

Artículo de Revisión

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

IRRITACIÓN OCULAR: MODELOS ALTERNATIVOS

Raiza Vega Montalvo¹ y Mayleng Álvarez Fong²

RESUMEN

El ojo puede ser dañado accidentalmente por el uso de muchos productos de uso rutinario. Para facilitar la seguridad de los consumidores es necesario estimar el potencial de irritación ocular de estas sustancias químicas. Esta estimación está basada en los resultados obtenidos en el ensayo de Draize llevado a cabo en conejos. Sin embargo, avances en el desarrollo de la toxicología *in vitro* han permitido el uso de algunas alternativas para la evaluación del riesgo ocular; por lo que se presenta una revisión acerca de los diferentes métodos alternativos disponibles hasta el momento que permiten evaluar de una forma u otra los efectos tóxicos a nivel ocular.

DeCS: IRRITANTES/toxicidad; COSMETICOS/toxicidad; OJO/lesiones; CONEJOS; EVALUACION DE MEDICAMENTOS; ANIMALES DE LABORATORIO.

El hombre tiene conocimiento del mundo físico que le rodea mediante los órganos de los sentidos; dentro de ellos, el ojo ocupa un lugar preponderante por su capacidad de capturar la energía visible y convertirla en neuro-señales que se transmiten a través del nervio óptico hacia el cerebro donde se produce la visión.¹

El ojo se encuentra constantemente expuesto al ambiente, por lo que resulta vulnerable al ataque de cualquier agente físico o químico que pudiera ocasionar alteraciones, daño o pérdida de la visión en dependencia del grado de severidad que cause. Por tales motivos resulta esencial estimar lo más rigurosamente posible el

¹ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigadora.

² Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

potencial irritante de cualquier compuesto que pueda tener contacto con el ojo y sus estructuras adyacentes.¹

Un ensayo que permite evaluar los eventos a este nivel y determinar la irritación ocular que producen las sustancias químicas, medicamentos y cosméticos fue el descrito por *Draize* en 1944. Desde su introducción este ensayo fue criticado fuertemente tanto por razones éticas como científicas, lo que estimuló la búsqueda de nuevas alternativas encaminadas a eliminar las deficiencias encontradas a este, basadas fundamentalmente en la reducción del número de animales a utilizar, el refinamiento de la metodología y el remplazamiento por métodos *in vitro*.²

Los modelos *in vitro* incluyen el uso de biomarcadores, cultivo de células, órganos y tejidos, modelos farmacocinéticos, análisis de HPLC, así como la correlación estructura-actividad, y sus puntos finales están basados en el examen de la morfología celular, la función fisiológica hística, la respuesta inflamatoria o inmunológica y la recuperación o restablecimiento de los tejidos.³

Las alternativas *in vitro* poseen ventajas potenciales sobre los ensayos *in vivo* debido a su simplicidad, rapidez y a la cuantificación de los puntos finales, además condicionan una reducción en el número de animales y una disminución del dolor y el estrés de estos.

EVENTOS ASOCIADOS CON EL DAÑO OCULAR

El ojo puede ser dividido funcionalmente en fotorreceptores (retina) que son los encargados de conectar los ojos con el sistema nervioso central a través de los nervios ópticos; en estructuras ópticas (córnea, iris, humor acuoso, lente, el cuerpo

ciliar y el cuerpo vítreo) cuya función se basa en concentrar la luz visible sobre la retina y en estructuras protectoras, lubricantes y nutricionales. Todas estas funciones oculares se encuentran en un balance delicado, y cualquier lesión traumática, química o física puede afectarlas, creando un desorden de la visión y en dependencia de su alcance hasta pérdida parcial o total de esta.¹

La irritación del ojo inducida por sustancias químicas involucra la exposición directa de organelos como la córnea, el iris y la conjuntiva. Los efectos sobre estas estructuras pueden ser detectados fácilmente mediante la observación conjunta.

Los eventos asociados con el daño ocular se clasifican teniendo en cuenta los criterios de irritación y corrosión:⁴

- La irritación ocular es un cambio inflamatorio reversible que ocurre en la superficie anterior del ojo, seguido de la exposición directa a un material y persiste durante 24 h.
- La corrosión se considera un daño irreversible del tejido ocular debido a la exposición de un material que provoca destrucción de los tejidos gruesos del ojo.

