

REPORTE DE SERVICIO No.
VD690-2023_Soft Care All Purpose
Fecha de emisión:25.08.2023

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE IRRITACIÓN DÉRMICA EMPLEANDO EL
MODELO DE EPIDERMIS HUMANA RECONSTITUIDA VITRODERM**

Cliente: **BCPE DIAMOND MEXICO HOLDCO, S. DE R.L. DE C.V**

Dirección: Av. Henry Ford No. 12, Col. Industrial San Nicolas,
Tlalnepantla de Baz, Estado de México. C.P. 54030

Contacto: Laura Itzel Estrada

Teléfono: 55 18359553

Fax: ---

E-mail: lauraitzel.estrada@diversey.com

Laboratorio evaluador: **ILAB In Vitro Toxicology Mexico**

Dirección: Valle Hermoso No.45
El Marqués Queretano, Qro.

Contacto y responsable: Leopoldo Sanabria / Andrea Cano

Teléfono: 442 610 7953 /442 690 5471

E-mail: leopoldo.sanabria@ilabmexico.com/andrea.cano@ilabmexico.com

Contenido

1. Resumen	3
2. Objetivo	4
3. Introducción	4
3.1. Fundamento	4
3.2. Modelo de evaluación VitroDerm.....	4
4. Método	5
4.1. Preparación de los tejidos de cultivo para evaluación.....	5
4.2. Muestras	5
4.3. Exposición a tratamientos	5
4.4. Ensayo MTT de viabilidad celular	5
4.5. Criterio de clasificación.....	6
5. Resultados.....	7
5.1. Ensayo MTT de viabilidad celular	7
6. Conclusiones	8
7. Revisión.....	9
8. Referencias	10
9. Apéndice.....	11

Lista de tablas

Tabla1. Identificación de muestras.....	5
Tabla2. Modelo de Predicción.....	6
Tabla3. Efecto irritante y citotóxico de los tratamientos evaluados en el modelo de EHR VitroDerm.	7
Tabla 4. Clasificación de los tratamientos evaluados empleando el modelo de predicción correspondiente al EHR VitroDerm	8

Lista de figuras

Figura 1: Modelo de EHR VitroDerm.....	4
--	---

1. Resumen

Objetivo

Evaluar el potencial de irritación dérmica de un jabón líquido, empleando el modelo de Epidermis Humana Reconstituida VitroDerm.

En este estudio se llevó a cabo el ensayo de viabilidad MTT.

Los resultados obtenidos por el ensayo indican, en este sistema de evaluación, el siguiente perfil de irritación:

Resultados

Descripción de la muestra	Clasificación NI / I ¹
Soft Care All Purpose, 19/05/23	NI

¹ NI: No irritante

I: Irritante

Conclusiones

Después del periodo de exposición, bajo el modelo y condiciones empleadas, se manifestó un efecto No irritante para el tratamiento evaluado.

2. Objetivo

Evaluar el potencial de irritación dérmica de un jabón líquido, empleando el modelo de Epidermis Humana Reconstituida VitroDerm.

3. Introducción

3.1. Fundamento

Los irritantes son químicos que causan un daño reversible en la piel (a diferencia de los corrosivos que causan daños irreversibles). La acción irritante de una sustancia depende de su habilidad para penetrar las capas externas de la piel (estrato córneo; compuesto de células muertas) las cuales actúan como una barrera protectora. Una vez que ha pasado la barrera protectora, el irritante entra en contacto con células vivas y sensitivas e interactúa con químicos endógenos que se encuentran de forma natural en esas capas de la piel, generando un daño como resultado.

La primera respuesta del cuerpo ante un daño al tejido es una inflamación aguda localizada ya que las células próximas intentan establecer una defensa ante el químico agresor y acelerar su eliminación. La inflamación tiene cuatro componentes principales: dolor, calor, enrojecimiento e hinchazón. La respuesta es proporcional al grado de irritación (dosis - respuesta), al igual que lo son la cantidad de citoquinas producidas por los queratinocitos en la piel con el objeto de promover y controlar esta respuesta inflamatoria temprana.

3.2. Modelo de evaluación VitroDerm

Modelos alternativos de Epidermis Humana Reconstituida (EHR) simulan de manera muy cercana a la piel normal y a partir de que en éstos se ha comprobado la reproducción de la función de barrera de la epidermis humana normal, sobre la premisa de que los irritantes son capaces de penetrar el estrato córneo y causar un efecto citotóxico en las capas siguientes de la epidermis, dichos modelos pueden ser ampliamente utilizados para la investigación de irritantes potenciales para la piel.

El modelo VitroDerm, emplea queratinocitos de epidermis humana normal de neonato (HEKN; una de las células con mayor presencia en la piel), los cuales son cultivados en insertos especiales y con nutrientes libres de productos animales por un periodo de 16 días.

