test has been extensively criticized. Among the deficiencies of the Draize tests are the inability to obtain important information concerning potential mechanisms of toxicity of test chemicals, inadequate objectivity in obtaining irritancy scores, irreproducibility of results, and increased public desire to minimize animal testing (Earl et al., 1997; Basketter et al., 1997). Furthermore, the Draize test has sometimes failed to identify problems which have occurred later in humans (Lovell, 1996). In that regard, a great number of *in vitro* alternatives have been proposed to replace the *in vivo* testing.

Erythrocytes have been suggested as a readily available and good target for ocular irritation assessment (Pape et al., 1987). The red blood cell test quantifies adverse effects of surfactants on the cytoplasmic membrane (hemolysis) in combination with the damage of liberated cellular proteins (denaturation). These two endpoints could be correlated with the damage observed in the conjunctiva (hemolysis) and the corneal opacity (denaturation). The new arginine-derivative surfactants showed less capability to induce hemolysis when comparing with SDS although there is no great difference among HC_{50} values. However, the denaturation index is markedly lower in the three new surfactants compared with SDS. According to this procedure the mixture is classified as a slightly irritant whereas LAM and MAM are moderate irritants. This difference among the mixture and the pure surfactants was not detected in the rabbit eye. The new compounds can be classified as slightly ocular irritants with no statistically differences in the calculated MAS. This fact points out the inability of the Draize test to detect differences among surfactants that have a similar irritation potential although differences exist. Thus, *in vitro* testing seems to be more sensitive to detect subtle differences in irritancy than *in vivo* visual scores.

Keratinocytes are a biologically relevant target for the developing of *in vitro* techniques for assessing skin irritants (Van de Sandt et al., 1999). The material required for primary culture cells is limited and variable, thus, the use of immortalized cell lines could be a valuable alternative (Eun and Suh, 2000; Korting et al., 1994). However, the barrier function of the stratum corneum is essential in a model for predicting potential irritation *in vivo*. Keratinocytes monolayers are very sensitive, because of the lack of the stratum corneum. Despite this deficiency, this model can be useful for demonstrating a lack of irritancy potential of water-soluble and non-cytotoxic materials (Van de Sandt et al., 1999).

In vitro cytotoxicity has been found to predict skin irritation potential to a large extent (Babich et al., 1987; Osborne and Perkins, 1991; Ward et al., 1994) and the release of inflammatory mediators from keratinocytes cultures has been proposed as an *in vitro* approach for the assessment of surfactant-induced irritation (Corsini et al., 1996; Muller-Decker et al., 1994; Ward et al., 1998).

The two cytotoxicity assays used in this work (NRU and MTT) and IL-1 α production provided clear discrimination among the new surfactants and SDS. SDS was able to increase four-folds the intracellular amount of IL-1 α in the keratinocyte culture whereas the new surfactants increased this amount from one- to two-folds. Furthermore, the concentration necessary to increase in 50% the IL-1 α amount (EC_{50} shown in Table 2) is markedly lower for the SDS. This result is consistent with the classification according to the Draize test where SDS is considered as a moderate irritant and the new surfactants as slightly irritants.

As with RBC assay, the differences in EC_{50} values for IL-1 α production found *in vitro* among LAM and MAM in comparison with the mixture were not detected with the *in vivo* test supporting the idea that the *in vitro* assays are more sensitive than *in vivo* testing. The *in vitro* techniques indicated the mixture as the less irritant compound in comparison with LAM and MAM. These results are in accordance with results published previously by our (Mitjans et al., 2003) and other groups (Benassi et al., 2003), where mixtures of surfactants had reduced irritant potential in comparison with the single surfactants presents in the mixture. In most practical applications, mixtures of surfactants rather than individual surfactants are used. This is because mixing surfactants with different hydrophobic and hydrophilic groups enhances the performance of the final product. This occurs when synergism exists between the surfactants present in the mixture (Hines, 2001). Mixtures of different kinds of surfactants are particularly attractive because the performance of the final product is superior to those of the individual surfactants, thus increasing the range of applications.

In summary, according to the Draize tests and the *in vitro* assays, the new arginine-derivative surfactants have lower eye and skin irritation potential than the synthetic surfactant SDS representing a promising alternative to other commercial surfactants in cosmetic and pharmaceutical formulations.

Acknowledgements

This research was supported by the Project PPQ-2003-01834 from MCTE (Spain). Veronica Martinez

holds a doctoral grant from the University of Barcelona (Spain).

References

- Babich, H., Martin-Alguacil, N., Borenfreund, E., 1987. Comparisons of the cytotoxicities of dermatotoxicants to human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Altern. Meth. Toxicol.* 7, 153–167.
- Balls, M., Berg, N., Bruner, L.H., Cureen, R., deSilva, O., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Fentem, J.H., Liebsch, M., Ohno, Y., Prinsen, M.K., Spielmann, H., Worth, A.P., 1999. Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop 34. *ATLA* 27, 53–77.
- Barany, E., Lindberg, M., Loden, M., 1999. Biophysical characterization of skin damage and recovery after exposure to different surfactants. *Contact Dermat.* 40, 98–103.
- Basketter, D.A., Reynolds, F.S., York, M., 1997. Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis. *Clin. Dermatol.* 15, 637–644.
- Bradford, M.A., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Benassi, L.C., Bertazzoni, G., Seidenari, S., 1999. In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers. *Contact Dermat.* 40, 38–44.
- Benassi, L.C., Bertazzoni, G., Magnoni, C., Rinaldi, M., Fontanesi, C., Seidenari, S., 2003. Decrease in toxic potential of mixed tensides maintained below the critical micelle concentration: an in vitro study. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16, 156–164.
- Benavides, T., Mitjans, M., Martínez, V., Clapés, P., Infante, M.R., Clothier, R.H., Vinardell, M.P., 2004. Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. *Toxicology* 197, 229–237.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24 (2/3), 119–124.
- Brantom, P.G., Bruner, L.H., Chamberlain, M., Desilva, O., Dupuis, J., Earl, L.K., Lovell, D.P., Pape, W.J.W., Uttley, M., Bagley, D.M., Baker, F.W., Brachter, M., Courtellemont, P., Declercq, L., Freeman, S., Steiling, W., Walker, A.P., Carr, G.J., Dami, N., Thomas, G., Harbell, J., Jones, P.A., Pfannenbecker, U., Southee, J.A., Tcheng, M., Argembeaux, H., Castelli, D., Clothier, R., Esdaile, D.J., Itigaki, H., Jung, K., Kasai, Y., Kojim, H., Kristen, U., Larnicol, M., Lewis, R.W., Marenus, K., Moreno, O., Peterson, A., Rasmussen, E.S., Robles, C., Stern, M., 1997. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicol. Vitro* 7, 141–179.
- Corsini, E., Bruccoleri, A., Marinovich, M., Galli, C.L., 1996. Endogenous interleukin-1 alpha associated with skin irritation induced by tributyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138, 268–274.
- Corsini, E., Galli, C.L., 1998. Cytokine and irritant contact dermatitis. *Toxicol. Lett.* 102/103, 277–282.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharm. Exptl. Ther.* 82, 377–390.
- Draize, J.H., Lang, R.B., Calvery, H.O., 1945. Toxicity studies of substances applied topically to the skin. *Fed. Proc.* 4, 116–117.
- Duffy, P.A., Flint, O.P., Orton, T.C., Fursey, M.J., 1986. Initial validation of an in vitro test for predicting skin irritancy. *Food Chem. Toxicol.* 24 (6/7), 517–518.
- Earl, L.K., Dickens, A.D., Rowson, M.J., 1997. A critical analysis of the rabbit eye irritation test variability and its impact on the validation of alternative methods. *Toxicol. Vitro* 11, 295–304.
- Effendy, I., Maibach, H.I., 1995. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermat.* 33, 217–225.
- Eun, H.C., Suh, D.H., 2000. Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternative to Draize tests. *J. Dermatol. Sci.* 24, 77–91.
- Infante, M.R., Erra, P., Julià, M.R., Garcia Domínguez, J.J., Prats, M., 1984. Surface active molecules: preparation and properties of long chain N^α-acyl-L-α-amino-ω-guanidine alkyl acid derivatives. *Int. J. Cosm. Sci.* 6, 275–282.
- Infante, M.R., Molinero, J., Bosch, P., Julià, M.R., Erra, P., 1988. Synthesis and properties of new N^α-acyl peptidic surfactants. In: *Proceedings of the Second World Surfactants Congress*, pp. 196–203.
- Hatao, M., Murakami, N., Sakamoto, K., Ohnuma, M., Matsushige, C., Kakishima, H., Ogawa, T., Kojima, H., Matsukawa, K., Masuda, K., Chiba, K., Yoshizawa, K., Kaneko, T., Iwabuchi, Y., Matsushima, Y., 1999. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (4) Haemoglobin denaturation test. *Toxicol. Vitro* 13, 125–137.
- Herzinger, T., Korting, H.C., Maibach, H.I., 1995. Assessment of cutaneous and ocular irritancy: a decade of research on alternatives to animal experimentation. *Fundam. Appl. Toxicol.* 24, 29–41.
- Hines, J.D., 2001. Theoretical aspects of micellisation in surfactant mixtures. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 6, 377–390.
- Korting, H.C., Herzinger, T.H.A., Kerscher, A., Angerpointner, T., Maibach, H.I., 1994. Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocyte, HaCat cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *J. Dermatol. Sci.* 7, 119–129.
- Lovell, D.P., 1996. Principal component analysis of Draize eye irritation tissue scores from 72 samples of 55 chemicals in the ECETOC data bank. *Toxicol. Vitro* 10, 609–618.
- Mitjans, M., Martínez, V., Clapés, P., Pérez, L., Infante, M.R., Vinardell, M.P., 2003. Low potential ocular irritation of arginine-based gemini surfactants and their mixtures with nonionic and zwitterionic surfactants. *Pharm. Res.* 20, 1697–1701.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay to cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 5 (1/2), 55–63.
- Muller-Decker, K., Furstenberger, G., Marks, F., 1994. Keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as in vitro parameters of irritancy: a possible alternative to the Draize skin irritation test. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 99–108.
- Nickoloff, B.J., Griffith, C.E.M., Barker, J.N., 1990. The role of adhesion molecules, chemotactic factors, and cytokines in inflammatory and neoplastic skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 94, 151S–157S.
- OECD, 2002. Acute dermal irritation/corrosion. Method 404. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- OECD, 2002. Acute eye irritation/corrosion. Method 405. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- Okamoto, Y., Ohkoshi, K., Itagaki, H., Tsuda, T., Kakishima, H., Ogawa, T., Kasai, Y., Ohuchi, J., Kojima, H., Kurishita, A., Kaneko, T., Matsushima, Y., Iwabuchi, Y., Ohno, Y., 1999. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation test for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test. *Toxicol. Vitro* 13, 115–124.
- Osborne, R., Perkins, M.A., 1994. An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food Chem. Toxicol.* 32, 133–142.

- Osborne, R., Perkins, M.A., 1991. In vitro skin irritation testing with human skin cell culture. *Toxicol. Vitro* 5, 563–567.
- Pape, W.J., Pfannenbecker, U., Hoppe, U., 1987. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.* 1, 525–536.
- Pape, W.J., Hoppe, U., 1991. In vitro methods for the assessment of primary local effects of topically applied preparations. *Skin Pharmacol.* 4, 205–212.
- Pape, W.J.W., Pfannenbecker, U., Argembeaux, H., Bracher, M., Esdaile, D.J., Hagino, S., Kasai, Y., Lewis, R.W., 1999. COLIPA validation project on in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (Phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status. *Toxicol. Vitro* 13, 343–354.
- Riddell, R.J., Clothier, R.H., Ball, M., 1986. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.* 24 (6/7), 469–471.
- Sánchez, L., Mitjans, M., Infante, M.R., Vinardell, M.P., 2004. Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharm. Res.* 21, 1637–1641.
- Sims, R.J., Fioriti, J.A., 1975. High-temperature reactions of fats with amino-acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 144–147.
- Sugai, S., Murata, K., Kitagaki, T., Tomita, I., 1991. Studies on eye irritation caused by chemicals in rabbits. II. An in vitro testing method using rat red blood cells for the prediction of eye irritation potential of chemicals. *J. Toxicol. Sci.* 16, 131–144.
- Van de Sandt, J., Roguet, R., Cohen, C., Esdaile, D., Poncet, M., Corsini, E., Parker, C., Fusening, N., Liebsch, M., Benford, D., de Brugerolle de Fraissinette, A., Fortasch, M., 1999. The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 27, 723–743.
- Ward, R.K., Agrawalla, S., Clothier, R.H., 1994. Investigation of an in vitro cytotoxicity assay for prediction of skin irritation. *Toxicol. Vitro* 8, 659–660.
- Ward, R.K., Hubbard, A.W., Sulley, H., Garle, M.J., Clothier, R.H., 1998. Human keratinocyte cultures in an in vitro approach for the assessment of surfactant-induced irritation. *Toxicol. Vitro* 12, 163–173.
- Wilhelm, K.P., Bottjer, B., Siegers, C.P., 2001. Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation test. *Br. J. Dermatol.* 145, 709–715.
- William, I.R., Kupper, T.S., 1996. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci.* 58, 1485–1507.
- Xia, J., Xia, Y., Nnanna, I.A., 1995. Structure–function relationship of acyl amino acid surfactants: surface activity and antimicrobial properties. *J. Agric. Food Chem.* 43, 867–871.



Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests

Tomas Benavides^a, Verónica Martínez^a, Montserrat Mitjans^a, María Rosa Infante^b, Carmen Moran^b, Pere Clapés^c, Richard Clothier^d, María Pilar Vinardell^{a,e,*}

^a *Departament Fisiologia-Farmàcia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (BCN), Avinguda Joan XXIII s/N, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Department of Surfactant Technology, IIAQ-CSIC (BCN), Barcelona, Spain*

^c *Departament of Peptide and Protein Chemistry, IIAQ-CSIC (BCN), Barcelona, Spain*

^d *FRAME Alternatives Laboratory, School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, QMC, Nottingham, UK*

^e *Unidad Asociada al CSIC 8004 (BCN), Barcelona, Spain*

Received 19 March 2004; received in revised form 14 April 2004; accepted 14 April 2004

Abstract

The ultraviolet-A radiation damage effects on skin and eyes will be increased by phototoxic compounds which could be present in pharmaceutical or cosmetic formulations. Great efforts have been made in the last years to find surfactants to replace those with phototoxic potential in commercial use. Series of different in vitro models for phototoxicity, included to validated neutral red uptake (NRU) 3T3 phototoxicity assay are useful screening tools. The phototoxic effects of a novel family of glycerol amino acid-based surfactant compounds were examined via these assays. Human red blood cells and two immortalised cell lines, murine fibroblast cell line 3T3, and one human keratinocyte cell line, HaCaT, were the in vitro models employed to predict potential photoirritation. The phototoxic end-points assessed were hemolysis (human red blood cell test) and resazurin transformation to resorufin and NRU in cell culture methods. The results suggest that no phototoxic effects by any new amino acid derived-surfactants, could be identified.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Surfactants; Phototoxicity; Irritancy; Keratinocytes; Fibroblast; Red blood cells

1. Introduction

Surfactants are among the most versatile and frequently applied excipients in pharmaceutical, cosmetic

and technology. Their application via these products should avoid skin and eye irritation or other adverse side reactions. Therefore, attention is paid to these facets from preformulation development trials, and hence the development of new non-irritant surfactants is of interest (Benassi et al., 2003).

Evaluation of the irritant potential of new products or ingredients prior to human testing is still

* Corresponding author. Tel.: +34-934024505;

fax: +34-934035901.

E-mail address: mpvinardellmh@ub.edu (M.P. Vinardell).

on occasions performed in vivo on animals (Draize et al., 1944). However, besides ethical and financial objections to these methods, there are also scientific drawbacks such a intra- and inter-laboratory variability, poor predictability for other than strong irritants, and the fundamental differences between animal and human in morphological aspects of skin. Therefore, simple and reproducible in vitro test are required as screening procedures to estimate the skin irritation potential of large numbers of compounds that are being developed (Fentem and Botham, 2002; Zuang et al., 2002). As an alternative to experimentation on animals, procedures including the 3T3 and human keratinocyte, neutral red uptake (NRU) assays are undergoing an international validation trial, with the aim to predict potential toxicity of chemicals and in the future formulations prior to human testing (Worth and Balls, 2002; Strickland et al., 2003). Cell cultures (such as keratinocyte cell lines and primary cultures), skin explants or organ cultures and epidermal or skin equivalents are also being evaluated (Wilhelm et al., 2001).

The research into new surfactants with low irritancy potential and derived from amino acids is of great interest (Mitjans et al., 2003; Benavides et al., 2004). The goal of the present study is to investigate the potential cytotoxicity and phototoxicity of these new amino acid-based surfactants and the relationship of

these adverse reactions to the chemical structure and amino acid composition.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Hank's balanced salt solution (HBSS; with calcium and magnesium ions), phosphate buffer solution (PBS) and the keratinocyte basal media (KBM), were obtained from Cambrex Ltd. (Walkersville, USA). The 75 cm² plastic flasks and 96-well plates were purchased from TPP (Trasadingen, Switzerland), neutral red dye, resazurin dye, RPMI 1640, L-glutamine, trypsin/EDTA solution, cell culture additives and sodium dodecyl sulphate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). The fetal calf serum (FCS) was purchased from Bio Whittaker Europe (Verviers, Belgium).

2.2. Surfactants

Glycero amino acid-based surfactants were synthesised following the procedure described previously (Morán et al., 2001, 2002). They consist of surfactants with different amino acid elements: glutamine, glutamic acid, arginine and tyrosine (Fig. 1). Sodium dodecyl sulphate is used as the positive control.

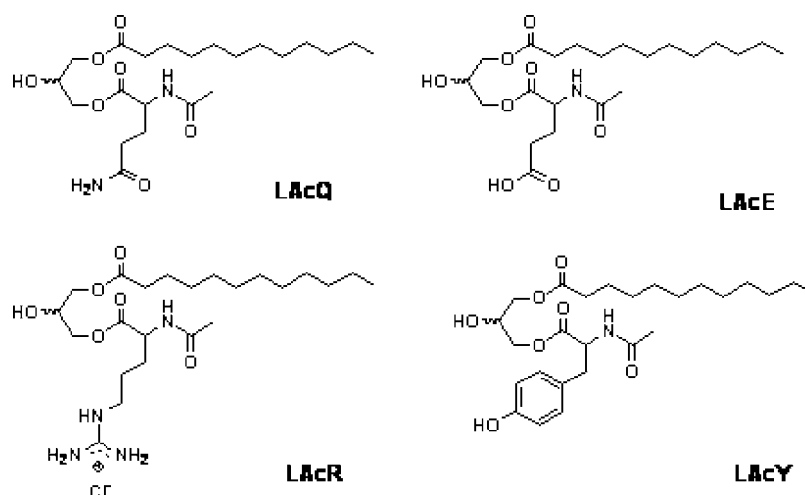


Fig. 1. Chemical structure and nomenclature of the glycerol amino acid-based surfactants. L = lysine, Q = glutamine, R = arginine, E = glutamic acid and Y = tyrosine, according to the international nomenclature.

2.3. Cell culture

Murine Swiss albino 3T3 (ATCC CCL92) fibroblast cell line was grown in RPMI 1640 culture media containing phenol red, 5% of 2 mM glutamine, 10% FCS, antibiotics (penicillin 100 U ml⁻¹ and streptomycin 100 µg ml⁻¹) (all from Sigma). HaCaT keratinocyte cell line (kindly donated by Professor N. Fusenig) was maintained in serum-free keratinocyte basal media (KBM). The keratinocyte basal media (KBM Cambrex Ltd.) was supplemented with human epidermal growth factor (0.1 ng ml⁻¹), insulin (5 µg ml⁻¹), bovine pituitary extract (0.4%), GA-1000 (gentamicin: 50 µg ml⁻¹; amphotericin-B: 50 ng ml⁻¹) to create keratinocyte growth media (KGM-2). Keratinocytes are routinely cultured in 75 cm² plastic flasks and in a humidified incubator at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, 95% air.

The cells were harvested trypsin/EDTA and 100 µl/well seeded from the suspension of 2 × 10⁴ to 5 × 10⁴ cell ml⁻¹, into the central 60 wells of 96-well plate and allowed to adhere overnight

2.4. Surfactant treatment and photoirritation evaluation

Cell lines 3T3 and HaCaT are used as in vitro models to predict the cutaneous phototoxicity, using the resazurin assay (Clothier et al., 2002) and NRU (Borenfreund and Puerner, 1985) modified to remove the use of formaldehyde (Riddell et al., 1998) and as used in the ICCVAM/ECVAM and Phototoxicity International Validation Trials (Spielmann et al., 1998; Strickland et al., 2003).

The 3T3 mouse fibroblast cell line and HaCaT keratinocyte cell line were treated with surfactant dilutions in serum-free medium or Hank's balanced salt solution at eight concentrations ranging from 200 to 1 µg ml⁻¹ for 24 h. Each concentration was tested in six replicate wells and each experiment was run three times. Two wells were filled with vehicle as controls. Duplicates were prepared: one the irradiated plate (+UVA) and the other designated the non-irradiated (-UVA). The +UVA plate was irradiated with the Sol-500 lamp with 5 J cm⁻² of UVA. When plates reached 70–80% confluence, the medium was replaced with 100 µl of diluted warmed dye resazurin solution (stock solution was 100 µg ml⁻¹ in HBSS

and it was diluted 1:10 with HBSS). The plates were returned to the incubator for 55 min. At the 60-min time point the plates were read, directly, at 530 nm excitation and 590 nm emission in a spectrofluorimeter (FLUOstar Galaxy© BMG Labtechnologies). This measure established the chemical pre-exposure cell activity. After reading, the solution resazurin was removed and replaced with surfactant dilution series prepared in HBSS. At the end of the exposure period the medium was removed and replaced by a mixture of neutral red dye and resazurin. This mixture contains NR stock solution 4 mg ml⁻¹ diluted 1:800 in HBSS and use to dilute 1:10 the resazurin stock solution (100 µg ml⁻¹).

2.5. Photoirritant factor

The photoirritant factor (PIF) was calculated by dividing the medial inhibitory concentration (IC₅₀) of the plate UVA irradiated by the IC₅₀ of the plate non-irradiated. If the above is 5, the surfactants are defined as having phototoxic action (Spielmann et al., 1998). The IC₅₀ was calculated according to the method in the 3T3 NRU phototoxicity validation trail (Holzhutter, 1997).

2.6. Red blood cell (RBC) assay

2.6.1. Preparation of erythrocyte suspension

The erythrocytes from healthy volunteers were obtained from the Blood Bank of "Hospital Clinic" (Barcelona, Spain). They were washed three times in a phosphate buffer solution (PBS; containing 6.78 g NaCl, 1.42 g Na₂HPO₄ and 0.4 g KH₂PO₄ [Merck] in 1 l of distilled water, pH 7.4:300 mOsmol l⁻¹).

2.6.2. Hemolysis determination

The erythrocytes were suspended in the PBS buffer at cell density of 2 × 10⁹ cell ml⁻¹. Twenty-five microliter aliquots of the erythrocyte suspension were pipetted into polystyrene tubes containing different concentrations of surfactants from 10 to 1000 µg ml⁻¹ in a total volume of 1 ml. They were incubated at 37 °C for 10 min and centrifuged (5 min at 500×g). The percentage of hemolysis was determined by comparing the absorbance (540 nm) of the supernatant with that of control sample totally hemolyzed with distilled water. Erythrocytes exposed to PBS alone

were used to adjust the blank reading. From the hemolysis results, the dose–response curve was determined and the concentration that induces the hemolysis of 50% of the cells (HC_{50}) calculated. Protein denaturation was determined comparing the ratio of absorbance at 575 and 540 nm in a dual-beam UV-Vis spectrophotometer. This ratio is used to calculate the hemoglobin denaturation index (DI) which is compared with the SDS effects as the internal standard (Pape et al., 1987). The concentration–response curve was plotted from the results of six independent measures/experiments. Aqueous soluble products were dissolved in phosphate-buffered saline and insoluble compounds dissolved in isopropyl alcohol and thereafter phosphate-buffered saline added at the ratio 1:9. Isopropyl alcohol at this concentration does not induce hemolysis of the erythrocytes (Macian et al., 1996).