Los irritantes oculares producen simultáneamente cambios en múltiples tejidos oculares del segmento anterior del ojo. La severidad del daño en cada uno se relaciona con la fortaleza del irritante y la recuperación depende del grado y la extensión del daño a nivel de la propia célula.⁵

El grado de daño causado por un agente externo en la mucosa ocular depende del pH, la capacidad de unión a proteínas epiteliales y de la penetración de este en la córnea. Cuando un irritante penetra en el

ojo se activan los mecanismos protectores de este, la secreción de lágrimas aumenta y los vasos se dilatan en función de eliminar o reducir la presencia de tal compuesto. Si la irritación es severa la dilatación de los vasos aumenta y el fluido vascular y las proteínas filtran hacia la conjuntiva causando edema y como consecuencia se afecta el funcionamiento de los párpados. Las lesiones directas a nivel del iris se caracterizan por un incremento de la vascularidad, engrosamiento del estroma, disminución de la reacción a la luz, inflamación acuosa y/o destrucción del grosor del tejido.¹

ENSAYO DE DRAIZE PARA LA DETERMINACIÓN DE LA IRRITACIÓN OCULAR

El ensayo para la predicción de los efectos tóxicos de los cosméticos, medicamentos y sustancias químicas sobre las membranas mucosas y la piel fue desarrollado por *Draize y otros* en 1944.⁶

Este ensayo permite evaluar los efectos oculares que aparecen por la exposición aguda de los compuestos sobre la mucosa ocular del conejo, mediante la observación de las reacciones que ocurren a nivel de córnea, iris y conjuntiva, y de acuerdo con el sistema de *Draize* para evaluar la severidad de las lesiones oculares producidas es posible clasificar los compuestos en cuanto a su potencial irritante. Los resultados de este ensayo han sido usados durante años para la clasificación de diferentes compuestos y han constituido la base de la norma No. 405 adoptada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) en 1981 y de la norma ISO/DIC-10 993 No.10 adoptada en 1992 para la conducción de los ensayos de toxicidad ocular.^{7,8}

CRÍTICAS REALIZADAS AL ENSAYO DE DRAIZE

El ensayo de *Draize* desde sus inicios ha sido fuertemente criticado por la metodología empleada, la naturaleza subjetiva del ensayo, la relevancia del modelo animal utilizado y por el dolor que causa a los animales.⁹ La subjetividad ha sido demostrada en diversos estudios interlaboratorios donde se han encontrado diferencias significativas entre los resultados.¹⁰

Algunos científicos opinan que la estimación se encuentra grandemente influenciada por el número de animales utilizados y la duración del período de observación.¹¹

Otros han tomado como argumento fundamental las diferencias estructurales y fisiológicas que existen entre el ojo del conejo y el humano. En este aparece una membrana nictitante o tercer párpado que puede remover o atrapar el irritante lo que podría interferir en los resultados, su mecanismo lagrimal es menos efectivo existiendo diferencias en cuanto al grado y el tiempo de permanencia del irritante en el ojo, y además difieren en cuanto al pH del humor acuoso y el grosor medio de la córnea.¹²

El método de exposición de la sustancia de ensayo así como el volumen de aplicación también han sido cuestionados, debido a que no se asemejan a lo que ocurre en el hombre cuando es expuesto de forma accidental a cualquier agente externo.¹³

MODIFICACIONES PROPUESTAS AL ENSAYO DE DRAIZE

Inicialmente *Draize* utilizó 9 animales, sin embargo, la FHSA (Federal Hazardous

Substances Act) recomienda el uso de 6 animales para la prueba.

Las normas de la OCDE recomiendan un mínimo de 3 animales y 1 animal adicional siempre que se requiera y su más reciente modificación incluye el uso de un solo animal si se sospecha que el producto es altamente irritante.⁷

Otras modificaciones incluyen una disminución en el volumen del material de ensayo, debido a que se encuentra por encima del rango de cualquier exposición en humanos y resulta superior a la capacidad del ojo del conejo que es aproximadamente de 30 a 50 μL .¹⁴ Esto fue comprobado en diversos estudios donde se aplicaron volúmenes menores al reportado y se encontró que la respuesta de la córnea y la conjuntiva fueron similar a la observada cuando se aplicó un volumen de 0,1 mL. Otro cambio propuesto sugiere el previo tratamiento con anestésico para aliviar la irritación y el dolor de los animales, así como la realización de un lavado posterior a la aplicación.¹⁵

