

# Los métodos alternativos en el estudio de la seguridad de cosméticos

de Lapuente J\*<sup>1</sup>, Borrás M<sup>1</sup>, González-Linares J<sup>1</sup>, Llanas H<sup>2</sup>, Mitjans M<sup>2</sup>, Ramos-López D<sup>1</sup> y Vinardell P<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia (UTOX-CERETOX); Parc Científic de Barcelona; c/ Baldiri Reixac 10-12; 08028 Barcelona. <sup>2</sup>Departament de Fisiologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona.

Recibido 19 de octubre de 2014 / Aceptado 6 de noviembre de 2014

**Resumen:** El Reglamento 1223/2009 establece las normas que deben cumplir todos los productos cosméticos comercializados en Europa, con objeto de velar por el funcionamiento del mercado interior y lograr un elevado nivel de protección de la salud humana garantizando el uso de métodos alternativos que no impliquen la utilización de animales. El Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación con Animales (EURL-EURL-ECVAM) es el laboratorio de referencia en Europa encargado de validar los métodos alternativos. Posteriormente pueden ser homologados por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE). Por otro lado, el Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (SCCS) asesora a la Comisión sobre todos los temas relacionados con la seguridad de los cosméticos. En esta revisión se detalla una relación de métodos alternativos necesarios para evaluar la seguridad de los ingredientes cosméticos así como los métodos usados y sus limitaciones.

**Palabras Claves:** métodos alternativos, *in vitro*, evaluación de la seguridad, cosméticos, Reglamento 1223/2009/UE

**Abstract: Alternative methods in the study of the safety of cosmetics.** Regulation 1223/2009 apply to all cosmetic products marketed in Europe in order to ensure the internal market and achieve a high level of protection of human health by ensuring the use of alternative methods not involving the use of animals. The European Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-EURL-ECVAM) is the European reference laboratory responsible for validating alternative methods. They can also be approved by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). In addition, the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) advises the EU Commission on all issues related to cosmetic safety. In this review, alternative methods needed to assess the safety of cosmetic ingredients and the methods used and their limitations are outlined.

**Keywords:** alternative methods, *in vitro*, safety assessment, cosmetics, Regulation (EC) 1223/2009

## Antecedentes

Según el Reglamento europeo de Cosméticos, Reglamento 1223/2009, se define como producto cosmético a toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los

olores corporales.

Dicho Reglamento, así mismo establece que los productos cosméticos deben ser seguros en las condiciones de utilización normal o razonablemente previsibles. En especial, un razonamiento basado en el balance entre riesgos y beneficios no debe servir como justificación de un riesgo para la salud humana. El Reglamento establece las normas que deben cumplir todos los productos cosméticos comercializados, con objeto de velar por el funcionamiento del mercado interior y lograr un elevado nivel de protección de la salud humana.

En este reglamento se establece que la Comisión Europea es responsable de actualizar los anexos del reglamento en los que aparecen recopilados todos aquellos productos que están prohibidos (anexo II), y los productos que tienen un especial riesgo como son aquellos que están permitidos pero con ciertas restricciones (anexo III), los colorantes (anexo IV), los conservantes (anexo V) y los filtros solares (anexo VI).

También se establecen las competencias de los fabricantes al tener que garantizar que los productos puestos en el mercado son seguros, resaltando que la seguridad de los productos cosméticos, en Europa, se basa en la evaluación de la seguridad de cada uno de los ingredientes que constituyen el cosmético.

Existe un Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (SCCS, *Scientific Committee on Consumer Safety*) que asesora a la Comisión sobre todos los temas relacionados con la seguridad de los cosméticos y evalúa aquellos ingredientes que aparecen en los anexos.

Para proporcionar los datos sobre seguridad de los ingredientes de una forma eficaz y para ayudar a la industria a realizar dichos ensayos de toxicidad, el SCCS edita unas *Notes of Guidance* que se van actualizando periódicamente y que se publican en la página web del Comité. La última versión de dichas notas es la octava que se publicó en 2012 [1].

En dicha notas se indican los ensayos toxicológicos que se deben realizar para garantizar la seguridad de los ingredientes cosméticos.

En general la evaluación de la seguridad de los ingredientes cosméticos, que requiere el SCCS se basa en los principios de evaluación del riesgo [2,3].

*Prohibición del uso de animales en los ensayos de seguridad de cosméticos*

La Comisión estableció el pasado 11 de marzo de 2009 como fecha límite para la prohibición de comercializar productos cosméticos cuya formulación final, ingredientes o combinaciones de ingredientes hayan sido experimentados en animales, y en relación

\* e-mail: jlapuente@pcb.ub.cat

con la prohibición de cada ensayo efectuado actualmente usando animales [4].

No obstante, para los experimentos en materia de toxicidad por administración repetida, toxicidad para la función reproductora y toxicocinética, el plazo límite se fijó el 11 de marzo de 2013.

Consciente del trabajo y las prioridades en este campo, la Comisión Europea y las autoridades competentes en este campo están haciendo un esfuerzo para validar científicamente métodos alternativos para poder llevar a cabo evaluación de la seguridad rigurosas.

### Ensayos toxicológicos

La normativa Europea actual establece que es posible garantizar la inocuidad de los productos cosméticos acabados sobre la base de los conocimientos relativos a la seguridad de los ingredientes que contienen.

Es posible garantizar la seguridad de los ingredientes empleados en los productos cosméticos haciendo uso de métodos alternativos que no impliquen la utilización de animales y que estén validados a nivel comunitario por el Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación con Animales (EURL-EURL-ECVAM) u homologados como científicamente válidos por este organismo, con la consideración debida al desarrollo de la validación en la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE).

Dichos estudios aportan información sobre la irritación y la corrosión a nivel dérmico y ocular, sensibilización dérmica, absorción dérmica, mutagenicidad y genotoxicidad entre otros. Los estudios de toxicidad repetida aportan información de la toxicidad de los productos tras aplicación repetida y aportan el valor de NOAEL que sirve para determinar el *Margen de Seguridad* de los ingredientes (Tabla 1).

