

INFORME DE ESTUDIO

Para:  
**ZURKO BIORESEARCH**  
 C. Gran Vía 62 4º Izq.  
 28013 Madrid

**ENSAYO DE IRRITACIÓN VAGINAL IN VITRO DEL  
 PRODUCTO DE ENSAYO  
 “GEL PLUS DSO”**

ESPONSOR: CNCE INNOVACIÓN S. L.  
 C/ Consell de Cent 106 – 108 5º 2ª  
 08015 Barcelona. Spain

REPRESENTATNE DEL ESPONSOR: ZURKO BIORESEARCH

PRODUCTO DE ENSAYO: **GEL PLUS DSO**

OFERTA Nº: NCDN2014013401

	Nombre	Responsabilidad	Fecha	Firma
Aprobado por	Laura Mocé Llivina	Director de Estudio	08.08.14	

*El presente informe presenta los resultados obtenidos en el estudio realizado según los principios de buenas prácticas de laboratorio.*

*Este informe no puede ser reproducido parcialmente sin la autorización por escrito del laboratorio.  
 Los resultados incluidos en el informe se refieren únicamente a las muestras analizadas.*

Edición	Descripción
0	Primera edición

## ÍNDICE

1. DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO CON LOS PRINCIPIOS DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO.....	3
2. DECLARACIÓN DE LA UNIDAD DE GARANTÍA DE CALIDAD – RESUMEN DE LAS INSPECCIONES DEL ESTUDIO .....	4
3. OBJETIVO.....	5
4. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS .....	5
4.1. PRODUCTO DE ENSAYO.....	5
5. IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR.....	6
6. REPRESENTANTE DEL PROMOTOR .....	6
7. LABORATORIO .....	6
8. FECHAS.....	6
9. MATERIALES Y MÉTODOS DE ENSAYO.....	7
9.1. REFERENCIA DEL MÉTODO DE ENSAYO .....	7
9.2. INTRODUCCIÓN .....	7
9.3. EQUIPOS .....	7
9.4. MATERIALES Y REACTIVOS .....	7
9.5. SISTEMA EXPERIMENTAL.....	8
9.6. CONTROLES PREVIOS: CONTROL DE POSIBLE INTERFERENCIA CON SUSTANCIAS COLOREADAS.....	8
9.7. CONTROLES PREVIOS: CONTROL DE POSIBLE REDUCCIÓN DIRECTA DEL MTT POR EL PRODUCTO DE ENSAYO .....	8
9.8. TRATAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LOS TEJIDOS .....	9
9.9. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN .....	12
9.10. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	12
10. RESULTADOS.....	14
11. CONCLUSIONES.....	16
12. DESVIACIONES .....	16
13. ARCHIVO .....	16
14. REFERENCIAS.....	17
15. ANEXO.....	18

## 1. DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO CON LOS PRINCIPIOS DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

El abajo firmante declara que el estudio descrito en este informe se ha llevado a cabo bajo su supervisión y según los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio que se recogen en:

- OECD Series on principles of good laboratory practices and compliance monitoring. 1998. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Real Decreto 1369/2000 de 19 de Julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de Mayo, que establece los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos.

Además, se confirma que el presente informe refleja fielmente los datos primarios y que éstos son válidos.



Director de Estudio  
Dra. Laura Mocé Llivina

08.08.14

Fecha

**2. DECLARACIÓN DE LA UNIDAD DE GARANTÍA DE CALIDAD – Resumen de las inspecciones del estudio**

El abajo firmante certifica las fechas en que se han llevado a cabo las diferentes inspecciones y las fechas en las que se han enviado los informes correspondientes al Director de Estudio y al Director de Laboratorio.

Fase del estudio	Inspección	Fecha de inspección	Comunicación al Director de Estudio	Comunicación al Director de Laboratorio	Recepción del Director de Estudio	Recepción del Director de Laboratorio
Periodo pre-experimental	<input checked="" type="checkbox"/> Proceso	09.04.14	28.04.14	28.04.14	21.05.14	22.05.14
	<input type="checkbox"/> Estudio	-	-	-	-	-
Periodo experimental	<input checked="" type="checkbox"/> Proceso	11.04.14	28.04.14	28.04.14	21.05.14	22.05.14
	<input type="checkbox"/> Estudio	-	-	-	-	-
Periodo post-experimental	<input checked="" type="checkbox"/> Proceso	11.04.14	28.04.14	28.04.14	21.05.14	22.05.14
	<input type="checkbox"/> Estudio	-	-	-	-	-
Documentación:	Protocolo	16.05.14	16.05.14	16.05.14	28.05.14	16.05.14
	Datos primarios	29.09.14	29.09.14	29.09.14	29.09.14	29.09.14
	Informe	29.09.14	29.09.14	29.09.14	29.09.14	29.09.14

Se confirma que los datos primarios obtenidos durante la fase experimental del estudio quedan recogidos en el presente informe.