2.6.3. Evaluation of potential ocular irritation

The irritation index was determined according to the lysis/denaturation ratio (L/D) obtained by dividing the HC_{50} by the denaturation index. The surfactants can be classified according to this L/D ratio as non-irritant (>100), slightly irritant (>10), middle irritant (>1), high irritant (>0.1), and very irritant (<0.1) (Pape et al., 1987).

2.6.4. Photohemolysis assay

Twenty-five microliter of red blood cell (RBC) suspension of $25 \mu\text{l}$ were added to a 24-well plate containing different concentrations from 10 to $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ of the surfactants and exposed for 2 h to an UV lamp (Ultra-vitalux®, Osram, Germany) (UVA $960 \mu\text{w cm}^{-2}$ (6.9 J cm^{-2}) and UVB $220 \mu\text{w cm}^{-2}$ (1.58 J cm^{-2}). The HC_{50} was determined in the plates exposed and non-exposed. The photohemolysis factor (PHF) was calculated by dividing the HC_{50} of the non-irradiated cells by the HC_{50} of the irradiated cells. A compound is considered photoirritant if the PHF is ≥ 3.0 (Pape et al., 2001).

3. Results

The cytotoxicity to 3T3 and HaCaTs cells measured by NRU in the presence and absence of UV was shown to have no overt differences (Fig. 2). The cytotoxicity in 3T3 and HaCaTs, measured via resazurin, in the

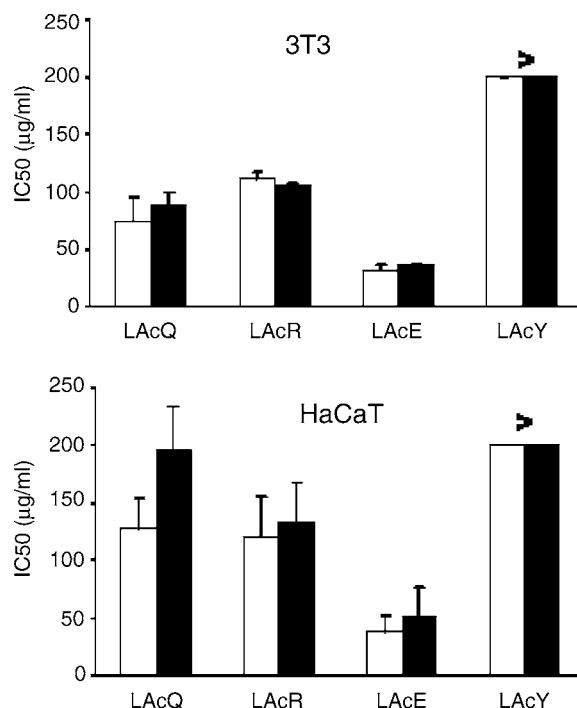


Fig. 2. Cytotoxicity and phototoxicity of the surfactants on 3T3 mouse fibroblasts and HaCaT human keratinocytes measured by NRU assay. White bars, UV irradiated cells and black bars, non-irradiated cells. The sign '>' means that the corresponding IC_{50} is higher than $200 \mu\text{g ml}^{-1}$. Data are presented as mean \pm S.D., $n = 9$. No statistical differences between irradiated and non-irradiated cells, Student's- t test.

presence and absence of UV produced similar results (Fig. 3). The level of cytotoxicity, of the surfactants assayed, are similar to the two cell lines. The surfactant with glutamic acid showed the highest cytotoxicity, at around $40 \mu\text{g ml}^{-1}$, and the tyrosine derivative was the least cytotoxic with an IC_{50} higher than $200 \mu\text{g ml}^{-1}$.

The photoirritant factor (PIF), which was the result to divide the IC_{50} of the plate UVA irradiated by the IC_{50} of the plate non-irradiated, was calculated to be around 1, i.e. in the non-phototoxic range. There are no statistical differences between the irradiated and non-irradiated 3T3 cells.

The hemolysis and denaturation index and the classification of the surfactants according to their irritant activity demonstrate that the tyrosine derivative surfactant had a higher value for the HC_{50} (Table 1). These results accord with the results from the fibroblast and keratinocyte assays.

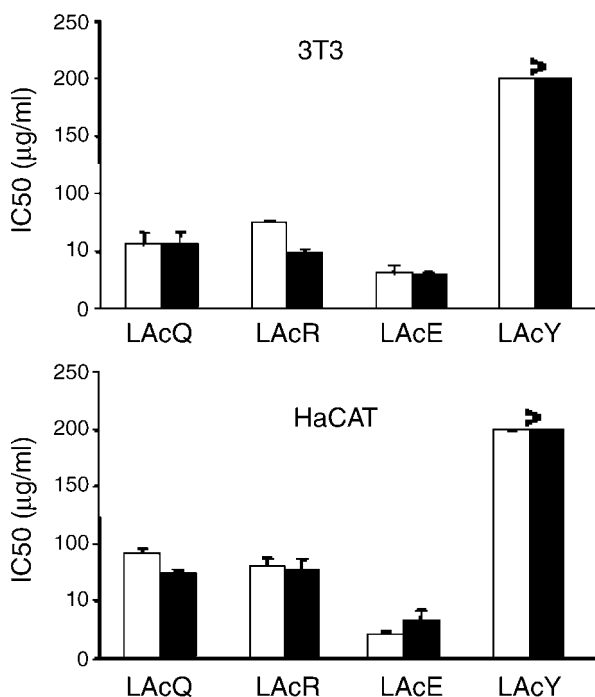


Fig. 3. Cytotoxicity and phototoxicity of the surfactants on 3T3 mouse fibroblast the HaCaT human keratinocytes measured by resazurin assay. White bars UV irradiated cells and black bars non-irradiated cells. The sign '>' means that the corresponding IC_{50} is higher than $200 \mu\text{g ml}^{-1}$. Data are presented as mean value \pm S.D., $n = 9$. No statistical differences between irradiated and non-irradiated cells, Student's t -test.

The HC_{50} in irradiated and not irradiated red blood cells is similar for each surfactant, indicating no phototoxic action (Fig. 4) despite the inclusion of high levels of UVB in the exposure to the RBCs. The less hemolytic surfactant, the tyrosine derivative, shows a HC_{50} , in both irradiated and not irradiated red blood

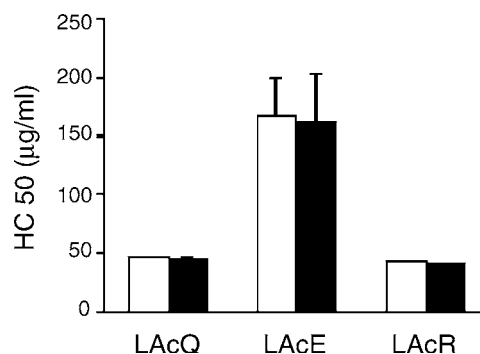


Fig. 4. Hemolysis (HC_{50}) induced by the surfactants in human red blood cells. White bars, UV irradiated cells and black bars, non-irradiated cells. LAcY values are not represented because the HC_{50} is higher than $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Data are presented as mean \pm S.D., $n = 9$. No statistical differences between irradiated and non-irradiated cells, Student's t -test.

cells, higher than $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$, indicating also no phototoxic action.

4. Discussion

Glycero amino acid-based surfactants constitute a novel class of especially bio-based surfactants, which can be considered analogs of partial glycerides and phospholipids. Furthermore, these may lead to a number of lipid analogs of potential therapeutic interest and as adjuvants for the drug and gene therapy. For these reasons, they constitute a promising family of compounds with a great potential interest for use in pharmaceutical and cosmetic formulation. Due to their potential application it is necessary to evaluate their potential adverse toxic, topical irritation and phototoxicity potential.

The classical *in vivo* methods for determination of the skin and ocular irritation are being replaced by *in vitro* models in order to reduce the number of animal experiments in accordance with the EU directives (86/609/EEC, 1986).

For cutaneous irritants there are concerns over biological relevance, and difficulty in reproducing results from one laboratory to another with *in vivo* assay. Erythrocytes are good targets for ocular irritation assessment as demonstrated in different studies (Pape and Hoppe, 1991; Sugai et al., 1991). The red blood

Table 1

Classification of ocular irritation induced by the tested surfactants according to their L/D ratio calculated from HC_{50} and denaturation index (DI)

Surfactant	HC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) mean value \pm S.D.	DI	L/D	Classification
LacQ	45.23 ± 0.28	18.46	2.45	Middle irritant
LacR	39.88 ± 0.91	3.03	13.16	Slight irritant
LacE	161.91 ± 40.64	34.23	4.73	Middle irritant
LacY	>1000	0	∞	Non-irritant

cell phototoxicity test (Photo-RBC test) can be considered as a second *in vitro* test, which can be used to obtain some mechanistic information, in particular on photodynamic effects on cellular proteins and biomembranes (Pape et al., 2001).

A biologically relevant target for skin irritants are fibroblasts and keratinocytes on (Van de Sandt et al., 1999; Lee et al., 2000). The material required for primary culture cells is limited and variable, and susceptibility to changes in toxic response with increasing numbers of passages. The validated 3T3 phototoxicity neutral red assay and the Human keratinocyte variant with HaCaT cells were chosen as the model cell systems. The 3T3 NRU phototoxicity assay achieved a correlation between *in vivo* and *in vitro* results of between 95 and 100%. The use of the HaCaT non-tumorigenic, spontaneously immortalized cell lines has the advantage of providing an almost unlimited supply of identical cells, assuring high intra- and inter-laboratory reproducibility, required by validation studies (Spielmann et al., 1998).

Nevertheless, there are few studies in the literature related to the effects of amino acid surfactants. The results relating to the hemolytic action, observed in the present study, are similar to those previously reported with other amino acid-based surfactants in rat erythrocytes (Macian et al., 1996) and also human erythrocytes (Vinardell and Infante, 1999; Benavides et al., 2004). Other authors have found a mild irritant action in surfactants with glutamic in sodium lauroyl glutamate (Lee et al., 1994).

No potential phototoxic effects were observed, with the PIF at less than 5 (non-phototoxic) in all cases. With the HaCaT cells there is a similar cytotoxicity for irradiated (+UVA) and non-irradiated (–UVA) cells.

The resazurin assay is based in the reduction of resazurin to resorufin by cellular reductases, a parameter to determine cell viability/activity including their mitochondrial integrity. The resazurin assay does not injure the cells, and it is possible to use the cultures in repeat assays (Clothier and Sansom, 1996). This assay has a very good correlation coefficient between human fibroblasts and human patch test (Lee et al., 2000) and also between human keratinocytes and human patch test predictions (Clothier et al., 2002).

In 3T3 fibroblasts and HaCaT keratinocytes the potential phototoxic effects of these surfactants are not observed in either the NRU or the resazurin assay.

In general, the values of IC₅₀ in irradiated and non-irradiated plates of HaCaT were similar to 3T3 fibroblasts, indicating that the sensitivity of the two cell lines are similar for these particular surfactants.

Further, given the complexity of human ocular and skin biology, we interpreted these results with caution. No single *in vitro* model and no single assay will be able to mimic all the events that occur *in vivo* in the human eye or skin. Thus, a battery of methods, like in the present paper which include phototoxic potential and based on different mechanisms may be useful to evaluate irritation of pharmaceutical and cosmetic ingredients.

In conclusion, these surfactants derived from different amino acid constitute a promising group of surfactants that could find application in different pharmaceutical and cosmetic preparations according to their predicted low irritant action. Among them, the tyrosine derivative surfactants presents the lower cytotoxic and photocytotoxic in red blood cells and in fibroblast and keratinocyte culture.

Acknowledgements

We thank Dr. Nancy Khammo, Monica Owen and Nicola Bourne, FRAME laboratory, Queen's Medical Centre, Nottingham for their support and scientific advice, also Professor N. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany) for the supply of the HaCaT cells. This research was supported by the project PPQ2000-1687-C02-01 from CICYT (Spain). Tomás Benavides and Veronica Martínez hold doctoral grants from the University of Barcelona (Spain).