**Tabla 1.** Relación de ensayos toxicológicos necesarios para evaluar la seguridad de ingredientes cosméticos

Condiciones	Estudios de toxicología
<b>Estudios Básicos</b>	Toxicidad aguda
	Irritación y corrosión
	Sensibilización dérmica
	Absorción dérmica
	Toxicidad repetida
<b>Absorción dérmica elevada</b>	Mutagenicidad / genotoxicidad
	Carcinogenicidad
	Toxicidad de la reproducción
<b>Ingredientes afectados por la luz</b>	Toxicocinética
	Fototoxicidad

En aquellos casos que el producto presente una elevada absorción dérmica se solicita información de carcinogenicidad, toxicidad de la reproducción y toxicocinética. Por otro lado, cuando los productos pueden ser afectados por la luz ultravioleta induciendo cambios que pueden afectar a su toxicidad se requieren estudios de fototoxicidad.

La mayoría de ensayos realizados tradicionalmente con animales, si bien la prohibición del uso de animales obliga a que dichos estudios se realicen, a partir de julio de 2013, *in vitro*.

En 2010, la Comisión Europea, publicó una extensa revisión de los métodos alternativos existentes, pese a que en algunos puntos ha quedado algo obsoleta, ya que en estos últimos años se han realizado varios avances en la validación y aceptación de nuevo métodos *in vitro*.

En febrero de 2013, el Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación con Animales (EURL-ECVAM) y entidad Cooperación Internacional sobre regulación en Cosméticos (ICCR) redactaron un documento sobre el estado de aceptación de las técnicas como métodos alternativos propuestas los métodos alternativos

El EURL-EURL-ECVAM apoya el proceso de aceptación reglamentaria posterior a la validación, tanto en la Unión Europea como en la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) [5]. La cooperación internacional en el desarrollo de métodos alternativos de ensayo para los cosméticos tiene lugar bajo ICATM - el Marco para la Cooperación Internacional sobre métodos de ensayo alternativos.

A continuación, analizaremos los ensayos tradicionales con animales y las alternativas actuales propuestas para suplir estos animales.

#### 1.1. Toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad aguda describen los efectos adversos para la salud después de una única aplicación del producto según la vía de administración; oral, dérmica o inhalatoria. Durante muchos años se llevó a cabo un ensayo que permitía la determinación de la dosis que provoca la muerte de la mitad de los animales expuestos ( $DL_{50}$ ) descrito en las guías de trabajo de la OECD (OECD 401).

Debido al excesivo número de animales que se utilizaban, este ensayo se substituyo por otros tres procedimientos que utilizan menos animales, con la idea de aplicar la R de Reducción dentro del concepto de 3Rs. Estos métodos son: el ensayo de la dosis fija (OECD 420), el ensayo clásico de clase toxicidad aguda (OECD 423) que permite calcular un valor aproximado de dosis letal y el método *up & down* (OECD 425) que así mismo permite una estimación del valor de  $DL_{50}$ .

Cuando la administración es por vía inhalatoria la guía de la OECD 436 (*Toxicidad aguda inhalatoria*) establece la administración inhalada de la sustancia por etapas usando 3 animales de cada sexo simultáneamente. Dependiendo de los resultados se tomará la decisión de aumentar/disminuir dosis o determinar el uso de uno o 2 sexos de los animales. La guía de la OECD 433 (Inhalación aguda por dosis fija) establece una única dosis de aplicación no letal dependiendo si hay signos de toxicidad o mortalidad.

La determinación de toxicidad aguda por piel según la guía de la OECD 434 era una de los ensayos más empleados para evaluar cosméticos, pero con la actual normativa queda totalmente prohibido su uso.

A fecha de hoy no existe un estudio *in vitro* alternativo para sustituir la toxicidad aguda.

Sin embargo la EURL-ECVAM está trabajando para buscar alternativas a estos estudios. Actualmente el proyecto EU FP6 *ACuteTox project Optimisation and pre-validation of an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity* (EU contract no.LSHB-CT-2004-512051) busca integrar en una única herramienta datos *in vitro* e *in silico* sobre cinéticas, metabolismo y toxicidad de los órganos para predecir la toxicidad aguda oral en humanos y clasificarlos las sustancias en CLP y GHS Toxicity.

Por otro lado, en el monográfico resultante de la reunión del comité del grupo de químicos, pesticidas y biotecnología de la OECD, se establecen las bases para el uso de la citotoxicidad como método para estimar las dosis iniciales para los ensayos de toxicidad oral aguda [6].

## 1.2. Irritación/corrosión

Los ensayos de irritación/corrosión se realizan a nivel de la piel y también de los ojos. En el caso de la corrosión dérmica y/o ocular se refiere a las lesiones irreversibles que se producen a dicho nivel y la irritación se refiere a las lesiones reversibles. El método tradicional para el estudio de la irritación ocular y dérmica ha sido el método conocido tradicionalmente como método de Draize que data de los años 40 (Draize y col. 1944). En este ensayo se administra el producto en estudio en el ojo de conejos albinos y se observan las lesiones provocadas a nivel de córnea, iris y conjuntiva después de un tiempo de contacto del producto con el ojo. Se da una valoración numérica según el grado de lesión en córnea, iris y conjuntiva. La lesión de la córnea es la que se considera más grave comparada con la conjuntiva.

De manera similar en el caso del ensayo de irritación dérmica se aplica el producto en la piel de conejos previamente rasurados y se da una valoración numérica según el grado de lesión que se diferencia entre eritema o enrojecimiento de la piel y la aparición de edema.