Responsable de Garantía de Calidad  
Javier Sánchez

29.09.14

Fecha

### 3. OBJETIVO

El objetivo del estudio fue determinar el potencial de irritación del producto de ensayo sobre un modelo de epitelio vaginal humano reconstruido. Para ello, se determinó el valor ET<sub>50</sub> del producto de ensayo. Este valor es el tiempo de contacto entre el producto de ensayo y el tejido necesario para producir una pérdida de viabilidad del 50%.

El estudio se llevó a cabo utilizando un modelo in vitro basado en epitelio vaginal humano (*Human Vaginal Epithelium, HVE*).

### 4. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS

#### 4.1. Producto de ensayo

- Nombre: GEL PLUS DSO
- Descripción: Gel íntimo
- Fabricante: CNCE INNOVACIÓN S.L.
- Lote: 24/5-2014-420
- Fecha de fabricación: 24/04/2014
- Fecha de caducidad / estabilidad: 24/04/2015
- Condiciones de conservación: Temperatura ambiente.
- Composición (*Proporcionada por el Promotor*):

INCI
AQUA
GLYCERIN
PRUNUS AMYGDALUS DULCIS OIL
SODIUM ACRYLATE
ACRYLOYLDIMETHYLTAURATE
DIMETHYLACRYLAMIDE CROSSPOLYMER
ISOHEXADECANE
POLYSORBATE 60
SIMMONDSIA CHINENSIS SEED OIL
LAVANDULA ANGUSTIFOLIA OIL
POGOSTEMON CABLIN LEAF OIL
TOCOPHERYL ACETATE
SANTALUM ALBUM OIL
FARNESOL
CICLODEXTRIN

---

**INCI**

---

PROPYLENE GLYCOL

---

DIAZOLIDINYL UREA

---

ETHYLPARABEN

---

METHYLPARABEN

---

- ID Muestra: E14.1881
- ID Recepción: RB.14.341
- Fecha de recepción: 09.05.2014

*La caracterización de la muestra es responsabilidad del Promotor.*

**5. IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR**

CNCE INNOVACIÓN, S.L.

C/Consejo de Ciento 106-108 5º 2ª

08015 Barcelona. Spain

**6. REPRESENTANTE DEL PROMOTOR**

ZURKO RESEARCH S. L.

Gran vía, 62 4º Izquierda

28013 Madrid. Spain.

**7. LABORATORIO**

Eurofins BioPharma Product Testing Spain S. L. U.

Edifici Hèlix. Parc Científic de Barcelona.

Baldiri Reixac 15-21.

08028 Barcelona. Spain.

*Director de Estudio: Dra. Laura Mocé***8. FECHAS**

La fase experimental se inició el 21 de mayo 2014 y finalizó el 19 de junio 2014.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS DE ENSAYO

### 9.1. Referencia del método de ensayo

- 1-P-PR-WI-9007628 Internal method – Test for *in vitro* determination of the irritation potential on reconstructed vaginal epithelium 3D.

### 9.2. Introducción

Los métodos *in vitro* son una interesante alternativa a los métodos clásicos *in vivo* para la evaluación de las características biológicas de ingredientes y productos acabados para uso tópico.

Cada sustancia de ensayo (producto de ensayo, controles negativos y positivos) se aplica sobre tres réplicas de tejidos. Tras la exposición se lleva a cabo el lavado y secado de los tejidos. Se realiza la medida de la viabilidad celular de los tejidos tratados al final del tiempo de contacto utilizando el colorante vital MTT. Los cristales de formazán se extraen utilizando isopropanol y se cuantifica la concentración mediante lectura espectrofotométrica a 570 nm. Se calcula el valor de ET<sub>50</sub>.

### 9.3. Equipos

Código	Equipo	Fabricante	Modelo
-	Cabina de seguridad biológica B	TELSTAR	BIO II A
3316	Incubador a 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% HR	Thermo Electron Corporation	3121
BES-108	Pipeta para sustancias viscosas	Brand	Transferpettor 50 ul
BES-097	Pipeta 20-200 ul	VWR	VWR VE200
BES-098	Pipeta 100-1000 ul	VWR	VWR VE1000
BES-117	Pipeteador automático	VWR	-
BES-114	Espectrofotómetro Synergy MX	Biotek	Mx
BES-110	Agitador orbital	IKA	KS260
-	Microscopio óptico	Nikon	Eclipse TS100

### 9.4. Materiales y reactivos

- Epitelio vaginal humano reconstruido - *Reconstructed Human Vaginal Epithelium* (SkinEthic)
  - Lote: 14RHV0601
  - Tamaño: 0.5 cm<sup>2</sup>
- Medio de crecimiento (SkinEthic)
- Pinzas estériles