MÉTODOS ALTERNATIVOS AL ENSAYO DE IRRITACIÓN OCULAR

Los métodos alternativos incluyen a todos aquellos procedimientos que pudieran reemplazar los experimentos realizados con animales, reducir el número de estos a utilizar en cada ensayo o refinar la metodología ya existente en busca de una disminución del dolor y el estrés, lo que se corresponde con el principio de las “tres erres”.¹⁶ Muchos han sido los ensayos *in vitro* descritos en la literatura que se proponen como alternativa al ensayo de irritación ocular y son agrupados sobre la base del punto final medido.¹⁷

Los estudios que utilizan la evaluación morfológica o la observación que refleja los cambios morfológicos a nivel celular están incluidos en el primer grupo de ensayos, dentro de estos se encuentra el ensayo del ojo aislado del conejo el cual es selectivo para irritantes severos. En este ensayo el efecto tóxico de las sustancias es estimado por la aplicación de estas sobre la córnea. Los efectos son medidos 4 h después del tratamiento donde la presencia de opacidad corneal, la medición del grosor de la córnea, el daño a nivel del epitelio corneal y la penetración de la fluoresceína a través de la córnea constituyen los puntos finales del ensayo para la determinación del efecto tóxico de los compuestos. Es un ensayo que no presenta dificultades técnicas, la principal dificultad está en la evaluación de los 4 parámetros medibles que a veces resulta complicada.¹⁸

En el segundo grupo de estudios se encuentran los ensayos de toxicidad celular y dicho término incluye no solo letalidad celular sino también disfunción celular. Esta categoría puede ser dividida en 3 subgrupos: ensayos de adhesión y proliferación celular, ensayos de integridad de membrana y ensayos de metabolismo celular. Numerosos ensayos utilizan la proliferación celular como indicador de citotoxicidad; el ensayo para la determinación de proteínas totales en células 3T3 de ratón Balb c utiliza este parámetro como punto final, y mediante una reacción colorimétrica es posible establecer una curva dosis-efecto y así determinar la concentración del irritante que causa el 50 % de una disminución de las proteínas totales.¹⁹

Existe otro gran grupo de pruebas que emplean los efectos sobre la integridad de membranas para evaluar la citotoxicidad, dentro de estas el ensayo de las células rojas sanguíneas. Existen ciertos compuestos químicos que pueden causar

daños sobre la membrana plasmática y/o desnaturalización de proteínas de membranas y otras proteínas de diferentes células. Estos parámetros han sido usados en combinación para predecir la irritación ocular de los surfactantes principalmente. Una vez obtenida la concentración efectiva media, o sea, la que causa el 50 % de hemólisis y el índice de desnaturalización, se calcula el índice de irritación mediante una relación entre ambas variables cuyo valor se compara en una tabla para clasificar las sustancias.^{20,21}

Varios aspectos del metabolismo celular han sido investigados como base para la evaluación de la toxicidad, uno de los más representativos lo constituye el ensayo de la acumulación del colorante rojo neutro. Dicho ensayo utiliza las células 3T3 de ratón como indicio de citotoxicidad. La cantidad de colorante absorbido es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Se determina la concentración que provoca una reducción del 50 % en la retención del rojo neutro mediante curvas dosis-respuesta, usadas como medida de citotoxicidad debido a la capacidad que poseen los compuestos irritantes de romper las células y provocar la salida del rojo neutro.²²

Otro grupo de ensayos permiten definir la respuesta fisiológica a nivel celular y de tejido. El ensayo para la determinación de la conductividad eléctrica en muestra de epidermis de ratas Wistar se encuentra dentro de estos, el cual está basado en mediciones de la resistencia eléctrica a muestras de piel previamente expuestas al material de ensayo y cuyo valor constituye un indicador de la integridad del estrato córneo de la piel, donde una vez que se define que el material de ensayo es irritante en piel se asume que resulta severamente irritante en el ojo.¹⁸

Dentro de los ensayos que permiten definir la respuesta fisiológica también se encuentra el método de la determinación de la opacidad y permeabilidad en córnea bovina aislada. Este ensayo utiliza estas 2 variables como punto final para la estimación de las propiedades irritantes de las sustancias. La opacidad es medida mediante el cambio en la transmisión de la luz que pasa a través de la córnea mediante un opacitómetro, y la permeabilidad es medida espectrofotométricamente a 490 nm sustituyendo el material de ensayo por fluoresceína.²³