Ambos procedimientos han sido ampliamente criticados por tratarse de métodos muy subjetivos en los que la puntuación otorgada depende de la experiencia del experimentador, además de considerarse las diferencias existentes entre el ojo y la piel del conejo y del humano [7]. De hecho, ambos métodos han sido el principal baluarte utilizado por los grupos antiviviseccionistas en contra de la experimentación animal para evaluar cosméticos (Figura 1).

El método original de Draize [8] ha tenido diferentes adaptaciones a lo largo de los años, incluso a nivel del protocolo de la OECD, se han tenido consideraciones de reducción y refinamiento. En estos casos se considera previamente el pH de los productos y si este es inferior a 2 o superior a 11.5, no es necesario realizar el ensayo y el producto ya se clasifica como corrosivo.

Se han desarrollado numerosos métodos para suplir los animales en los ensayos de irritación ocular y dérmica [9]. Si bien, los métodos validados y aceptados son pocos en comparación con los métodos propuestos.

### 1.2.1. Alternativas a los ensayos de irritación/corrosión ocular

Entre los ensayos propuestos para sustituir al ensayo de irritación ocular podemos destacar aquellos que han sido aceptados por la OECD y aparecen en sus protocolos.

Como alternativas al ensayo de irritación/corrosión ocular podemos mencionar:

- Ensayo de Opacidad corneal en córnea aislada bovina (BCOP de las siglas en inglés de Bovine Cornea Opacity Permeability). Este método aparece en los protocolos de la OECD 437 y se aceptó en 2009, si bien el protocolo ha sido reemplazado recientemente. Se basa en la aplicación de los productos sobre córneas bovinas aisladas y se mide la opacidad de dicha córnea tras el contacto con el producto en estudio

- Ensayo del ojo aislado de pollo (ICE de las siglas en inglés de *Isolated Chicken Eye*) (OECD 438). Dicho protocolo también se aceptó en 2009 y se ha modificado en 2013. Se mide la opacidad inducida en la córnea, así como el engrosamiento de la misma.

- Método de pérdida de fluoresceína para identificar corrosivos e irritantes severos. (OECD 460). Es un método *in vitro* que sirve para identificar productos solubles en agua que sean corrosivos o irritantes severos. Se utiliza un cultivo en monocapa de células MDCK que separan dos cámaras y se utiliza la fluoresceína como marcador. Aquellos productos irritantes desestabilizan la capa de células y la

fluoresceína pasa al otro lado de la cámara.



Figura 1. Ejemplo clásico de propaganda en contra de la experimentación animal

Estos métodos tienen en común que sirven solo para diferenciar los productos severamente irritantes de los no irritantes, pero no discrimina aquellos irritantes o poco irritantes. A nivel práctico tienen poca aplicación en cosmética, ya que el número de productos corrosivos o severamente irritantes con aplicación cosmética es muy limitado.

Respecto a la irritación ocular que se ha mencionado anteriormente, se han desarrollado muchos otros métodos, de los que se han realizado varias validaciones, si bien no han sido aceptados formalmente, aunque en algunos casos existen borradores de protocolos de la OECD.

Entre estos métodos podemos citar:

- Ensayo de ojo aislado de conejo (IRE de las siglas en inglés de *Isolated Rabbit Eye*), similar al método aceptado.

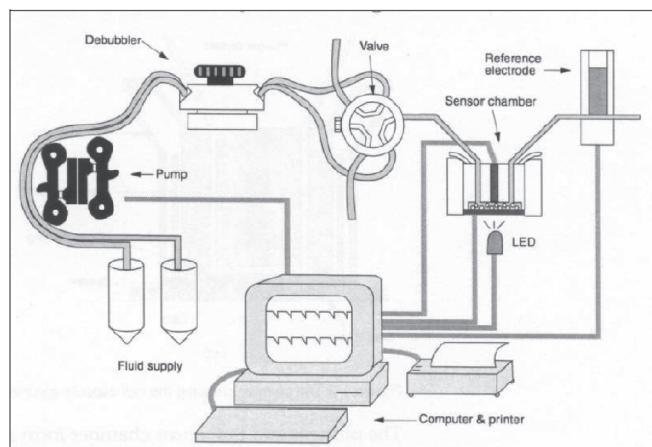
- Ensayo de HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorio Allantoic Membrane). Este método utiliza la membrana corioalantoidea del huevo de gallina. Las lesiones provocadas en la membrana se pueden correlacionar con las lesiones en la conjuntiva y en la córnea del ojo [10]. Se utilizan huevos incubados de 9 días, de los que se expone la membrana corioalantoidea y se aplica el producto. En este caso, se pueden utilizar tanto productos líquidos, como polvos e incluso formulaciones acabadas. Se valora la lesión de la membrana y se pueden clasificar a los productos desde no irritantes a muy irritantes, según un sistema de gradación de la lesión. A pesar de no estar aceptado oficialmente, este método es muy utilizado por la industria cosmética. A su bajo costo, se puede añadir que es fácil de realizar con un cierto entrenamiento y no tiene las limitaciones de solubilidad que presentan otros métodos. Se han realizado algunas adaptaciones del método, como es la utilización del colorante azul de tripano para cuantificar las lesiones ocasionadas en la membrana [11].

- Ensayo de hemólisis como alternativa al test de Draize. Este ensayo se desarrolló para la evaluación del potencial efecto irritante de tensioactivos [13,14]. Se hizo un intento de validación por parte de

EURL-ECVAM si bien los resultados no fueron concluyentes por falta de datos fiables *in vivo*. El método sigue siendo utilizado a nivel de laboratorios cosméticos a nivel interno ya que resulta útil para evaluar tensioactivos o productos que los contengan.

- Modelo reconstruido de córnea humana (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals Not 3 Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage), del cual existe un borrador, reciente de julio de 2014, de protocolo a nivel de la OECD pendiente de ser aprobado. El método se basa en la utilización del ensayo de MTT para valorar el grado de irritación ocular.