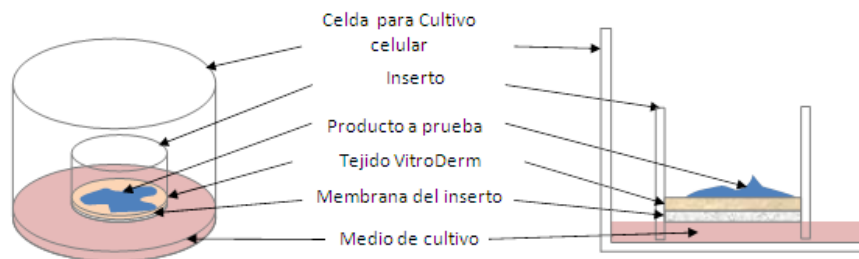


Figura1. Modelo de EHR VitroDerm

Las sustancias a prueba pueden ser aplicadas tópicamente, directamente sobre la superficie de la epidermis, y el potencial de irritación puede ser evaluado mediante diferentes puntos finales entre los cuales se encuentra la viabilidad celular.

4. Método

4.1. Preparación de los tejidos de cultivo para evaluación

El método de preparación de los tejidos de epidermis humana reconstituida VitroDerm es una adaptación del método propuesto por Poumayet *al.*, 2004 (1).

4.2. Muestras

La muestra fue suministrada por el cliente e identificada para la prueba de la siguiente manera:

ID Interno	Descripción de la muestra	Fecha de recepción	¿Cumple criterios? Si/No
SCP	Soft Care All Purpose, 19/05/23	18-Jul-23	Si

Tabla1.Identificación de muestras

**Criterios: Esterilidad, cantidad de muestra, empaque/identificación.*

4.3. Exposición a tratamientos

Los tejidos fueron expuestos al producto a prueba (20 µl) en dilución 2% v/v para productos de enjuague en la superficie de la piel cultivada (n=2) e incubados a 37°C por un periodo extendido a 6h. Tejidos control sin tratamiento (CST) fueron tratados de la misma forma y controles positivos (0.5% y 2.0% SLS) fueron incluidos en el estudio con el objetivo de evaluar una respuesta relacionada a la dosis de aplicación.

4.4. Ensayo MTT de viabilidad celular

El principio del modelo de Epidermis Humana Reconstituida (EHR) se basa nuevamente en la premisa de que los irritantes son capaces de penetrar el estrato córneo y causar un efecto citotóxico en las capas siguientes de la epidermis, la viabilidad celular ha mostrado una correlación directa con el potencial de irritación de los productos a prueba (3). El ensayo de Proliferación Celular MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio, azul de tiazol; número EINECS 206-069-5, número CAS 298-93-1)] es un método colorimétrico cuantitativo que permite determinar la proliferación o viabilidad celular del tejido. En éste se utiliza la sal, de color amarillo, de tetrazolio la cual es reducida por deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazan púrpura.

La absorbancia de la solución resultante es medida a 570nm empleando un lector de micro placas de Molecular Devices SpectraMax Plus 384. Los valores de absorbancia son capturados empleando el programa SOFTmax Pro y el análisis estadístico es llevado a cabo posteriormente, empleando el programa GraphPadPrism.

Las sustancias puras irritantes son identificadas por su capacidad de reducir la viabilidad celular de modelos reconstituidos por debajo de niveles considerados como umbrales (ej., $\leq 50\%$, para la categoría 2, irritantes del UN GHS¹). Acorde a los requerimientos de cada país y la aplicación de guías de evaluación estandarizadas (ej. OECD²) aquellas sustancias que generan viabilidades celulares por arriba del valor umbral no son clasificadas en alguna categoría (ej., $> 50\%$, sin categoría). En este sistema de evaluación para la clasificación de productos finales, destacando el área de cuidado personal, bajo umbrales de referencia, la exposición o tiempo de contacto es extendida a 6h.

4.5. Criterio de clasificación

% Viabilidad celular	Clasificación
> 50%	No irritante (NI)
$\leq 50\%$	Irritante (I)

Tabla2.Modelo de Predicción

¹GHS: Global Harmonized System

²OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

5. Resultados

5.1. Ensayo MTT de viabilidad celular

El potencial de irritación del tratamiento fue evaluado empleando el modelo de EHR VitroDerm y expresado en forma de porcentaje en relación a tejidos control sin tratamiento.