References

- Anon., 1986. Council directive 86.609/EEC of 24th November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official J. Eur. Commun. L358, 1–29.
- Benassi, L., Bertazzoni, G., Magnoni, C., Rinaldi, M., Fontanesi, C., Seidenari, S., 2003. Decrease in toxic potential of mixed tensides maintained below the critical micelle concentration: an *in vitro* study. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16, 156–164.
- Benavides, T., Mitjans, M., Martínez, V., Clapés, P., Infante, M.R., Clothier, R.H., Vinardell, M.P., 2004. Assessment of

- primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of arginine-based surfactant-induced irritation. *Toxicology* 197, 229–237.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124.
- Clothier, R., Starzec, G., Pradel, L., Baxter, V., Jones, M., Cox, H., Noble, L., 2002. The prediction of human skin responses by using the combined in vitro fluorescein leakage/alamar blue (resazurin) assay. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 30, 493–504.
- Clothier, R.H., Sansom, R., 1996. Effects of surfactant retreatment in vitro: a method to evaluate changes in cell junctions and in cell viability. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 24, 859–865.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377–390.
- Fentem, J.H., Botham, P.A., 2002. ECVAM's activities in validating alternative tests for skin corrosion and irritation. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 30, 61–67.
- Holzthutter, H-G., 1997. A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose–response curves and its use in predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 25, 445–462.
- Lee, C.H., Kawasaki, Y., Maibach, H.I., 1994. Effect of surfactant mixtures on irritant contact dermatitis potential in man: sodium lauroyl glutamate and sodium lauryl sulphate. *Contact Dermatitis* 30, 205–209.
- Lee, J.K., Kim, D.B., Kim, J.I., Kim, P.Y., 2000. In vitro cytotoxicity tests on cultures human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol. In Vitro* 14, 345–349.
- Macian, M., Seguer, J., Infante, M.R., Selve, C., Vinardell, M.P., 1996. Preliminary studies of the toxic effect to non-ionic surfactants derived from lysine. *Toxicology* 106, 1–9.
- Mitjans, M., Martínez, V., Clapés, P., Perez, L., Infante, M.R., Vinardell, M.P., 2003. Low potential ocular irritation of arginine-based gemini surfactants and their mixtures with non-ionic and zwitterionic surfactants. *Pharm. Res.* 20, 1697–1701.
- Morán, C., Infante, M.R., Clapés, P., 2001. Synthesis of glyero amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of *rac*-1-*O*-(*N*^α-acetyl-L-amioacyl)glycerol derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (17), 2063–2070.
- Morán, C., Infante, M.R., Clapés, P., 2002. Synthesis of glyero amino acid-based surfactants. Part 2. Lipase-catalysed synthesis of 1-*O*-lauroyl-*rac*-glycero-3-*O*-(*N*^α-acetyl-L-amino acid) and 1,2-di-*O*-lauroyl-*rac*-glycero-3-*O*-(*N*^α-acetyl-L-amino acid) derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (8), 1124–1134.
- Pape, W.J.W., Hoppe, U., 1991. In vitro methods for the assessment of primary local effects of topically applied preparations. *Skin Pharmacol.* 4, 205–212.
- Pape, W.J.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Steiling, W., 2001. The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation programme on phototoxicity (phase II). *ATLA Altern. Lab. Anim.* 29, 145–162.
- Pape, W.J.W., Pfannenbecker, U., Hoppe, U., 1987. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.* 1, 525–536.
- Riddell, R.J., Panacer, D.S., Wilde, S.M., Clothier, R.H., Balls, M., 1998. The importance of exposure period and cell type in in vitro cytotoxicity tests. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 14, 86–92.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J., Pechovitch, G., de Silva, O., Holzthütter, H-G., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., Brantom, P., 1998. The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study results of phase II (blind trial). Part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicol. In Vitro* 12, 305–327.
- Strickland, J.A., Stokes, W.S., Casati, S., Paris, M.W., Worth, A.P., Raabe, H., Cao, C., Curren, R., Haseman, J., Tice, R.R., 2003. Design of a validation study to evaluate in vitro cytotoxicity assays for predicting rodent and human acute systemic toxicity. *Toxicologist* 72, 157.
- Sugai, S., Murata, K., Kitagaki, T., Tomita, I., 1991. Studies on eye irritation caused by chemicals in rabbits. II. An in vitro testing method using rat red blood cells for the prediction of eye irritation potential of chemicals. *J. Toxicol. Sci.* 16, 131–144.
- Van de Sandt, J., Roguet, R., Cohen, C., Esdaile, D., Ponc, M., Corsini, E., Parker, C., Fusenig, N., Liebsch, M., Benford, D., de Brugerolle de Fraissinette, A., Fortasch, M., 1999. The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 27, 723–743.
- Vinardell, M.P., Infante, M.R., 1999. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 124C, 117–120.
- Wilhelm, K.P., Bottjer, B., Siegers, C.P., 2001. Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests. *Br. J. Dermatol.* 145, 709–715.
- Worth, A.P., Balls, M., 2002. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 30 (Suppl. 1), 1–124.
- Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliott, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van de Sandt, J.J., Wiemann, C., Worth, A.P., 2002. Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 30, 109–129.



Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation

T. Benavides^a, M. Mitjans^a, V. Martínez^a, P. Clapés^b,
M.R. Infante^c, R.H. Clothier^d, M.P. Vinardell^{a,*}

^a *Department Fisiologia-Divisió IV, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/N, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Department of Peptide and Protein Chemistry, IIAQ-CSIC, (BCN) Spain*

^c *Department of Surfactant Technology, IIAQ-CSIC (BCN) Spain*

^d *FRAME Alternatives Laboratory, School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, QMC, Nottingham, UK*

Received 31 October 2003; received in revised form 3 November 2003; accepted 21 January 2004

Abstract

Extensive efforts have been made, recently, to find surfactants with lower irritation potential than those presently commercially available, for use in pharmaceutical and cosmetic preparations. Cytotoxic and phototoxic effects of a novel family of dicationic arginine-diglyceride surfactant compounds, 1,2-diacyl,3-*O*-(L-arginyl)-rac-glycerol with alkyl chain lengths in the range from 8 to 14 carbon atoms, were compared to three commercial surfactants. The end-points used to assess toxicity were the red blood cell lysis assay and uptake of the vital dye neutral red 24 h after dosing (NRU), respectively. Two immortalized cell lines, murine fibroblast cell line, 3T3, and one human keratinocyte cell line, HaCaT, were used as in vitro models to predict the potential phototoxicity which could result in irritation, determined by resazurin reduction to resorufin and neutral red uptake (NRU). All tested surfactants had cytotoxicity effects as demonstrated by and decrease of NR uptake, which showed a clear concentration-response relationship. Concentrations resulting in 50% inhibition of NR uptake (IC₅₀) range from 1 μmol l⁻¹ (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) to 565 μmol l⁻¹ (12,12-L-arginine). Erythrocyte haemolysis also showed a clear concentration-response relationship, the 50% of haemolysis ranged from 37 μmol l⁻¹ (10,10-L-arginine) to 151 μmol l⁻¹ (sodium lauryl sulphate). Phototoxicity was performed with 12,12-L-acetyl-arginine, the most stable chemical structure. The validated 3T3 NRU phototoxicity assay was used and revealed a phototoxic potential.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cytotoxicity model; Skin irritation; Photoirritation; Culture cells; Surfactants

1. Introduction

Evaluation of the irritant potential in vivo, of new products or ingredients, for pharmaceutical use, is required by law in most EU countries, prior to human

* Corresponding author. Tel.: +34-934024505;
fax: +34-934035901.

E-mail address: mpvinardellmh@ub.edu (M.P. Vinardell).

exposure. However, as well as ethical, legal and financial objections to in vivo methods, in certain EU countries the testing of cosmetic ingredients and formulations is banned, there are also scientific drawbacks such as intra- and interlaboratory variability with the in vivo data (Balls et al., 1995). A good predictability for strong or very weak irritants only is found, and the fundamental difference in aspects of skin morphology between animal and humans also argues for a simple and reproducible in vitro test to estimate the skin irritation (Botham et al., 1999).

In vitro cultures of submerged monolayers of either primary epidermal keratinocytes, dermal fibroblasts or immortalized epidermal cell lines have been used in various in vitro assays to predict adverse effects including irritation potential (Ward et al., 1998; Brantom et al., 1997; Effendy and Maibach, 1995). Surfactants have the ability to induce phospholipids emulsification contributing to cellular damage, which can result in cytotoxicity and the release of proteins, lysosomal and cytoplasmic enzymes and inflammatory mediators. HaCaT keratinocytes, a human cell line, have been used frequently as a suitable model for normal human keratinocytes (NHKs) (Applegate et al., 1995; Isoherranen et al., 1999). These were used in this case to avoid the variation in results that may occur as a result of donor variation in primary NHKs. There is no evidence that surfactant effects are different in different donors neither is there any significant difference between donor responses to phototoxins in the NHK version of the validated 3T3 NRU phototoxicity assay (Clothier et al., 1999).

A novel family of dicationic arginine-diglyceride surfactants, 1,2 diacyl, 3-*O*-(L-arginyl)-rac-glycerol with alkyl chain lengths in the range of C8–C14 were prepared in our laboratory (Table 1, Fig. 1). These new surfactants can be regarded as analogues of lecithins and they have two hydrophobic tails of identical fatty acid chains, attached to the ester bonds, and a dicationic polar head from arginine instead of the zwitterionic on the lecithins.

These new compounds are multifunctional surfactants with self-aggregation behaviour comparable to that of short-chain lecithins. Furthermore, they have an antimicrobial activity similar to that of the conventional cationic surfactants (Pérez et al., 2002). Surfactants belong to one of the most versatile and frequently applied excipient in pharmaceutical and

Table 1

Compounds tested, molecular weight and chemical characteristics

Compounds	Molecular weight	Group
8,8-L-Arginine	501	Detergent, cationic
10,10-L-Arginine	557	Detergent, cationic
12,12-L-Arginine	614	Detergent, cationic
12,12-L-Acetyl-arginine	691	Detergent, cationic
14,14-L-Arginine	670	Detergent, cationic
Hexadecyl trimethyl ammonium bromide	365	Detergent, cationic
Sodium lauryl sulphate	288	Detergent, anionic
Cocoamidopropyl betaine	532	Detergent, amphoteric

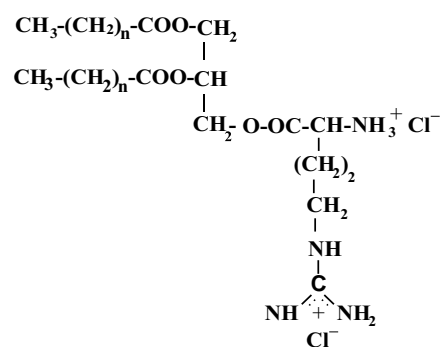


Fig. 1. Basic formula of 1,2 diacyl-3-*O*-(L-arginyl)-rac-glycerol dichloride (XXR). The different number of carbon atoms (*n*) in the fatty acid chains determine the different name compound: (*n* = 6, 8,8-L-arginine; *n* = 8, 10,10-L-arginine; *n* = 10, 12,12-L-arginine and 12,12-L-acetyl-arginine; *n* = 12, 14,14-L-arginine).

cosmetic products, for this reason it is necessary to study their potential to cause dermal and ocular irritation to guarantee that at the concentrations employed in formulations they do not result in unacceptable or irreversible damage to the skin or eye. The aim of this study was to elucidate the effects of the chain length of these new surfactants on their cytotoxicity and phototoxicity. Different in vitro methods, to predict potential dermal and ocular irritation were employed, thereby, avoiding the use of animals.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Hank's balanced salt solution (HBSS with Calcium and Magnesium), and Phosphate Buffer So-

lution (PBS with Calcium and Magnesium) were obtained from Cambrex (Walkersville, USA). The 75 cm² plastic flasks and 96-well plates were purchased from TPP (Trasadingen, Switzerland), Neutral red dye (NR), Resazurin dye, keratinocyte basal media (KBM), RPMI 1640 culture media, L-glutamine, trypsin/EDTA (2.5 g/0.2 g l⁻¹), cell culture additives, hexadecyl trimethyl ammonium bromide and sodium lauryl sulphate (SLS) were purchased from Sigma–Aldrich (Deisenhofen, Germany), Cocoamidopropylbetaina (Tego-Betaine T-50) (Henkel, A.G. Germany).

2.2. Preparation of erythrocyte suspension

The technique employed for haemolysis assay was the one described (Pape et al., 1987) as alternative to the *in vivo* Draize's method (Draize et al., 1944). The erythrocytes obtained from the blood of healthy volunteers were washed three times in a buffer containing 6.78 g NaCl, 1.42 g Na₂HPO₄ and 0.4 g KH₂PO₄ (purchased from Merck) in 1 l of distilled water (pH 7.4: 300 mos mol l⁻¹).

