INFORME MÉTODO ISO 11993-5:2009
EVALUACIÓN BIOLÓGICA “in vitro”: prueba de citotoxicidad

RAPID BRONZ
COD. 013729 LOTE 259612

Evaluación “in vitro” de la evaluación biológica: prueba de citotoxicidad según el método UNI EN ISO 11993-5

RAPID BRONZ

INTRODUCCIÓN

UNI EN ISO 10993-5 2009.
Esta parte de la ISO 10993-5 describe los métodos de prueba para evaluar la citotoxicidad "in vitro" de los productos que entran en contacto con el cutis humano o que se deben aplicar en el cutis o la mucosa humana; además permite determinar el eventual efecto citotóxico del producto objeto de examen utilizando cultivos celulares específicos cultivados "in vitro".
Este método indica que el producto incuba en contacto directo con las células en cultivo o mediante una técnica de difusión del producto objeto de examen. El protocolo de análisis se ha estudiado para determinar la respuesta biológica "in vitro" de cultivos celulares compuestos por células de mamífero utilizando parámetros biológicos apropiados.

La determinación de la citotoxicidad se puede agrupar en categorías según el tipo de evaluación:
a) evaluaciones del daño celular mediante medios morfológicos;
b) mediciones del daño celular;
c) mediciones del crecimiento celular;
d) mediciones de aspectos específicos del metabolismo celular.

CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA OBJETO DE EXAMEN
Denominación de la fórmula objeto de examen:

PRELINE – RAPID BRONZE CÓD. 013729 LOTE 259612
Cosmético: emulsión
Condiciones de almacenamiento: temperatura ambiente.
Fecha de recepción de la muestra: 07/01/2013
Periodo de análisis: fecha de inicio de la prueba: 10-01-2013 ÷ fecha de fin de la prueba 11-02-2013.

MÉTODO DE PRUEBA POR CONTACTO DIRECTO
El método de prueba de la norma ISO 10993-5 2009 se refiere a la evaluación del potencial irritante in vitro de un dispositivo médico sólido en células de origen cutáneo.
El potencial citotóxico del producto que se debe someter a la prueba por contacto directo se ha evaluado en líneas celulares de origen cutáneo: fibroblastos humanos.
La vitalidad celular se ha evaluado mediante prueba MTT.
La MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo que, reducido por el enzima succinato dehidrogenasa, forma un precipitado azul intenso de formazán en las mitocondrias de las células vitales. El formazán precipitado es un indicador de la vitalidad celular.

DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD
La citotoxicidad se ha determinado cualitativa y cuantitativamente:

1) EVALUACIÓN CUALITATIVA: consiste en el examen de las células con el microscopio, utilizando un colorante citoquímico / vital para observar las eventuales alteraciones, como la morfología, la vacuolización, la separación o la lisis celular y la integridad de la membrana.
Los resultados evaluados se han interpretado según la siguiente escala de citotoxicidad:
0 = No citotóxico
1 = Ligeramente citotóxico
2 = Moderadamente citotóxico
3 = Gravemente citotóxico

DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD
La citotoxicidad se ha determinado cualitativa y cuantitativamente:

2) EVALUACIÓN CUALITATIVA: consiste en el examen de las células con el microscopio, utilizando un colorante citoquímico / vital para observar las eventuales alteraciones, como la morfología, la vacuolización, la separación o la lisis celular y la integridad de la membrana.
Los resultados evaluados se han interpretado según la siguiente escala de citotoxicidad:
0 = No citotóxico
1 = Ligeramente citotóxico
2 = Moderadamente citotóxico
3 = Gravemente citotóxico

6.2-RESULTADOS: PRUEBA MTT Células Vero / VERO cells (= fibroblasts)

TABLA 1: resultados del % de inhibición de la vitalidad celular / Cell viability inhibition (%)

Espectrofotómetro: MULTISKAN MS PRIMARY EIA

Concentrazione /***concentration*** mg/ml **RAPID BRONZ COD. 013729 LOTTO 259612**	% inibizione della vitalità cellulare / ***Cell viability inhibition (%)*** Valori medi / ***Mean***	IC_{50}	RISULTATO / ***RESULT*** **MTT TEST**
Controllo positivo/ *Positive control:* SDS 0.06 mg/ml	0.458 0.408 0.403	< 0.5	Citotossico / *Cytotoxic*
Controllo negativo *Negative control*:: D-MEM	2.246 2.290 2.200	>1,5	Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
Colture cellulare / *cell culture*	-	>1,5	Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C1 1000 µg/ml	2.132 2.208 2.261	>1,5	Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C2 5000 µg/ml	1.910 1.937 1.887		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C3 10.000 µg/ml	1.990 1.962 1.964		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C4 20.000 µg/ml	1.820 1.891 1.921		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C5 50.000 µg/ml	1.520 1.591 1.521		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*

RESULTADO:

La muestra objeto de examen RAPID BRONZ CÓD. 013729 LOTE 259612 resulta NO CITOTÓXICA "in vitro" ya que no se ha observado ningún porcentaje de inhibición celular de los fibroblastos Vero y, por lo tanto, el resultado obtenido es ACEPTABLE.

6.3-RESULTADOS: PRUEBA MTT Células Balb 3T3 / Balb 3T3 cell

TABLA 1: resultados del % de inhibición de la vitalidad celular / Cell viability inhibition (%)

Espectrofotómetro: MULTISKAN MS PRIMARY EIA

Concentrazione /***concentration*** mg/ml **RAPID BRONZ COD. 013729 LOTTO 259612**	% inibizione della vitalità cellulare / ***Cell viability inhibition (%)*** Valori medi / ***Mean***	IC_{50}	RISULTATO / ***RESULT*** **MTT TEST**
Controllo positivo/ *Positive control:* SDS 0.06 mg/ml	0.448 0.410 0.408	< 0.5	Citotossico / *Cytotoxic*
Controllo negativo *Negative control*:: D-MEM	2.284 2.329 2.248	>1,5	Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
Colture cellulare / *cell culture*	-	>1,5	Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C1 1000 µg/ml	1.946 2.105 1.980	>1,5	Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C2 5000 µg/ml	2.092 1.937 1.887		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C3 10.000 µg/ml	1.990 1.962 1.964		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C4 20.000 µg/ml	1.964 1.900 1.680		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*
C5 50.000 µg/ml	1.807 1.777 1.729		Non Citotossico / *Not Cytotoxic*

RESULTADO:

La muestra objeto de examen RAPID BRONZ CÓD. 013729 LOTE 259612 resulta NO CITOTÓXICA "in vitro" ya que no se ha observado ningún porcentaje de inhibición celular de los fibroblastos Vero y, por lo tanto, el resultado obtenido es ACEPTABLE.

7 – CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, el producto objeto de examen, denominado

RAPID BRONZE CÓD. 013729 LOTE 259612

resulta NO CITOTÓXICO "in vitro" y no ha presentado efectos irritantes en cultivos celulares según lo establecido por la norma UNI EN ISO 10993-5:2009.