Descripción de la muestra	% Viabilidad celular ¹	DS % ²
CST	100.00	4.47
SLS (0.5%)	76.44	7.27
SLS (2%)	5.46	3.93
Soft Care All Purpose, 19/05/23	92.56	8.40

¹promedio de 2 réplicas

²DS: Desviación estándar

Fecha de inicio: 14.07.2023

Fecha de término: 03.08.2023

Tabla3. Efecto irritante y citotóxico de los tratamientos evaluados en el modelo de EHR VitroDerm.

El valor OD promedio de n=2 EHR por tratamiento evaluado fue calculado y presentado como % del control sin tratamiento ± % DS.

Una reducción de un 50% en la viabilidad celular es indicativa de irritación. Después de 6h de contacto con el tratamiento evaluado, la viabilidad celular no mostró reducción mayor al 50%.

Una respuesta adecuada al incremento en concentración del producto a prueba fue obtenida con los controles positivos incluidos en la prueba (0.5% y 2% SLS).

Las desviaciones estándares (asociadas al promedio obtenido por las réplicas de cada sustancia a prueba y empleadas como indicativo de defectos en los tejidos o errores experimentales) se encontraron dentro del rango aceptable para todos los tratamientos o productos a prueba ($\leq 18\%$ es un rango recomendado por el EU test method guideline B.46: 2).

6. Conclusiones

La clasificación del tratamiento evaluado fue llevada a cabo acorde al diagrama de decisión anexo en el apéndice de este reporte (ver Apéndice).

Descripción de las muestras	% Viabilidad celular	Clasificación NI / I ¹
CST	100.00	
SLS (0.5%)	76.44	NI
SLS (2%)	5.46	I
Soft Care All Purpose, 19/05/23	92.56	NI

¹ NI: No irritante I: Irritante

Tabla 4. Clasificación de los tratamientos evaluados empleando el modelo de predicción correspondiente al EHR VitroDerm.

Después del periodo de exposición, bajo el modelo y condiciones empleadas, se manifestó un efecto No irritante para el tratamiento evaluado.

7. Revisión

El trabajo detallado en este estudio ha sido realizado siguiendo los métodos estándar. Todos los resultados han sido revisados por el Director de Operaciones.

Elaborado por:



I.B.Q. Mariana Jaqueline Peláez Morales
Jefe de Laboratorio. ILAB In Vitro Toxicology Mexico

Aprobado por:



Q.F.B. Andrea Cano Herrera
Director de Operaciones. ILAB In Vitro Toxicology Mexico

Fecha de emisión: 25.08.2023

Las conclusiones y recomendaciones realizadas o implícitas en este estudio, se basan solamente en la información obtenida a partir del análisis de las muestras, las cuales han sido identificadas con base en las instrucciones e información proporcionadas por usted como cliente.

Al finalizar el periodo de almacenamiento o si la muestra pierde integridad a su recepción, las muestras serán tratadas como residuos, acorde a la legislación aplicable.

****Esta información se declara como INFORMACIÓN CONFIDENCIAL y será considerada como secreto industrial, y/o como secretos comerciales, técnicos o de producción por lo que el emisor y receptor no podrán hacer uso inapropiado de ninguna manera y por ningún medio; en parte o en su totalidad de la INFORMACIÓN CONFIDENCIAL generada o proporcionada directa o indirectamente por la compañía, sus filiales, o convenidas por motivos de contratación comercial o de negocios que justifiquen el intercambio de información. La presente se emite en inteligencia de la responsabilidad de los daños y perjuicios que tal incumplimiento ocasionare, de conformidad con lo señalado por los artículos 163, 165, 166, 167, 168, 169, 386 y 402, todos de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, así también incluyendo el delito de revelación de secretos contemplado en los artículos 210 y 211 del Código Penal Federal, y demás relativos y ordenamientos que resultaren aplicables, lo anterior sin perjuicio de las demás acciones legales que procedan, por violación a los derechos de propiedad intelectual o industrial, Este documento no es válido sin las firmas correspondientes. Para solicitar aclaraciones o verificaciones de este reporte, deberá realizarlo dentro de un periodo de 10 días hábiles posterior a su recepción.*

8. Referencias

1. Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S., Leclerk-Smekens, M., Herin, M. and Coquette, A. (2004). A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch. Dermatol. Res.* **296**: 203-211.
2. Commission Regulation (EC) Nr 761/2009: Method B.46 of the Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation), incluido en Julio del 2009 durante su 1ªadaptación técnica (Commission Regulation (EC) Nr 761/2009/EC).
3. OCDE Test No. 439: In Vitro Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test Method, publicado en Julio del 2010.
4. Procedimiento Operativo Estándar MRE-IVT-032. Reconstitución de Epidermis Humana a partir de células HEKN.
5. Procedimiento Operativo Estándar MVV-IVT-017. Ensayo de viabilidad celular MTT.

9. Apéndice

Diagrama de decisión para clasificación de tratamientos evaluados.