- Método del Cytosensor Microphysiometer® (CM) que está actualmente en borrador de la OECD. Este método se basa en un ensayo de citotoxicidad utilizando de fibroblastos L929 cultivados en monocapa sobre un sistema transwell y determinado los cambios de pH mediante un sensor en el aparato. [15]. El principal problema que plantea este método es que requiere de este aparato de producción limitada.



**Figura 2.** Esquema del Cytosensor Microphysiometer® según aparece en el borrador del protocolo de la guía de la OECD y extraído del manual del aparato.

No existe ningún método alternativo que pueda sustituir de forma única al ensayo con animales, por ello se tiene que utilizar una batería de ensayos y una estrategia para descartar efectos irritantes. La propuesta se basa en la aplicación de un criterio de arriba-abajo o abajo-arriba [16].

### 1.2.2 Alternativas a los ensayos de irritación/corrosión dérmica

Existen diferentes métodos que han sido oficialmente validados y que aparecen en los protocolos de la OECD:

- Método de la Resistencia Eléctrica Transcutánea (TER) para valorar la corrosión de la piel (OECD 430). El método utiliza piel de rata y mide el cambio en la resistencia eléctrica transcutánea provocada por un producto corrosivo. Al utilizar piel de rata no tiene aplicación en cosmética debido a la prohibición de utilizar animales de laboratorio.

- Método de Corrosión dérmica *in vitro* utilizando piel humana reconstruida (OECD 431). Utiliza MTT para valorar la viabilidad celular.

- Ensayo *in vitro* de irritación dérmica con epidermis humana reconstruida (OECD 439). Este protocolo permite utilizar diferentes modelos de epidermis reconstruida como Episkin™, Epiderm™, SkinEthic™, LabCyte EPI-MODEL24 SIT, así como otros modelos desarrollados similares y que se conocen coloquialmente como los

métodos “me-too”. Se basan así mismo en la cuantificación de la viabilidad o muerte celular mediante el método MTT. Se considera irritante aquel producto que reduce la viabilidad celular en más del 50%.

Para cada uno de los modelos es diferente el tiempo de incubación, el volumen de muestra a aplicar, etc.

Como en el caso de los ensayos de irritación ocular, un único ensayo no es suficiente para clasificar un producto y se necesita más de un ensayo [16].

En los ensayos que utilizan el MTT como método de valoración de la citotoxicidad, se tiene que tener en cuenta la posible interacción con productos coloreados, como es el caso de los tintes capilares. En este sentido se hizo un informe por parte del Comité Científico de Seguridad del Consumidor, expresando sus dudas sobre la utilidad de estos métodos en estos casos [17].

### 1.3. Sensibilización dérmica

La sensibilización dérmica es una de las principales reacciones adversas de los cosméticos y por ello es de gran importancia valorar el riesgo para el consumidor.

Tradicionalmente, se han utilizado animales como el cobayo, si bien se ha desarrollado un modelo en ratón que cumple con los principios de reducción y de refinamiento y que se ha venido utilizando para ensayar ingredientes cosméticos, hasta la total prohibición del uso de animales. Este método es el conocido como el ensayo del nódulo linfático que fue desarrollado por Basketter y col. [18] y que se recoge en el protocolo de la OECD (OECD 429). Este método permite discriminar el potencial efecto sensibilizante de los productos, existiendo una clasificación de los mismos. El método utiliza timidina marcada radioactivamente para medir la proliferación de linfocitos en los nódulos linfáticos de ratones a los que se administra. Existen modificaciones del protocolo en los que no se utiliza radioactividad. En uno de ellos se mide el contenido de ATP por bioluminiscencia como indicador de la proliferación de linfocitos [19] y en otro protocolo ) la medida de la proliferación se basa en la cuantificación de 5-bromo-2-deixiuridina como análogo de la timidina que se determina por un técnica de ELISA [20]. Todos estos métodos representan un alternativa de reducción y de refinamiento pero no son aplicables actualmente a los ensayos de seguridad de ingredientes cosméticos en Europa, debido a la prohibición del uso de animales.

Se han desarrollado varias alternativas *in vitro* cuyos protocolos se encuentra actualmente en fase de borrador en la guía OECD y se aprobaran en los próximos meses. Uno de estos ensayos se conoce como DPRA (Peptide Reactivity assay). El método se basa en que los productos químicos que provocan sensibilización son capaces de reaccionar con proteínas que contienen residuos de lisina y de cisteína [21,22].

Otro método es el denominado KeratinoSens™ o método ARE-Nrf2 luciferasa. Se basa en que los productos sensibilizantes son capaces de producir una inducción de determinados genes que están regulados por una respuesta antioxidante [23,24].

Así mismo también se ha validado el método conocido como h-CLAT (*human cell line activation test*) que se basa en el incremento de la expresión de CD86 y/o CD54 por las células THP-1 en presencia de una sustancia sensibilizante [25]. Estas células son una línea celular de monocitos humanos procedentes de un paciente de leucemia monocítica.

#### 1.4. Absorción dérmica

Los estudios de absorción dérmica se pueden realizar *in vivo*, pero en los últimos años se viene realizando *in vitro*. El ensayo está descrito en el protocolo OECD428. Así mismo el Comité Científico de Seguridad al Consumidor publicó unas recomendaciones de cómo se tenían que realizar los ensayos para estudiar ingredientes cosméticos [26].

El objetivo de los estudios de absorción dérmica es obtener información cuali y cuantitativa de la cantidad de producto que puede pasar a la sangre en condiciones normales de uso. Estas cantidades se tienen en cuenta para calcular el margen de seguridad de un producto cosmético.

Este método utiliza piel humana o de cerdo, de la que se separa la epidermis y se coloca en unas cámaras especiales con dos compartimentos uno donde se aplica el producto y el otro que es el receptor de donde se toman muestras para analizar el contenido del producto que ha atravesado la epidermis.