Otra amplia clasificación de pruebas enfoca el problema sobre la evaluación de la respuesta inflamatoria. Existen estudios que utilizan la membrana corioalantoidea; se asume que los efectos irritantes agudos sobre los vasos pequeños y las proteínas de membrana de este tipo de tejido son similares a los efectos inducidos en el ojo por el mismo químico. En la mayoría de los protocolos desarrollados a partir del protocolo inicial existen 3 puntos finales, donde la presencia de lesiones vasculares como hemorragia, lisis y coagulación son la base para utilizar esta técnica como un indicador de daños a nivel de membranas mucosas. Este ensayo es aplicado a materiales no irritantes, medianamente e irritantes severos.^{24,25}

El último grupo de ensayos involucran la relación reparación/restablecimiento de la estructura celular cuando ha sido expuesta a irritantes. Existen otros ensayos que no se encuentran dentro del esquema de clasificación propuesto que incluyen sistemas computacionales basados en la relación estructura-actividad y pueden ser considerados como alternativa fiel y eficaces al ensayo de irritación ocular: en este grupo podemos citar el ensayo de

EYTEX. Este método permite evaluar la irritación ocular basado en la capacidad que poseen las proteínas de unirse a una matriz sintética provocando turbidez, la cual es directamente proporcional a la irritación de la muestra.²⁶

Estos métodos alternativos presentan grandes ventajas, ya que pueden ser utilizados como métodos de *screening*, para evaluar las potencialidades tóxicas de nuevas formulaciones, son métodos sensibles donde las condiciones experimentales pueden ser definidas, controladas, reproducidas y estandarizadas con gran rigurosidad, “ más baratos” y éticos.²⁷

CONCLUSIONES

Existe un gran número de barreras que obstaculizan el desarrollo de estos ensayos, ya que deben ser capaces de dar un nuevo enfoque para la identificación y la evaluación del riesgo, además resulta necesario realizar la validación de ellos usando un amplio rango de compuestos y

laboratorios con vistas a que pudieran ser aceptados en el contexto regulatorio, la posibilidad de sustituir los métodos tradicionales por métodos novedosos hace que los científicos acostumbrados a los ensayos de rutina se muestren escépticos, pues resulta difícil cambiar los hábitos y se admitan otros enfoques experimentales para evaluar el potencial tóxico de una sustancia.

Debe tenerse en cuenta que la irritación ocular es una forma peculiar de toxicidad, ya sea accidental o por exposición aguda, donde los eventos que ocurren son difíciles de reproducir experimentalmente, por lo que resulta esencial seleccionar una batería de ensayos que involucren todos los eventos que se producen *in vivo* para sustituir el ensayo de Draize.

Hoy día se han propuesto una amplia gama de ensayos para remplazar el método *in vivo* y el reto de los toxicólogos en los años venideros es superar todas las barreras en beneficio de la salud y seguridad humana, donde los métodos alternativos encontrarían entonces un lugar correcto en la toxicología.

SUMMARY

The eye may be accidentally damaged by many products of daily use. To guarantee the consumers' safety it is necessary to estimate the eye irritation potential of these chemical substances. This estimation is based on the results obtained in the Draize rabbit eye irritation test. However, the advances attained in the development of *in vitro* toxicology have allowed the use of some alternatives to evaluate the ocular risk. Therefore, a review is made on the different alternative methods available up to now that make possible the evaluation in one way or another of the toxic effects at the ocular level.