2.3. Red blood cell assay to evaluate potential ocular irritation

The erythrocytes were suspended in the buffer at cell density of 2×10^9 cell ml⁻¹. 25 µl aliquots of erythrocyte suspension were pipetted into polystyrene tubes containing different concentrations of surfactants in a total volume of 1 ml. They were incubated at room temperature for 10 min and then centrifuged (5 min at 500 × g).

The percentage of haemolysis was determined by comparing the absorbance (540 nm) of the supernatant with that of control sample totally haemolysed with distilled water. Protein denaturation was determined comparing the ratio of absorbance at 575 and 540 nm in a dual-beam UV-Vis spectrophotometer. This ratio allowed the calculation of the haemoglobin denaturation index (DI) which was compared with the SLS as the internal standard.

The concentration of surfactants resulting in 50% haemolysis (HC₅₀) was determined from the concentration–response curves which were plotted from the results of six different experiments. The irritation index was determined according to the ly-

sis/denaturation ratio (L/D) obtained dividing the HC₅₀ (µg/ml) by the denaturation index. The resulting L/D ratio is used instead of the ocular irritancy score in the acute phase of *in vivo* evaluation. The surfactants can be classified according to this L/D ratio as: non irritant >100, slightly irritant >10, middle irritant >1, high irritant >0.1 and, very irritant <0.1.

Soluble products were dissolved in phosphate-buffered saline and insoluble compounds were dissolved in isopropyl alcohol and thereafter phosphate-buffered saline was added in the ratio 1:9. Isopropyl alcohol at this concentration does not induce haemolysis of the erythrocytes (Macián et al., 1996).

2.4. Cell culture

Murine Swiss albino 3T6 (ATCC CCL96) and murine Swiss albino 3T3 (ATCC CCL92) fibroblasts cell lines were grown in RPMI 1640 culture media containing phenol red, 5% of 2 mmol l⁻¹ Glutamine, 10% foetal calf serum (FCS), Antibiotics (penicillin 100 U ml⁻¹ and streptomycin 100 µg ml⁻¹) (all Sigma). HaCaT keratinocyte cell line was maintained in serum-free keratinocyte growth media (KGM). The keratinocyte basal media (KBM) was supplemented with human epidermal growth factor (0.1 ng ml⁻¹), insulin (5 µg ml⁻¹), bovine pituitary extract (0.4%), GA-1000 (gentamycin: 50 µg ml⁻¹; amphotericin-B: 50 ng ml⁻¹ obtained from Cambrex) to create keratinocyte growth media (KGM-2). HaCaT cells were routinely cultured into 75 cm² plastic flasks and in a humidified incubator at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, 95% air.

The cells were harvested when 80% confluent with trypsin/EDTA and seeded 100 µl per well from a suspension of a density of 2×10^4 to 5×10^4 cell ml⁻¹, into the central 60 wells of 96 well-plate and allowed to adhere overnight in the CO₂ incubator.

2.5. Determination of cytotoxicity

The viability and metabolic activity of 3T6 fibroblasts cell, previously incubated with surfactant dilutions, was measured by the neutral red uptake (NRU) assay, based on the uptake via pinocytosis and storage in lysosomes of living cells (Borenfreund and Puerner, 1985). When plates achieved 70–80% confluence medium was replaced with 100 µl per well of NR

solution (25 µg/ml in culture medium) and the plates were incubated for 3 h at 37 °C. Then the cells were rinsed with two washes of 250 µl of PBS prior to addition of 100 µl per well of NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 50% ethanol, and 49% distilled water). The plates were shaken for 10 min and the absorbance was read at 550 nm by spectrophotometer. The mean optical density of untreated control cell wells was set to represent 100% viability. A no cells medium blank for NR background, and a positive control of 100 µg ml⁻¹ of SLS where also employed.

2.6. Determination of phototoxicity

Murine fibroblast cell line, 3T3, and human keratinocyte cell line, HaCaT, were used as in vitro models to predict the cutaneous phototoxicity. As in the validated 3T3 NRU assay and its NHK adaptation (Clothier et al., 1999; Spielmann et al., 1998), toxicity was determined by Resazurin assay (Larson et al., 1997; O'Brien et al., 2000) and neutral red uptake (Borenfreund and Puerner, 1985; Spielmann et al., 1998).

Two plates were seeded with cells; one for irradiation (+UVA) and the other wrapped in foil and therefore non-irradiated (-UVA). Twenty four hours after cell seeding at 2×10^4 to 5×10^4 cell ml⁻¹ for the 3T3 and 5×10^4 to 8×10^4 cell ml⁻¹ for the HaCaT cells, when the cell cultures were 70–80% confluent, the medium was replaced and the cells activity assayed using the resazurin assay prior to the application of fresh medium containing the test compound. A surfactant dilution series in serum-free medium or Hank's balanced salt solution at range 500–1 µg ml⁻¹ concentration were applied for 1 h prior to exposing the cells to the UVA-visible light. Following exposure the cells were cultured for 24 h (Clothier et al., 1999). The SOL 500 lamp, as employed in the 3T3 NRU Validation trial was used with a dosing of 1.6–2.1 m W/cm² to give a final exposure of 5 J/cm².

Exposed and dark control cells were then examined under an inverted phase-contrast microscope, for morphological changes. The surfactant containing solution was removed and replaced with 150 µl of normal culture medium. The cells were returned to the CO₂ incubator. After 24 h the medium was removed and a combined neutral red dye and resazurin assay performed.

2.6.1. The Resazurin assay and combined neutral red (NR) resazurin assay

Resazurin assay depends on the reduction of resazurin to resorufin, in the electron transport chain between the final reduction of O₂ and cytochrome oxidase enzyme (O'Brien et al., 2000). The rate of reduction of resazurin is related to mitochondrial activity.

The cells were assayed when 70–80% confluent, the medium was replaced with 100 µl of diluted warmed resazurin (stock solution is 100 µg/ml in HBSS and it is diluted 1:10 with HBSS). The plates were returned to the CO₂ incubator for 55 min. They were read at 60 min at 530 ± 10 nm excitation and 590 ± 12.5 nm emission on the spectrofluorimeter (FLUOstar Galaxy[®]. BMG Labtechnologies). That gave the pre-exposed activity of the cells prior to chemical exposure. The assay was repeated on the same cells 24 h after UV exposure.

2.6.2. Combined assay

This mixture contains NR stock solution 4 mg ml⁻¹ diluted 1:800 in HBSS and used to dilute 1:10 the resazurin stock solution, to give 0.5 µg ml⁻¹ NR in 10 µg ml⁻¹ resazurin.

After 60 min incubation the plate was read for the resazurin reduction to resorufin, and then returned for another 2 h at 37 °C, to allow adequate uptake of neutral red. After the removal of the dye solution, the cells were washed gently with 250 µl PBS, and the residual NR dye was extracted from the cells by the addition of 100 µl of neutral red desorb solution (51% H₂O, 48% ethanol, 1% acetic acid). The plates were shaken for 10 min and were read at 590 ± 12.5 nm excitation and 635 ± 10 nm emission in the spectrofluorimeter (FLUOstar Galaxy[®] BMG Labtechnologies) or at 540 ± 10 nm on a spectrophotometer.

2.6.3. Calculation of phototoxic factor

The phototoxicity factor (PIF), was calculated according to the EU/COLIPA phototoxicity study (Clothier et al., 1999). This consists of dividing the IC₅₀ in the presence of UVA by the IC₅₀ of the dark non-irradiated plate. The phototoxicity factor then allows for the classification of the chemical as follows:

1. If IC₅₀ plate irradiated (+UVA) and plate non-irradiated (-UVA) are less than 100 µg ml⁻¹

- PIF >5 phototoxic
PIF <5 non-phototoxic
2. If plate irradiated (+UVA) and plate non-irradiated (–UVA) are more $100 \mu\text{g ml}^{-1}$
PIF = 1* non-phototoxic
3. If just IC₅₀ (– UVA) is $100 \mu\text{g ml}^{-1}$
PIF >1* potential phototoxic

3. Results

3.1. Cytotoxicity of commercial surfactants

In order to compare the differences between cytotoxic and non-cytotoxic compounds, three reference surfactants, with knowing human toxicity/irritancy

(Wilcox and Bruner, 1990) were employed, a high irritant cationic surfactant, hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB), a middle irritant anionic surfactant, sodium lauryl sulphate and a slight irritant amphoteric surfactant, cocoamidopropylbetaine (Tego-betaine) (Attwood and Florence, 1983).

There was a difference in the cytotoxicity of the eight surfactants tested (Tables 2 and 3). It was evident that HTAB and SLS were rated as highly ocular irritants by their effects on haemolysis and denaturation of haemoglobin in contrast to the other surfactants which would be classified as middle irritants (Table 2).

When evaluated in the cell cultures (Table 3) as expected HTAB was far more toxic than 14,14-L-arginine, 8,8-L-arginine, 10,10-L-arginine, SLS, Cocoamidopropyl betaine, 12,12-L-acetyl-arginine and with 12,12-L-arginine least toxic.

Table 2

HC₅₀, denaturation index (DI), lysis/denaturation ratio (L/D) and classification of the surfactants by their potential ocular irritation

Compounds	HC ₅₀		DI	L/D	Ocular irritancy classification
	$\mu\text{g ml}^{-1}$ (S.E.M.)	$\mu\text{mol l}^{-1}$			
8,8-L-Arginine	24.0 (2.9)	48	19.1	1.3	Middle irritant
10,10-L-Arginine	20.5 (1.3)	37	11.9	1.7	Middle irritant
12,12-L-Arginine	60.1 (4.5)	98	11.7	5.6	Middle irritant
12,12-L-Acetyl-arginine	75.1 (6.0)	109	10.7	6.4	Middle irritant
14,14-L-Arginine	64.3 (0.2)	96	12.8	5.0	Middle irritant
Hexadecyl trimethyl ammonium bromide	43 (1.5)	119	46.5	0.94	High irritant
Sodium lauryl sulphate	43.6 (1.5)	151	100	0.4	High irritant
Cocoamidopropyl betaine	34.4 (2.2)	65	14.4	2.4	Middle irritant

Values are means for minimum three independent experiments.

Table 3

IC₅₀ values of all tested compounds based on the uptake of neutral red by 3T6 mouse fibroblasts and provisional classification in reference to commercial surfactants irritancy valuations

Compounds	IC ₅₀		Dermal irritancy classification
	$\mu\text{g ml}^{-1}$ (S.E.M.)	$\mu\text{mol l}^{-1}$	
8,8-L-Arginine	60.5 (2.6)	121	Middle irritant
10,10-L-Arginine	74.8 (3.5)	134	Middle irritant
12,12-L-Arginine	345.2 (40.6)	565	Slight irritant
12,12-L-Acetyl-arginine	294.6 (87.8)	427	Slight irritant
14,14-L-Arginine	63.7 (12.6)	95	Middle irritant
Hexadecyl trimethyl ammonium bromide	0.5 (0.2)	1	High irritant
Sodium lauryl sulphate	71.1 (5.1)	250	Middle irritant
Cocoamidopropyl betaine	165.7 (19.8)	310	Slight irritant

Incubation time: 24 h. Values are means for minimum three independent experiments.

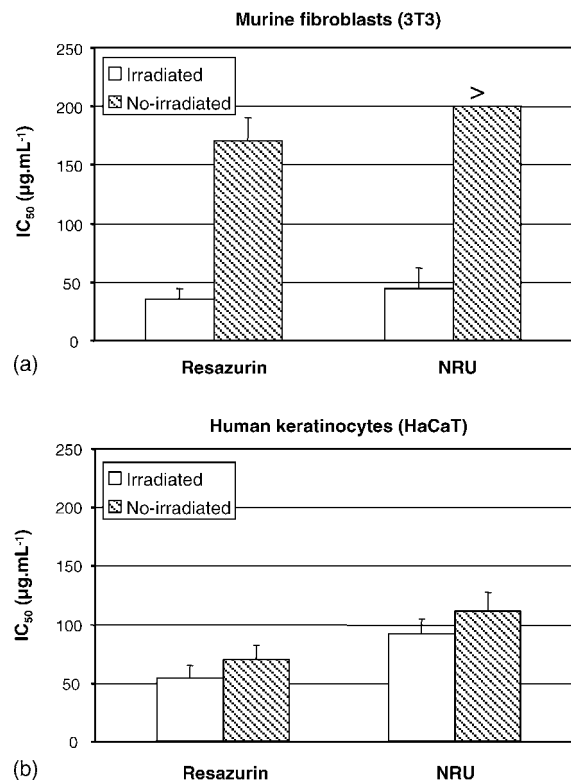


Fig. 2. Results of 12,12-L-acetyl-arginine phototoxicity in 3T3 mouse fibroblast and HaCaT human keratinocyte by Resazurin assay (mitochondrial transport) and neutral red uptake assay (membrane integrity). The irradiated plate were compared to the no-irradiated plate results in both assays. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of minimum three experiments.