Se ha de controlar muy bien la integridad de la epidermis que se utiliza, la temperatura de trabajo similar a la fisiológica de la piel ( $32\pm 1^\circ\text{C}$ ), la solubilidad del producto en el líquido receptor, la composición del líquido receptor, la cantidad de producto que se aplica sobre la piel, etc. La cuantificación del producto absorbido se puede realizar por HPLC o utilizando producto marcado radioactivamente.

El comité científico de seguridad del consumidor considera una serie de factores importantes para poder aceptar un estudio de absorción como bueno, entre ellos se requiere un mínimo de 8 muestras procedentes de 4 donantes y que se siga el procedimiento adecuadamente.

#### 1.5. Toxicidad repetida

Los estudios de toxicidad a dosis repetida permiten evaluar los efectos tóxicos que ocurren como resultado de una exposición diaria repetida de una sustancia durante un período concreto de vida del animal. Estos ensayos permiten conocer la toxicidad en órganos diana, curvas de dosis respuesta, respuesta tóxica de metabolitos secundarios formados en el organismo, respuestas tardías, efectos acumulativos y diferencias entre las dosis que no causan efectos adversos de las que causan daño.

Existe una amplia lista de normativas aceptadas para su uso en animales atendiendo a la vía de administración y a la cantidad de días de exposición:

- Dosis repetida (28 días) oral (OECD 407)
- Dosis repetida (28 días) dérmica (OECD 410)
- Dosis repetida (28 días) inhalada (OECD 412)
- Sub-crónica oral: dosis repetida (90 días) en roedores (OECD 408)
- Sub-crónica oral: dosis repetida (90 días) en no roedores (OECD 409)
- Sub-crónica dérmica: dosis repetida (90 días) en roedores (OECD 411)
- Sub-crónica inhalatoria: dosis repetida (90 días) en roedores (OECD 413)
- Toxicidad crónica (OECD 452)

Este tipo de estudios aportan una información muy valiosa para la evaluación de riesgos asociados a productos químicos industriales, ingredientes cosméticos, biocidas, pesticidas y fármacos al aportar la

NOAEL (concentración en la que no se observa efectos adversos), parámetro esencial para el cálculo del Margen de Seguridad (MoS) o el Margen de exposición (MoE)

Actualmente no existe ningún método alternativo aceptado ni validado científicamente o generalmente aceptado para el reemplazo del estudio *in vivo*. Sin embargo se está realizando un esfuerzo importante tal como se demuestra con el número de proyectos europeos actuales que buscan establecer un método alternativo validado científicamente

- EU FP6 *Predictomics project: Short-term models assays for long-term toxicity* (EU contract no 504761). Este estudio trata de establecer una estrategia alternativa para predecir toxicidad crónica en hígado y riñón evaluando conjuntamente datos obtenidos de cultivos celulares avanzados, genómica, proteómica y citómica para detectar lesiones celulares tempranas.

- EU FP6 *Marie Curie Actions Research Training Network PULMONET: Pathogenesis of pulmonary disease* (EU contract no MRTN-CT-2004-512229). Este estudio trata de establecer una estrategia alternativa para predecir toxicidad el sistema pulmonar.

- EU FP7 *Predict-IV project: Profiling the toxicity of new drugs: a non animal-based approach integrating toxicodynamics and biokinetics* (EU Contract no. 202222). Pretende establecer un Sistema y una estrategia *in vitro* basado en la detección biomarcadores neurotóxicos para predecir una toxicidad repetida antes de realizar estudios *in vivo*.

- EU FP7 SEURAT-1: *Towards the replacement of in vivo repeated dose systemic toxicity testing*

#### 1.6. Toxicidad en la reproducción

Estos estudios permiten describir una amplia variedad de efectos adversos inducidos por una sustancia en cualquiera de las fases del ciclo reproductivo de un mamífero. Esto incluye efectos en la fertilidad, comportamiento sexual, implantación embrionaria, desarrollo fetal, adaptación postnatal y la subsiguiente fase de desarrollo hasta la madurez sexual. Así el ensayo sobre la reproducción de la segunda generación (OECD 416) y el ensayo de teratogenia en roedores y no roedores (OECD 414) son los únicos test aceptados.

Según la regulación REACH todo producto manufacturado o importado en cantidades superiores a 10 toneladas debe ser evaluado bajo el ensayo de cribaje en el desarrollo/reproducción (OECD 421) o bien por el ensayo combinado de toxicidad a dosis repetidas y el de criba en el desarrollo/reproducción (OECD 422).

Dado que el campo experimental es muy amplio, no existe un único método alternativo sino una batería de ensayos que cubre la toxicidad durante la fase de desarrollo embrionario (embriotoxicidad). A pesar de estar validados científicamente, no pueden ser usados para ensayos de cuantificación de riesgo siendo solo aptos como métodos preliminares para seleccionar aquellas moléculas potencialmente embriotóxicas y susceptibles de ser evaluadas en estudios *in vivo* [27].

Así existen 3 métodos científicamente validados por la EURL-ECVAM:

- El ensayo con embriones enteros, WEC (DB-ALM Protocol 123): El test se basa en el cultivo de embriones de rata durante el desarrollo de los órganos. La exposición a la sustancia permite detectar letalidad, retrasos en el desarrollo o anomalías e inferencias en la diferenciación. Este test solo es válido para sustancias fuertemente

embriotóxicas.

- El ensayo de micromasas, MM (DB-ALM Protocol 122- The Micromass Test - Method of Brown): El test se basa en el cultivo primario de células neuronales y de los miembros de embriones de rata. La suspensión de células primarias son cultivadas *in vitro*. La distribución de su crecimiento, migración y segregación seguidos del tratamiento con la sustancia permite evaluar un posible potencial embriotoxicológico para las fases mediana y tardía del desarrollo en mamífero.