Subject headings: IRRITANTS/toxicity; COSMETICS/toxicity; EYE/injuries; RABBITS; DRUG EVALUATION; ANIMALS, LABORATORY.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wallace H. Principles and methods of toxicology. 2 ed. New York: Raven Press, 1994:188-205.
2. Balls M, Bothan PA, Spielmann H. The EC (European Comision)/HO (British Home Office) International calibration study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. *Toxicol In Vitro* 1995;9(6):871-29.
3. Bruner LH, Shaddock JA, Esex-Sorlie D. Alternative methods for assessing the effects of chemical on the eye. *Dermal and Ocular Toxicology. Fundamental and Methods*, New York: CRC Press Inc, 1991:585-608.
4. Bruner LH. In vitro toxicity testing. En: Fraizer JM ed. New York: CRC Press INC,1992:149-190.
5. Bruner LH, De Silva O, Earl LK, Easty DL, Pape W, Spielmann H. Report of the COLIPA workshop on mechanism of eye irritation. *Altern Lab Animal* 1998;26(6):811-30.
6. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically To the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Experim Therapeutics* 1944;22:372-90.
7. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Guideline No. 405: acute eye irritation/corrosion. OECD Publication Office, París, 1987.
8. International Organization For Standardization. Draft international standard ISO/DIC 10 993-10. *Biol Eval Med Devices* 1992;5:44-7.
9. York M, Stering W. A critical of the assessment of the eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. *J Appl Toxicol* 1998;18:233-40.
10. Balls M, Bergi N, Brune L Curren R, De Silva O, Earl L, et al. Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop. *Altern Lab Animal* 1999;27(1):53-71.
11. Goldberg AM. Alternative Methods in Toxicology 9. *In Vitro Toxicology Tenth Aniversary Symposium OFCAAT*. New York: Mary Ann Liebert, 1993:107-15.
12. Cornier EM, Hunter JE, Billimer J, Farage MA. The use of clinical and consumer eye irritation data to evaluate the low volume eye test. *J Toxicol Cutan Ocular Toxicol* 1995;14(3):197-205.
13. Weil C. Study of intra-interlaboratory variability in the result of rabbit eye and skin irritation test. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;25(2):139-143.
14. Bruner LH, Parker RD, Bruce RD. Reducing the number of rabbits in the low volumen eye test. *Fund Appl Toxicol* 1992;19:330-335.
15. Cornier E, Parker R, Henson C, Cruse L, Merrit A, Bruce R. Determination of the intra-and interlaboratory variability of the low volume eye test and its statistical relationship to the Draize test. *Fund Appl Toxicol* 1994;1:140-61.
16. Balls M, Goldberg AM Fentem J.H. Broadhead CL. The Three Rs: The way forward. ECVAM Workshop Report 11. *Altern Lab Animal* 1995;23:838-66.
17. Kojima H, Hanamura A, Miyamoto S, Sato A, Konishi H, Yoshimura I. Evaluation of seven alternative assays on the main ingredients in cosmetics predictor of Draize eye irritation scores. *Toxicol In Vitro* 1995;9(3)333-40.
18. European Chemical Industry Ecology & Toxicology Centre (ECETOC). Monografía 11. Eye irritation testing. Bruselas. 1988 Actualizado 1996.
19. Fente, JH, Archer GEB, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, et al. The ECVAM International Validation Study on in vitro test for skin corrosivity. 2 Results and Evaluation by Management Team. *Toxicol In Vitro* 1998;12:483-524.
20. INVITTOX (Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology) Protocol No. 37 Red Blood Cell 1992.
21. Pape WI, Pfannenbecker U, Argembeaux H, Bracher M, Esdoile DJ, Hagino S, et al. COLIPA validation project on in vitro eye irritation test for cosmetic ingredients and finished products: the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potential. Presents status. *Toxicol In Vitro* 1999;13:343-54.
22. Spielmann H, Liesbsh M, Kalwert S, Moldehaver F, Wirnsberger T, Holzhütter HG, et al. Results of 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. *Altern Lab Animal* 1996;24:741-858.
23. Gautheron P, Dukic M, Alix D, Sina J. Interlaboratory assessment of bovine corneal opacity and permeability (BCOP). *Toxicol In Vitro* 1994;8:381-2.
24. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol* 1995;23(2):287-91.
25. Steiling W, Bracher M, Coutermellont P, De Silva O. The HET-CAM a useful assay for assessing the eye irritation properties of cosmetics formulations and ingredients. *Toxicol In Vitro* 1999;13:375-84.

26. Gordon VC. The scientific basis of the Eytex system. *Altern Lab Animal* 1992;20:313-26.
27. Francois H. The eye (rabbit/human): measurement parameters in the field of ocular irritation. *Altern Lab Animal* 1992;20(3):476-9.

Recibido: 18 de abril del 2001. Aprobado: 28 de mayo del 2001.

Lic: *Raiza Vega Montalvo*. Centro de investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave. 26 No. 1605 entre Boyeros y Puentes Grandes, municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10600, Cuba.