3.2. Effects on membrane integrity as the measure of cytotoxicity action

The effects of the surfactants on the membrane integrity were evaluated in parallel using the red blood cell assay (Table 2) and the neutral red uptake method in 3T6 (Table 3).

3.3. Effects on cells as a result of photoactivation

Only chemical 12,12-L-acetyl-arginine, the less haemolytic, slight dermal cytotoxic and the most chemically stable (Pérez et al., 2002), was tested in parallel with the 3T3 cells and the HaCaT cells to determine their phototoxicity (Fig. 2a and b) by the NRU and resazurin assay.

Results revealed that the sensibility of the two cell lines is different independently to the assay procedure.

In 3T3 fibroblasts the surfactant showed a photoirritation factor (PIF) >1 , this value indicates a probably phototoxic effect.

With the HaCaT cells the values were $55 \mu\text{g ml}^{-1}$ with UVA and $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ in its absence in the resazurin assay and higher but again without significant differences between the exposed and non-exposed in the NRU assay (Fig. 2b). According to these results 12,12-L-acetyl-arginine was not phototoxic to the keratinocytes.

4. Discussion

The criticism of the classical *in vivo* methods to predict skin or ocular irritation stimulated the development of a number of replacement *in vitro* methods, which have been recently reviewed (Worth and Balls, 2002) in order to reduce the number of animal experiments. *In vitro* test substitutes include, fertilized egg chorioallantoic membrane, keratin/collagen matrix linked to a dye, erythrocytes, reconstructed human skin and living cells submerged in culture (e.g. fibroblasts and keratinocytes) (Botham et al., 1999; Brantom et al., 1997; Karting et al., 1994; Wilcox and Bruner, 1990).

For cutaneous irritants many of these *in vitro* targets are either of little biological relevance, or are difficult to obtain, or the assays are difficult to reproduce from one laboratory to another. Erythrocytes have been suggested as a readily available and good target for ocular irritation assessment (Pape et al., 1987). A biologically relevant target for human skin irritants are human keratinocytes or dermal fibroblasts (Moreno, 2000; Van de Sandt et al., 1999; Wihelm et al., 2001). The human material required for primary culture cells is potentially variable, but are available commercially along with defined media. We chose 3T6, 3T3 and HaCaT cells as the model cell systems. The use of the HaCaT, non tumorigenic, and spontaneously immortalized cell lines has the advantage of providing and almost unlimited supply of identical cells, assuring high intralaboratory and interlaboratory reproducibility (Spielmann et al., 1998).

The new arginine-derived surfactants (Fig. 1 and Table 1) were compared to commercial surfactants

with known toxicological behaviour in aqueous conditions. Having a light molecular weight, these compounds pass through the transepithelial barrier. Both cytotoxicity assays (Neutral Red Uptake in 3T6 fibroblasts and Red blood cell assay) were performed before progressing to the phototoxicity assay, in order to discriminate cytotoxic from non-cytotoxic compounds.

The haemolytic action of the surfactants studied showed a clear tendency to decrease with increase in hydrophobic chain length. The most haemolytic were the surfactants with shorter chains (8 and 10 carbon atoms). Nevertheless, the ocular irritation for all the arginine derivate surfactants is similar to Cocoamidopropyl betaine and less than HTAB and SLS. The dermal irritation predicted from the cytotoxic effects on 3T6 fibroblast suggested that surfactants with 12 carbon atoms were the less irritant. The irritancy classification of the compounds was different in both models (Tables 2 and 3), showing some surfactants less dermal toxicity than ocular. The results related to the haemolytic action observed in the present study are similar to those previously reported with other amino acid-based surfactants in rat erythrocytes (Macián et al., 1996) and also human erythrocytes (Vinardell and Infante, 1999) since the surfactants with larger hydrophobic moiety are less haemolytic than those with smaller carbon chains.

A possible explanation for this is that activity decreases with increasing carbon chain length. The maximum for 8,8-L-arginine and 10,10-L-arginine can be attributed to the combination of a number of physicochemical parameters: hydrophobicity, adsorption, critical micellar concentration and aqueous solubility, the solubility being the limited step for the transport across the membrane.

A equilibrium between enough water solubility and antimicrobial activity, less cytotoxicity and good chemical stability was the formulation 12,12-L-arginine and their acetylated form 12,12-L-acetyl-arginine, and studies of their stability showed that the acetylated form was the most stable (unpublished data).

The surfactant 12,12-L-acetyl-arginine was therefore chosen for phototoxicity evaluation using the 3T3 fibroblasts, a validated method (Spielmann et al., 1998), and the HaCaT keratinocytes alternative (Clothier et al., 1999).

The 3T3 neutral red uptake phototoxicity assay, accepted by the European Commission obtained a per-

fect correlation of in vivo and in vitro results (between 95 and 100%) (Karting et al., 1994).

12,12-L-Acetyl-arginine was shown to have a potential photoirritant effect. The resazurin assay is based in the reduction of resazurin to resorufin by cellular reductases, a parameter to determine cell viability studying their mitochondrial integrity. The resazurin assay does not injure the cells, and it is possible to use the culture in repeat assays (Clothier et al., 1997). This assay has a very good correlation coefficient with human patch test (Lee et al., 2000; Reid et al., 2001).

The strong difference of cytotoxicity determined in 3T3 fibroblasts between UVA irradiated plate and non UVA-irradiated plate by neutral red uptake assay was also observed by the resazurin assay. In HaCaT keratinocytes this potential phototoxic effect is not evident by neutral red uptake or by resazurin assay. Such a difference between 3T3 fibroblasts and human keratinocyte has been observed previously (Clothier et al., 1999) and is related to variation in the ability to deal with oxidative stress (Clothier et al., 2002). Given the complexity of human ocular and skin biology, we interpreted these results with caution. No single in vitro model and no single assay will be able to mimic all the events that occur in a real eye or real skin. Thus, a battery of methods as presented, based in different mechanisms may be useful to evaluate irritation of pharmaceutical and cosmetic ingredients.

According to the present results, the surfactants with 12 carbon atoms are less irritant than the commercial surfactants studied. Although the potential photoirritant activity of the acetylated derivate, the amount of this surfactant needed in a dermal formulation will be lower than conventional available surfactants (<1%), due to their physicochemical efficacy and efficiency (Pérez et al., 2002). Then in a final product no phototoxic effects would be expected.

The in vitro cytotoxicity assays are a useful screening tool for the assessment of cytotoxicity of new synthetic surfactants. The employment of human keratinocytes is of greater human relevance to epidermal induced irritation, than animal derived fibroblast cells. After such in vitro screening of these chemicals, those predicted to be non-irritant may be tested in humans to confirm the results, an approach already in use industrially by cosmetics manufacturers.

In conclusion, these surfactants derived from arginine constitute a promising kind of surfactants to be employed in different pharmaceutical and cosmetic formulations according to their low irritant action.

Acknowledgements

We thank Dr. Nancy Khammo, Monica Owen and Nicola Bourne, FRAME laboratory, Queen's Medical Centre, Nottingham for their support and scientific advice, also Professor N. Fusenig for the supply of the HaCaT cells. This research was supported by the project PPQ2000-1687-C02-01 from CICYT (Spain). This research has been performed in the context of the "Unidad Asociada al CSIC" (Spain). Tomás Benavides and Veronica Martínez hold doctoral grants from the University of Barcelona (Spain).

References

- Applegate, L.A., Noël, A., Vile, G., Frenk, E., Tyrrell, R.M., 1995. Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblast and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. *Photochem. Photobiol.* 61, 285–291.
- Attwood, D., Florence, A.T., 1983. Aspects of surfactant toxicity. In: *Surfactant systems*, second ed. Chapman Hall Publications, London, New York, pp. 615–697.
- Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H., Spielmann, H., 1995. The EC/HO international validation study on alternatives to the draize eye irritation test. *Toxicol. Vitro.* 9, 871–929.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124.
- Botham, P.A., Earl, L.K., Fentem, J.H., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M., 1999. Alternative methods for skin irritation: the current status ECVAM Skin irritation task Force report 1. *ATLA Altern Lab. Anim.* 26, 195–211.
- Brantom, P.G., Brunner, L.H., Chamberlain, M., de Silva, O., Dupuis, J., Earl, L.K., Lovell, D.P., Pape, W.J.W., Uttley, M., Bagley, D.M., Baker, F.W., Bracher, M., Courtellemont, P., Declercq, L., Freeman, S., Steiling, W., Walker, A.P., Carr, G.J., Dami, N., Thomas, G., Harbell, J., Jones, P.A., Pfannenbecker, U., Southee, J.A., Tchong, M., Argembeaux, H., Castelli, D., Clothier, R., Esdaile, D.J., Itigaki, H., Jung, K., Kasai, Y., Kojima, H., Kristen, U., Larnicol, M., Lewis, R.W., Marenus, K., Moreno, O., Peterson, A., Rasmussen, E.S., Robles, C., Stern, M., 1997. A summary of the COLIPA International Validation Study on alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test. *Toxicol. Vitro.* 11, 141–179.
- Clothier, R., Beed, M., Sansom, R., Ward, R., 1997. An in vitro approach to the evaluation of repeat exposure in the prediction of toxicity. *Toxicol. Vitro.* 11, 679–682.
- Clothier, R., Willshaw, A., Cox, H., 1999. The use of human Keratinocytes in the EU/COLIPA International in vitro phototoxicity test validation study and the ECVAM/COLIPA study on UV filter chemicals. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 27, 247–259.
- Clothier, R., Starzec, G., Pradel, L., Baxter, V., Jones, M., Cox, H., Noble, L., 2002. The prediction of human skin responses by using the combined in vitro fluorescein leakage/Alamar Blue (Resazurin) assay. *ATLA Altern Lab. Anim.* 30, 493–504.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377–390.
- Effendy, I., Maibach, H.I., 1995. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Cont. Dermatol.* 33, 217–225.
- Isoherranen, K., Punnonen, K., Jansen, C., Uotila, P., 1999. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Brit. J. Dermatol.* 140, 1017–1022.
- Karting, H.C., Herzinger, T., Hartinger, A., Kerscher, M., Angerpointner, T., Maibach, H.I., 1994. Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblast: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *J. Dermatol. Sci.* 7, 119–129.
- Larson, E.M., Doughman, D.J., Gregerson, D.S., Obritsch, F., 1997. A new, simple, non radioactive, nontoxic in vitro assay to monitor corneal endothelial cell viability. *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 38, 1929–1933.
- Lee, J.K., Kim, D.B., Kim, J.I., Kim, P.Y., 2000. In vitro cytotoxicity tests on cultures human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol. Vitro.* 14, 345–349.
- Macián, M., Vives, M.A., Seguer, J., Infante, M.R., Selve, C., Vinardell, M.P., 1996. Haemolysis action of non-ionic surfactants derived from lysine in rat erythrocytes. *Pharm. Sci.* 2, 1246–1248.
- Moreno, J.M., 2000. Arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis as irritant index of surfactants in 3T6 fibroblast cultures. *Toxicology* 143, 275–282.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426.
- Pape, W.J.W., Pfannenbecker, U., Hoppe, U., 1987. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.* 1, 525–536.
- Pérez, L., Pinazo, A., Vinardell, M.P., Clapés, P., Angelat, M., Infante, M.R., 2002. A synthesis and biological properties of dicationic arginine-diglycerides. *New J. Chem.* 26, 1221–1227.
- Reid, L., Clothier, R.H., Khammo, N., 2001. Hydrogen peroxide induced stress in human keratinocytes and its effect on bithionol toxicity. *Toxicol. Vitro.* 15, 441–445.

- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J., Pechovitch, G., de Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., Brantom, P., 1998. The international EU/COLIPA in vitro Phototoxicity Validation Study results of phase II (blind trial). Part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicol. Vitro* 12, 305–327.
- Van de Sandt, J., Roguet, R., Cohen, C., Esdaile, D., Panec, M., Corsini, E., Parker, C., Fusenig, N., Liebsch, M., Benford, D., de Brugerolle de Fraissinette, A., Forstach, M., 1999. The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *ATLA Altern Lab. Anim.* 27, 723–743.
- Vinardell, M.P., Infante, M.R., 1999. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their haemolytic action on human erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 124C, 117–120.
- Ward, R.K., Hubbard, A.W., Sulley, H., Garle, M.J., 1998. Human keratinocyte cultures in an in vitro approach for the assessment of surfactant-induced irritation. *Toxicol. Vitro* 12, 163–173.
- Wihelm, K.P., Böttjer, B., Siegers, C.P., 2001. Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxic model: comparison with in vivo human irritation tests. *Br. J. Dermatol.* 145, 709–715.
- Wilcox, D.K., Bruner, L.H., 1990. In vitro alternatives for ocular safety testing: an outline of assays and possible future developments. *ATLA Altern Lab. Anim.* 18, 117–128.
- Worth, A.P., Balls, M., 2002. The principles of validation and the ECVAM validation process. *ATLA Altern Lab. Anim.* 30, 15–21.

Low Potential Ocular Irritation of Arginine-Based Gemini Surfactants and Their Mixtures with Nonionic and Zwitterionic Surfactants

Montserrat Mitjans,¹ Verónica Martínez,¹
Pere Clapés,² Lourdes Pérez,³ M. Rosa Infante,³ and
M. Pilar Vinardell^{1,4,5}

Received May 28, 2003; accepted June 30, 2003

Purpose. The aim of this study was to find new biocompatible surfactants and mixtures with low ocular irritant action for application in pharmaceutical formulations and to establish a relationship between their structure and their potential ocular irritant activity.

Methods. An alternative method to the Draize *in vivo* test, based on the adverse effects of surfactants on the cytoplasmic membrane of red blood cell, was used to evaluate the potential ocular irritation of the surfactants.

Results. It was found that the hemolytic activity of arginine-based gemini surfactants increased with the aliphatic alkyl chain lengths of the hydrophobic tail. The addition of the surfactant with an alkyl chain length of 10 carbon atoms to cocoamidopropylbetaine (TB), decylglucoside (APG), and N^α-lauroyl-arginine ethyl ester (LAE) increases the hemolytic activity moderately for the mixtures with TB and LAE (1.1- and 1.5-fold, respectively) and strongly for APG (five-fold).

Conclusions. The new arginine-based gemini surfactants constitute a suitable alternative to commercial surfactants because of their natural origins, which make them biocompatible and renewable products. Based on their hemolytic activity as an alternative to the Draize test, these new arginine-based gemini surfactants and their mixtures can be classified as mild irritants. This fact constitutes an advantage, especially for pharmaceutical and cosmetic applications.

KEY WORDS: hemolysis; arginine-based surfactants; red blood cell; lipoamino acids; ocular irritation.

INTRODUCTION

Surfactants, in accordance with their surface or interface activities, are among the most versatile and frequently applied excipients in pharmaceutical technology. Among the different applications of surfactants it has been shown that they can be used to give prolonged release from gels through the partition of drugs to micelles (1). However, the application of pharmaceutical or cosmetic products containing these compounds should avoid skin or eye irritation or other side reactions. Therefore, special attention must be paid to these facts from the very first moment when preformulation trials

are started, and the development of new nonirritant surfactants is of considerable interest.

Amino acid-based surfactants have attracted much interest as environmentally friendly surfactants because of their biocompatibility, low toxicity, excellent emulsifying properties, and antimicrobial activity (2,3). An obvious strategy to increase the efficiency and the efficacy of amino acid-based single chain structures is to build up dimeric structures from lipoamino acids. Among the amino acid-based gemini surfactants, our interest is focused on arginine derivatives such as the bis(N^α-acyl-L-arginine)- α,ω -polymethylenediamide dihydrochloride [bis(Args)] (Fig. 1a).

An important characteristic of gemini surfactants is their great potential in mixtures with other surfactants. In most practical applications, mixtures of surfactants rather than individual surfactants are used. This is because mixing surfactants with different hydrophobic and hydrophilic groups enhances the performance of the final product. This occurs when synergism exists between the surfactants present in the mixture (4).

In this work we investigated the potential ocular irritation of arginine-based gemini cationic surfactants such as C₃(OA)₂, C₃(CA)₂, C₃(LA)₂, C₃OH(LA)₂ (Fig. 1a), and their mixtures with conventional widely used decylglucoside (APG), tego-betaine (TB), and N^α-lauroyl-arginine ethyl ester (LAE) surfactants. The potential ocular irritation of these arginine-based gemini surfactants and mixtures was assayed by the red blood cell assay (5). Eye irritation potency has traditionally been scored using the Draize rabbit eye test (6), proposed as a routine procedure to assess irritancy in safety evaluation. The red blood cell assay constitutes one of the alternatives to the Draize test to avoid the use of animals for ethical reasons (7,8). The leaking of erythrocytes is mainly caused by a low surfactant concentration, usually below the critical micellar concentration (CMC), whereas erythrocyte rupture is initiated by rather high concentrations of amphiphilic substances or micelles (9). For this reason, we also investigate if there is any relationship between the hemolytic activity of the surfactants studied and their CMC.

MATERIAL AND METHODS

Surfactants

Bis(N^α-acyl-L-arginine)- α,ω -polymethylenediamide dihydrochloride (bis(Args)) was synthesized in our lab following the procedure described previously (10) (Fig. 1a).

Cocoamidopropylbetaine (Tego-betaine T-50; TB) was from Goldschmidt AG (Germany); decylglucoside (Plantcare 2000; APG) was from Henkel AG (Germany); and N^α-lauroyl-arginine ethyl ester (LAE) was a generous gift of Laboratorios Miret S.A. (Barcelona, Spain). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was obtained from Sigma Aldrich (Germany).

Determination of Critical Micellar Concentration

Aqueous surfactant solutions of different concentrations were prepared and allowed to equilibrate at 25°C for 24 h. A Krüss KA12 tensiometer with a roughened platinum plate attached to a precision torsion balance was used for measuring equilibrium surface tensions. The critical micellar concen-

¹ Dept. Fisiologia-Divisió IV, Facultat de Farmacia (UB), Av Joan XXIII, s/n, 08028, Barcelona, Spain.

² Dept. Química de Péptidos y Proteína, IIQA-CSIC, Jorge Girona, Barcelona, Spain.

³ Dept. Tecnologia de Tensiactivos, IIQA-CSIC, Jorge Girona, Barcelona, Spain.

⁴ Unidad Asociada CSIC-8004., Spain.

⁵ To whom correspondence should be addressed. (email: pilarv@farmacia.far.ub.es)

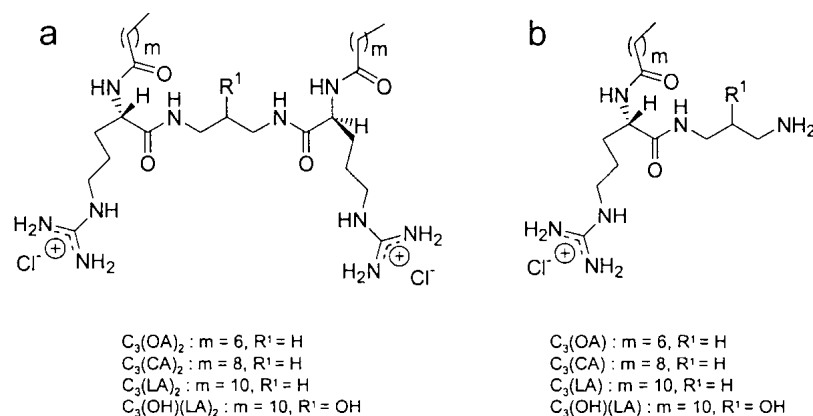


Fig. 1. Chemical structure and nomenclature of gemini surfactants (a) and their synthetic precursors (b).

tration (CMC) was determined from the break point of the surface tension/concentration curves (11).

Preparation of Erythrocyte Suspensions

Human blood was obtained from the Blood Bank of the Hospital Clinic (Barcelona, Spain). The erythrocytes were washed three times in isotonic phosphate buffer saline (PBS) containing 22.2 mM Na_2HPO_4 , 5.6 mM KH_2PO_4 , 123.3 mM NaCl, and glucose 10.0 mM in distilled water (pH 7.4). The cells were then suspended in isotonic saline solution (NaCl 0.9%) at a cell density of 8×10^9 cell/ml.

Incubation Media

Because of the lack of solubility of the arginine-based surfactants in PBS solution, different solvents have been tested to find the best one to dilute these surfactants. The hemolysis test of the SDS was performed in PBS, Tris-mannitol, and NaCl 0.9% solutions for comparative purposes.

Hemolysis Assay

Different volumes ranging from 10 to 80 μ l of surfactant solution (from 1 mg/ml) were introduced in polystyrene tubes to assay various concentrations (from 5 to 1000 μ g/ml) of these surfactants. Aliquots of 25 μ l of erythrocyte suspension were added to the tubes and incubated for 10 min, with constant shaking, at room temperature. After incubation, the tubes were centrifuged (5 min at $1500 \times g$), and, finally, the percentage of hemolysis was determined by comparing the absorbance (540 nm) of the supernatant with that of control samples totally hemolyzed with distilled water (5). From the hemolysis results, the dose–response curve was determined, and the concentration that induces the hemolysis of 50% of the cells (HC_{50}) in the erythrocyte suspension was subsequently calculated.

Potential Ocular Irritation

The potential ocular irritation of the surfactants was studied with a method based on the use of red blood cells to quantify adverse effects of surfactants and detergent products on the cytoplasmic membrane (hemolysis) in combination with the damage to liberated cellular proteins (denaturation). The irritation index was determined according to the lysis/denaturation ratio (L/D) obtained dividing the HC_{50} (μ g/ml)

by the denaturation index. The denaturation index (DI) of each surfactant was determined by comparing the hemoglobin denaturation induced by the surfactant and SDS as positive control. Hemoglobin denaturation was determined after inducing hemolysis by adding 10 mg/ml of the surfactant or SDS and measuring the absorption ratio of the supernatant at 575 nm and 540 nm. The resulting L/D ratio is used instead of the ocular irritancy score in the acute phase of *in vivo* evaluation. The surfactants can be classified according to this L/D ratio as nonirritant (>100), slight irritant (>10), moderate irritant (>1), irritant (>0.1), and very irritant (< 0.1) (5).

RESULTS AND DISCUSSION

The red blood cell test is a rapid *in vitro* screening assay to assess the acute eye irritation potential that could be induced by surfactants or final products containing them and has been proposed as a good alternative to the Draize test (5).

It was found that when the arginine-based gemini surfactants were dissolved in aqueous PBS buffer solutions, a precipitate appeared in a few minutes. To avoid these solubility problems and, therefore, to obtain reliable results on the hemolytic activity, isotonic NaCl solution (0.9% w/v) and Tris-mannitol buffer (pH 7.4) were assayed as alternative incubation media. In both solutions the arginine-based gemini surfactants were soluble at the concentrations used for the assay. Both incubation media were validated with SDS, which was used as the positive control. Similar hemolytic activity was observed when the surfactant was dissolved in PBS and in NaCl solution (HC_{50} 42.5 and 44.3 μ g/ml, respectively). By contrast, the hemolytic activity of SDS was lower when Tris-mannitol buffer was used (HC_{50} 122.2 μ g/mL). On the basis of these results, the whole study was performed using NaCl solution as incubation medium. The reduction of the irritant effect of the surfactant can be explained by the formation of Tris dodecyl sulfate, which has less hemolytic activity, as has been demonstrated in previous works where the effect of Tris as counterion has been pointed out (12).