- El ensayo de células madre embrionarias, EST (DB-ALM Protocol 113): El test se basa en la determinación de la inhibición de la diferenciación celular combinada con la diferente sensibilidad al daño citotóxico de tejido embrionario y adulto. Se emplean 2 líneas establecidas, ES (D3) como tejido embrionario y fibroblastos (3T3) como tejido adulto. La ausencia de la citoquina leukemia inhibiting factor permite que las células ES formen cuerpos embrioides (EBs) y diferenciándose a tejido contráctil. Estas células son más sensibles a agentes tóxicos que las células adultas, estableciendo una relación entre las IC<sub>50</sub> de ambas líneas y la respuesta a la diferenciación que permite clasificar las moléculas en no-embriotóxica, moderadamente embriotóxica y fuertemente embriotóxica.

En los últimas décadas, el pez cebra está cobrando importancia como modelo experimental, incluso la OECD ha aceptado un ensayo (OECD 236, FET) en la sección de los efectos biológicos.

### 1.7. Mutagenicidad/genotoxicidad

La Mutagenicidad hace referencia a cambios permanentes y transmisibles en la cantidad y estructura del material genético de las células. El término clastogenicidad se usa para denominar aquellas sustancias que producen aberraciones estructurales de los cromosomas; pérdida o reordenamiento de segmentos del cromosoma. Mientras que el término aneugenicidad se emplea para referirse a aquellas sustancias que afectan al número de cromosomas. La genotoxicidad hace referencia al proceso por el cual se daña el DNA con la alteración de la estructura, información o segregación, no necesariamente asociada a la Mutagenicidad.

El actual consenso de los grupos científicos internacionales expertos en el tema recomiendan incluir 3 parámetros de genotoxicidad en las pruebas de potencial mutagénico, 1) prueba de Mutagenicidad a nivel génico, 2) otra a nivel de reordenamiento y/o rotura de los cromosomas (clastogenicidad) y 3) una prueba de aberraciones cromosómicas (aneugenicidad).

El campo de la genotoxicidad es el área con un mayor número de estudios alternativos validados.

#### 1) Mutagenicidad:

- Ensayo de mutación inversa en bacterias (OECD 471, test de Ames): La suspensión bacteriana es expuesta a la sustancia a testar en presencia y ausencia de un sistema exógeno de activación metabólica. Posteriormente la solución se somete a una preincubación para posteriormente mezclarse con una capa de agar antes de ser esparcida sobre placas con medio mínimo. Tras 48-72h las colonias revertientes son contadas y comparadas con el número de colonias revertientes del control de solvente.

- Ensayo de mutaciones en células de mamíferos, MCM (OECD 476): Se emplean células mutantes deficientes en la proteína Hprt o en la proteína XPRT. Una suspensión celular es expuesta a la sustancia en presencia y ausencia de un sistema exógeno de activación metabólica. Posteriormente son subcultivadas y mantenidas durante

7-9 días para favorecer la expresión fenotípica mutante. Tras este período, la frecuencia de mutación se determina sembrando un número conocido de células en medio con un agente selectivo para detectar colonias mutantes y en medio sin agente de selección para determinar la viabilidad.

#### 2) Clastogenicidad

- Ensayo de micronúcleos *in vitro*, MNT (OECD 487): células de mamífero son expuestas a la sustancia en presencia y ausencia de un Sistema de activación metabólico externo. La exposición será continuada hasta que se produzca la mitosis de las células. Posteriormente las células serán teñidas y serán contados los micronúcleos presentes solamente en células binucleadas (han quedado paradas en esta fase tras la aplicación de citocalasina B) o bien en aquellas células donde se muestren signos de haber tenido división celular.

#### 3) Aneugenicidad

- Ensayo de aberraciones cromosómicas en células de mamífero, ACT (OECD 473): una suspensión de células de mamífero son expuestas a la sustancia en presencia y ausencia de un Sistema metabólico externo para ser posteriormente ser arrestadas en metafase. Finalmente las células en metafase serán analizadas para determinar la presencia de aberraciones cromosómicas.

El Comité SCCS y la agencia europea para la seguridad alimentaria (EFSA) recomienda usar los ensayos de las guías de la OECD 471 y 487 como primer paso para la evaluación de la seguridad de cosméticos y alimentos [28].

Para demostrar que los resultados obtenidos son debidos al tratamiento, es esencial caracterizar la exposición sobre el sistema experimental. En el caso del ensayo de mutación inversa en bacterias una reducción en el número de colonias revertientes es suficiente para demostrar que ha existido exposición a la sustancia. En otros casos, como en la medición de la inducción de micronúcleos o mutaciones génicas, es indispensable que las células hayan entrado en la rueda de replicación al menos una vez.

Actualmente se están incorporando ingredientes en forma de nanopartículas ya que permiten la vehiculización de ingredientes activos a su diana con mayor facilidad. La Unión Europea está haciendo grandes esfuerzos para tratar de establecer nuevas normativas que permitan evaluar la seguridad de estos nuevos ingredientes, ya que determinados ensayos no son adecuados, como por ejemplo el test de Ames, ya que las bacterias no incorporan mecanismo de endocitosis. En estos casos la opción más usada es el ensayo de mutaciones en células de mamífero.

Un problema de estos estudios es que la detección de una molécula como mutágeno es considerada como un mutágeno en modelos *in vitro* y no puede ser corroborado en estudios *in vivo*. Están desarrollando métodos alternativos como por ejemplo, el ensayo de micronúcleos o el ensayo del cometa en piel humana reconstituida o incorporando la variación de los patrones génicos y biomarcadores para predecir la Mutagenicidad del producto de ensayo.

### 1.8. Carcinogenicidad

Una sustancia es clasificada como carcinogénica si tras ser inhalada, ingerida, expuesta sobre la piel o inyectada, induce tumores (sean malignos o benignos), incrementan su incidencia o malignidad o disminuyen el tiempo de aparición de un tumor. Está generalmente aceptado que la carcinogénesis es un proceso multietapa que incluye la transformación de células normales a tumorales mediante una

series sucesiva de etapas influenciadas por varios factores como pueden ser genéticos y epigenéticos.

El ensayo de transformación celular (CTA, *Cell Transformation Assay*) es el único test recomendado por las instituciones competentes que muestra un modelo más cercano a algunas de las fases de un proceso carcinogénico [29]. El protocolo común y estandarizado final está siendo desarrollado por la OECD como método sustitutivo al test *in vivo*.

El test tiene 2 variantes, según el sistema experimental empleado; o células embrionarias de hámster sirio (SHE) o fibroblastos Balb/C 3T3. Ambas variantes analizan visualmente parámetros específicos relacionados con el fenotipo y patrón de crecimiento celular contando la cantidad de colonias transformantes y el número de focos formados.

Una ventaja adicional del CTA es que permite detectar carcinogénicos genotóxicos y no-genotóxicos en un mismo ensayo. Debido a la relación entre mutaciones y cancerogénesis, los ensayos de genotoxicidad mencionados anteriormente pueden servir como un test preliminar de carcinogénesis. Un resultado positivo en genotoxicidad, puede ser suficiente para valorar la necesidad de llevar a cabo un estudio de cancerogénesis. Debido a la complejidad del proceso de transformación celular a tumores, hoy día el CTA no puede sustituir al método *in vivo*, aunque aporta una información muy valiosa.

### 1.9. Toxicocinética

Los estudios de toxicocinética permiten describir los fenómenos que experimenta una sustancia desde que entra en contacto con el cuerpo hasta que es eliminado del mismo. La toxicocinética incluye la absorción, distribución, biotransformación y excreción.

En el caso de los cosméticos, se ha hecho una revisión sobre la situación de los métodos alternativos en ensayos de toxicocinética y se ha constatado que todavía existen deficiencias en cuanto a su aplicabilidad [30]. Se necesitan métodos *in vitro* e *in silico* de gran calidad para poder predecir la toxicocinética de los productos.

Existen diferentes modelos *in vitro* que pueden servir para estudiar la absorción de sustancia a través de la piel (modelos de epidermis

reconstruida) o desde el tracto gastrointestinal (cultivos de células Caco-2) [31,32].

También se utilizan modelos tridimensionales de piel para el estudio del metabolismo en la piel [33] o cultivos de hepatocitos para estudiar el metabolismo hepático [34].

Estos métodos no están completamente validados y tan solo representan una parte del proceso.

### 1.10. Fototoxicidad

Los ensayos de fototoxicidad son requeridos para todos aquellos productos que puedan incrementar su toxicidad por exposición a la luz ultravioleta.

El estudio tradicionalmente se ha hecho con ratas, conejos u otros animales a los que se les rasuraba la piel y se aplicaba el producto y posteriormente se irradiaba la misma con luz ultravioleta y se observaba la lesión provocada en la piel [35].

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* fue el primer método *in vitro* validado [36].

En 2004 se publicó el método bajo el paraguas de la OECD, Ensayo *in vitro* de fototoxicidad 3T3 NRU (OECD TG 432). El método se basa en el estudio de la citotoxicidad de fibroblastos 3T3 mediante el ensayo de captación de rojo neutro. Se compara dicha citotoxicidad en presencia y ausencia de irradiación con luz UV.

Los fibroblastos se cultivan en monocapas y se incuban en placas de 96 pocillos con ocho concentraciones del producto en estudio durante 1 hora. Posteriormente, una de las placas se expone a luz ultravioleta a una dosis no citotóxica y la otra se mantiene en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se sustituye el medio y se mantienen durante 24 horas, transcurridas las cuales se determina la viabilidad celular. Se calcula la CI50 o concentración que reduce la viabilidad en un 50% y se comparan dichos valores para el producto expuesto a la luz y el que no ha estado irradiado.

Finalmente, en la tabla siguiente se resumen los principales métodos alternativos validados para la evaluación de la seguridad de cosméticos, junto con las posibles limitaciones de uso (Tabla 2).

**Tabla 2.** Relación de métodos alternativos usados para evaluar la seguridad de ingredientes cosméticos y sus limitaciones

Estudios de toxicología	Métodos alternativos	Limitaciones
<b>Toxicidad aguda</b>	Citotoxicidad (NRU 3T3)	Pendiente protocolo OECD
<b>Irritación ocular</b>	BCOP, ICE	Solo discrimina irritantes severos o corrosivos
	HET-CAM, Hemólisis	No validados
	Cytosensor Microphysiometer®	En fase de aceptación
<b>Irritación dérmica</b>	TER	Solo discrimina irritantes severos o corrosivos
	Episkin™, Epiderm™, SkinEthic™, LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Métodos basados en medición de MTT interferencia con productos colorantes
<b>Sensibilización dérmica</b>	DPRA, Keratinsens®	Pendiente protocolo OECD
<b>Absorción dérmica</b>	Absorción <i>in vitro</i>	No presenta limitaciones
<b>Toxicidad repetida</b>	No existe	
<b>Mutagenicidad/Genotoxicidad</b>	Test Ames, MCM, MNT, ACT	No presenta limitaciones
<b>Carcinogenicidad</b>	CTA	Pendiente protocolo OECD
<b>Toxicidad de la reproducción</b>	EST, WEC, MM, FET	Sólo discriminan fuertemente embriotóxicos
<b>Toxicocinética</b>	Cultivo de Caco2	Sólo valora absorción oral. No está validado
<b>Fototoxicidad</b>	3T3-NRU fototoxicidad	Sólo productos hidrosolubles

## Discusión y conclusiones

Desde hace años se venía planteando en Europa la prohibición de los ensayos de cosméticos utilizando animales, por ese motivo se desarrollaron gran número de métodos alternativos, de los cuales

unos han sido validados y aceptados por las autoridades reguladoras y otros se encuentran en fase de validación y/o aceptación.

A pesar de los esfuerzos realizados en este sentido, todavía quedan lagunas por resolver y no todos los métodos alternativos validados

son útiles para todos los productos que se evalúan. En algunos casos existen limitaciones a su aplicación y en otros casos se desconoce la verdadera viabilidad de los resultados obtenidos.