Results of hemolysis obtained at different concentrations for gemini surfactants and their synthetic precursors (Fig. 1b) are presented in dose–response curves (Fig. 2). When a hydroxyl group was added to the gemini $C_3(LA)_2$ and its precursor $C_3(LA)$, no effect on the hemolytic activity was induced. Thus, the addition of this group does not contribute to additional benefits or irritation effects of the surfactant. The

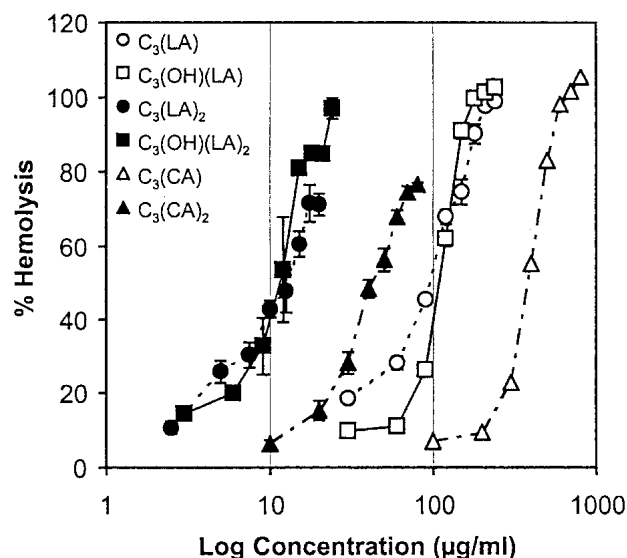


Fig. 2. Hemolysis induced by gemini surfactants and their synthetic precursors. Results are expressed as mean \pm standard deviation of three experiments.

study of the hemolytic activity of the synthetic precursors of these arginine-based gemini surfactants is an important issue because the (bio)degradation products from these gemini surfactants may be structurally similar. Moreover, technical-grade preparations of these surfactants may contain variable amounts of starting materials or synthetic intermediates, which can have different toxicity profiles. It is interesting to note that the synthetic precursors of these arginine-based gemini surfactants were about 15-fold less hemolytic than the corresponding gemini surfactants. This could result, among other things, from their lower hydrophobicity because they have two polar groups and just one hydrophobic aliphatic alkyl chain. This fact is of great interest because the presence of this intermediate in the final product would not affect the potential ocular irritation of the end product.

When surfactants are added to the erythrocyte suspension in an aqueous medium, they could first distribute between the erythrocyte membrane and the solution by adsorp-

tion until equilibrium is reached. The surfactant-erythrocyte membrane interaction at sublytic concentration could be governed by the affinity of each surfactant for the aqueous medium or the membrane, a factor that is closely related to the hydrophobicity of surfactants and consequently to the critical micellar concentration (CMC) (13). Hemolysis probably begins when the erythrocyte membranes are saturated with the surfactant molecules. Table I shows the CMC and the 50% hemolytic concentration (HC_{50}) of the different surfactants studied. From these results, we found that there exists a good correlation between the CMC and HC_{50} ($r = 0.9998$) of the gemini surfactants. It is also interesting to note that the CMC decreases in the opposite direction to the number of carbon atoms present in the alkyl chain length (Fig. 1a). In agreement with these data, we may conclude that the longer the alkyl chain length, the higher is the hemolytic activity (i.e., the lower the HC_{50} values). In the same way, a similar correlation was found with lysine derivate surfactants (14), thus supporting this hypothesis. In contrast to these results, the commercial surfactants studied and the mixtures did not present this correlation in a similar way to other studies with nonionic alkylpolyglycosides (15), probably because of the difficulty of polymeric surfactants to form micelles.

Mixtures of different kinds of surfactants are particularly attractive because the performance of the final product is superior to those of the individual surfactants, thus increasing the range of applications. In the present work, we studied the hemolytic activity of the mixtures of the conventional surfactants such as decylglucoside (APG) and tigo-betaine (TB) with the arginine-based gemini surfactant $C_3(LA)_2$. In addition, mixtures of $C_3(LA)_2$ with another arginine-based surfactant such as N-lauroyl-L-arginine ethyl ester were also investigated. We selected $C_3(LA)_2$ because preliminary studies in our laboratory indicated that it gave a better performance to its mixtures in terms of CMC reduction (data not shown).

Table I lists the CMC values for each surfactant mixture. The minimum α values [minimum molar fraction of $C_3(LA)_2$ that produces a significant decrease in the CMC value in the mixture] are 0.17, 0.30, and 0.20 for APG, TB, and LAE, respectively. The data revealed that a small molar fraction of $C_3(LA)_2$ in the mixture decreased its CMC about five- to

Table I. CMC, Hemolytic Effect, Denaturation Index, Lysis/Denaturation Ratio and Classification of Gemini, Commercial and Surfactant Mixtures

Surfactant	CMC (10^{-6} M)	HC_{50}^a ($\mu\text{g/ml}$)	DI ^b	L/D ^c	Classification
$C_3(OA)_2$	700	>1000	0.3	>3,000	Non irritant
$C_3(CA)_2$	30	48.1 ± 0.4	12.1	4.0	Moderate
$C_3(LA)_2$	4.7	12.5 ± 0.4	8.2	1.5	Moderate
$C_3(OH)(LA)_2$	7.0	12.1 ± 0.6	11.4	1.0	Moderate
LAE	100	38.4 ± 1.1	13.3	2.9	Moderate
LAE + $C_3(LA)_2$	20	34.4 ± 0.4	14.7	2.3	Moderate
TB	167	34.4 ± 2.2	14.4	2.4	Moderate
TB + $C_3(LA)_2$	32	22.4 ± 0.6	9.4	2.4	Moderate
APG	167	251.9 ± 5.8	14.2	17.8	Slight
APG + $C_3(LA)_2$	15	47.0 ± 0.8	12.3	3.8	Moderate

^a Hemolytic concentration causing 50% hemolysis; results are expressed as mean \pm standard deviation.

^b Denaturation index

^c Lysis/denaturation ratio

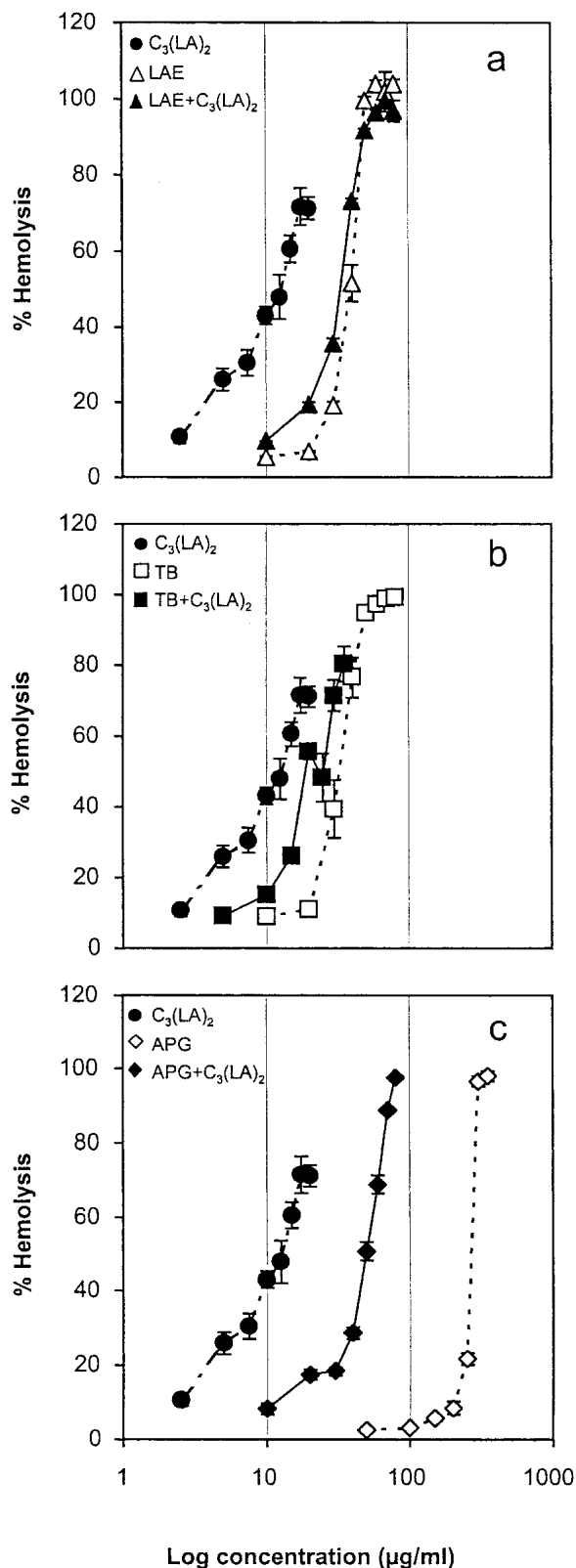


Fig. 3. Hemolysis induced by LAE (a), TB (b), APG (c), and their mixtures with $C_3(LA)_2$. Results are expressed as mean \pm standard deviation of three experiments.

10-fold compared to the individual APG, LAE, and TB surfactants.

The addition of $C_3(LA)_2$ to conventional surfactants induced small changes in the hemolytic activity except for the decylglucoside (APG). In this case the hemolytic activity increased fivefold (i.e., the HC_{50} is smaller for the mixture than for the surfactant alone) (Fig. 3). As has been pointed before, when $C_3(LA)_2$ is mixed with APG, LAE, and TB, there was a reduction of the CMC of the mixture. This reduction in the CMC was parallel to the reduction observed in the HC_{50} of the mixture, which indicates that the formation of micelles may be responsible for the hemolytic action of this gemini surfactant alone or with other surfactants.

Table I also shows the denaturation index (DI), the lysis/denaturation ratio (L/D), and the potential ocular irritation of the different surfactants and mixtures studied. The gemini surfactants and their mixtures with conventional nonionic or zwitterionic surfactants tested in the present study are mild and even nonirritant in a way comparable to the commercial surfactants tested. Moreover, because of their physicochemical characteristics, the amount of these new compounds required in formulations will be lower than conventionally available surfactants, and thus, less ocular irritation is expected when these are applied in different cosmetic or pharmaceutical consumer goods. According to the results of the present work we can conclude that the new arginine-based gemini surfactants and their mixtures constitute a promising alternative to other commercial surfactants.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the project PPQ2000-1687-C02-01 from CICYT (Spain). Veronica Martínez holds a doctoral grant from the University of Barcelona (Spain).

REFERENCES

1. M. Paulsson and K. Edsman. Controlled drug release from gels using surfactants aggregates. II Vesicles formed from mixtures of amphiphilic drugs and oppositely charged surfactants. *Pharm. Res.* **18**:1586–1592 (2001).
2. P. Clapés and M. R. Infante. Amino acid-based surfactants: Enzymatic synthesis, properties and potential applications. *BioCAT. Biotrans* **20**:215–233 (2002).
3. R. Valivety, I. S. Gill, and E. N. Vulfson. Application of enzymes to the synthesis of amino acid-based bola and gemini surfactants. *J. Surfactants Deterg* **1**:177–185 (1998).
4. J. D. Hines. Theoretical aspects of micellisation in surfactant mixtures. *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.* **6**:350–356 (2001).
5. W. J. W. Pape, U. Pfannenbecker, and U. Hoppe. Validation of the red blood cell test system as *in vitro* assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.* **1**: 525–536 (1987).
6. J. H. Draize, G. Woodard, and H. O. Calvery. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **82**:377–390 (1944).
7. M. Balls, P. A. Botham, L. H. Bruner, and H. Spielmann. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* **9**:871–929 (1995).
8. A. A. Kulkarni and A. J. Hopfinger. Membrane-interaction QSAR analysis: application to the estimation of eye irritation by organic compounds. *Pharm. Res.* **16**:1245–1253 (1999).
9. B. Isomaa, H. Hägerstrand, G. Paatero, and A. C. Engblom. Permeability alterations and anti-hemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* **860**:510–524 (1986).

10. E. Piera, M. R. Infante, and P. Clapes. Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **70**: 323–331 (2000).
11. M. R. Infante, J. Seguer, A. Pinazo, and M. P. Vinardell. Synthesis and properties of symmetrical nonionic double chain surfactants from lysine. *J. Dispers. Sci. Technol.* **20**:621–642 (1999).
12. M. A. Vives, M. R. Infante, E. García, C. Selve, M. Maugras, and M. P. Vinardell. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. *Chemico-Biol Interact* **118**:1–18 (1999).
13. D. Liechtenberg, R. J. Robson, and E. A. Dennis. Solubilization of phospholipids by detergents: structural and kinetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **737**:285–304 (1983).
14. M. Macián, J. Seguer, M. R. Infante, C. Selve, and M. P. Vinardell. Preliminary studies of the toxic effects of non-ionic surfactants derived from lysine. *Toxicol* **106**:1–9 (1996).
15. T. Reinhart and K. H. Bauer. Investigations about hemolysis and solubilization behaviour of nonionic polymeric surfactants. *Pharmazie* **50**:403–407 (1995).