En este sentido, los nanomateriales, son un claro ejemplo, debido a la capacidad que presentan al interferir con los métodos de caracterización utilizados o la propia caracterización o validación del método analítico.

Sin embargo, en las últimas décadas se está aplicando recursos económicos e institucionales al desarrollo de métodos alternativos a la experimentación en animales para dar respuesta a una necesidad social e industrial, en especial la industria cosmética.

## Bibliografía

- SCCS. The sccs's notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation. 8<sup>th</sup> revision 11 december 2012.
- WHO (2001), Approaches to Integrated Risk Assessment, Doc. WHO/IPCS/IRA/01/12 of December 2001
- European Commission (2000) European Commission, DG Health and Consumer Protection. First Report on the Harmonisation of Risk Assessment Procedures, Part 1 . The Report of the Scientific Steering Committee's Working Group on Harmonisation of Risk Assessment Procedures in the Scientific Committees advising the European Commission in the area of human and environmental health (2000), published on the Internet 20.12.2000.
- Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou G, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfuhrer S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tähti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar JM (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol* 85:367-485.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Health Effects and Section 2 Effects on Biotic Systems (Test Guidelines: 236, 401, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 420, 421, 422, 423, 425, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 436, 437, 438, 439, 452, 460, 471, 473, 476, 487): [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788).
- ENV/JM/MONO(2010)20 (2010) Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests.
- 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.
- Draize JH, Woodward G, Calvery HO (1944). Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 82:377-390.
- Vinardell MP, Mitjans M (2008) Alternative methods for eye and skin irritation tests. *J Pharm Sci* 97(1):46-59.
- Luepke NP, Kemper FH (1986) The HET-Cam test: An alternative to the Draize eye test. *Food Chem Toxicol* 24:495-496.
- 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.
- 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* 14:55-555.
- 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.
- Mitjans M, Martínez V, Clapés P, Pérez L, Infante MR, Vinardell MP (2003) Low potential ocular irritation of arginine-based gemini surfactants and their mixtures with nonionic and zwitterionic surfactants. *Pharm Res* 20:1697-1701.
- Harbell, JSW, Koontz, RW, Lewis, D Lovell and D Acosta (1997) "IRAG Working Group 4: Cell Cytotoxicity Assays. *Food Chem Toxicol* 35, 79-126.
- Scott L, Eskes C, Hoffmann S, Adriaens E, Alépée N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, McNamee P, Osborne R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielman H, Stokes W, Trouba K, Van den Bergh C, Van Goethem F, Vassallo M, Vinardell P, and Zuang V (2010) A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol in vitro* 24, 1-9.
- SCCS/1392/10 SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), memorandum (addendum) on the *in vitro* test EPISKIN™ for skin irritation testing, 14 December 2010.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I and Loveless SE (1996) The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem Toxicol* 34, 985-997.
- Idehara K, Yamagishi G, Yamashita K, Ito M (2008) Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58:1-10.
- Kojima H, Takeyoshi M, Sozu T, Awogi T, Arima K, Idehara K, Ikarashi Y, Kanazawa Y, Maki E, Omori T, Yuasa A, Yoshimura I (2011) Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol* 31:63-74.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Tox Sci* 81:332-343.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Tox Sci* 97:417-427.
- Natsch A (2010) The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Tox Sci* 113,



- 284-292.
24. Emter R, Ellis G, Natsch A (2010) Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 281-290.
  25. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N (2010) Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol In vitro* 26:1150-60.
  26. SCCS/1358/10 SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 22 June 2010.
  27. Sogorb MA, Pamies D, de Lapuente J, Estevan C, Estévez J, Vilanova E (2014) An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using *in vitro* alternative methods. *Toxicol Lett.* 230(2):356-67.
  28. SCCS/1532/14-Addendum replacing the section 3-4.7 Mutagenicity/Genotoxicity and 3-4.8 Carcinogenicity of the NoG.
  29. EURL EURL-ECVAM (2012) Recommendation on three CTAs for assessment of the carcinogenic potential of chemical substances.
  30. Coecke S, Pelkonen O, Leite SB, Bernauer U, Bessems JG, Bois FY, Gundert-Remy U, Loizou G, Testai E, Zaldívar JM (2013) Toxicokinetics as a key to the integrated toxicity risk assessment based primarily on non-animal approaches. *Toxicol In vitro* 27:1570-7.
  31. Prieto P, Hoffmann S, Tirelli V, Tancredi F, González I, Bermejo M, De Angelis I (2010) An Exploratory Study of Two Caco-2 Cell Models for Oral Absorption: A Report on Their Within-laboratory and Between-laboratory Variability, and Their Predictive Capacity. *ATLA* 38, 367-386.
  32. Turco L, Catone T, Caloni F, Di Consiglio E, Testai E, Stamatii A (2011) Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this *in vitro* model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in vitro* 25, 13-20.
  33. Hewitt NJ, Edwards RJ, Fritsche E, Goebel C, Aeby P, Scheel J, Reisinger K, Ouédraogo G, Duche D, Eilstein J, Latil A, Kenny J, Moore C, Kuehn J, Barroso J, Fautz R, Pfuhrer S (2013) Use of human *in vitro* skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Tox Sci.* 133:209-17.
  34. Skare JA, Hewitt NJ, Doyle E, Powrie R, Elcombe C (2009) Metabolite screening of aromatic amine hair dyes using *in vitro* hepatic models. *Xenobiotica.* 39:811-25.
  35. Ljunggren B, Möller H (1978) Drug phototoxicity in mice. *Acta Derm Venereol* 58:125-30.
  36. Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJW, Pechovitch G De Silva O, Holzhütter HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lovell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Potthast J M, Csato M., Sladowski D, Steiling W, and Brantom P (1998) The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3. *Toxic In vitro* 12, 305-327.