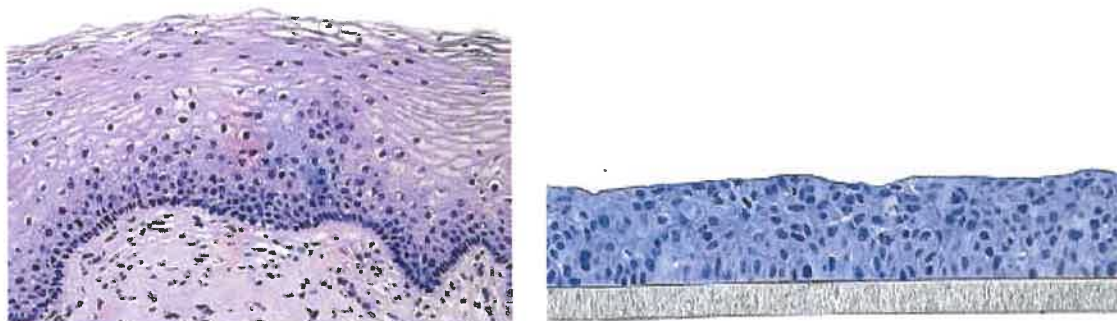
- Navecillas de pesada
- Malla de nylon Ø = 7.5mm (Sefar Fyltis, # Sefar Nitex 03-150/44)
- Multiplaca de 6 pozos para cultivo celular
- Multiplaca de 24 pozos para cultivo celular
- Microplaca de 96 pozos
- Parafilm
- Hisopos de algodón estériles
- Gasas estériles
- MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma, # M-5655 or M-2128)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> Dulbeccos'
- Solución de Triton X-100

### 9.5. Sistema experimental

#### *Epitelio Vaginal Humano Reconstruido (HVE)*

El ensayo se llevó a cabo utilizando tejidos reconstruidos *in vitro* a partir del cultivo celular A431 (derivado de un carcinoma vulvar). Cuando se cultivan *in vitro* sobre un filtro de policarbonato en una interfase aire – líquido en un medio de cultivo químicamente definido, las células A431 forman un tejido epitelial tridimensional similar a la mucosa de la vagina humana *in vivo*.

#### Reconstructed Human Vaginal Epithelium (HVE) from SkinEthic



### 9.6. Controles previos: Control de posible interferencia con sustancias coloreadas.

Se llevó a cabo esta verificación antes del inicio del experimento.

Se mezclaron 30 µl del producto de ensayo con 270 µl de agua. Tras 15 minutos de tiempo de contacto, se evaluó la aparición de color. Si el producto es coloreado o se vuelve colorado durante el ensayo, se deben incluir controles adicionales para sustancias coloreadas.

### 9.7. Controles previos: control de posible reducción directa del MTT por el producto de ensayo

Se llevó a cabo esta verificación antes del inicio del experimento.

La conversión relativa de MTT por parte del tejido es el parámetro que se evalúa en el ensayo, haciendo necesaria la verificación de ausencia de reducción no específica del MTT por parte del



producto de ensayo. Antes de los experimentos, todas las sustancias de ensayo se ponen en contacto con la solución de MTT como se describe a continuación.

- Se llenan pozos de una multiplica de 24 pozos con 300 µl de la solución de MTT (1 mg/ml).
- Se añaden 16 µl o 16 mg de la sustancia de ensayo.
- Se realiza un control con agua.
- Se protegen las mezclas de la luz y se incuban durante 3 horas (+/- 5 minutos) a 37°C.
- Se realiza una evaluación visual de la interacción con MTT según:
  - o El control negativo (agua): amarillo
  - o Sustancias que no interaccionan con MTT: amarillo
  - o Sustancias que interaccionan levemente con MTT: azul claro
  - o Sustancias que interaccionan fuertemente con MTT: azul oscuro

Si la solución de MTT se vuelve azul o violeta, el producto de ensayo interacciona con el MTT. En ese caso es necesario evaluar la parte de densidad óptica (OD) debida a la reducción no específica del MTT (utilizando tejidos muertos).

Para cada sustancia que interaccione con el MTT previamente detectada, además del procedimiento normal, se añadirán 3 tejidos muertos que se trataran con el producto de ensayo y se utilizarán para la evaluación de la interacción con MTT, siguiendo el mismo procedimiento que para los tejidos vivos. Tres tejidos muertos no tratados se utilizan como control negativo (los tejidos muertos no tratados pueden presentar una pequeña actividad NADH deshidrogenasa asociada residual)

## **9.8. Tratamiento y evaluación de los tejidos**

### ***Acondicionamiento de los tejidos***

Se recibieron los tejidos del proveedor y se transfirieron desde la agarose al medio de cultivo proporcionado por el fabricante. Se mantuvieron los tejidos durante toda la noche a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ≥95% RH.

### ***Tratamiento con el producto de ensayo***

Se utilizaron tres tejidos por producto de ensayo y para cada control. El orden de aplicación era importante debido a que se utilizó el mismo para el lavado.

El producto de ensayo se utilizó directamente, al 100%, sin diluir.

Se dosificaron 70 mg ± 4 mg del producto de ensayo sobre los tejidos. Se aplicó cuidadosamente una malla de nylon (Ø = 7.5 mm) sobre la superficie, con unas pinzas para asegurar el contacto del total de la superficie del tejido.

La placa (con la tapa) que contenía los tejidos se mantuvo durante la exposición a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ≥ 95% RH. Se aplicaron los siguientes tiempos de contacto:

- **10 minutos**
- **1 hora**
- **3 horas**
- **24 horas**

#### ***Tratamiento con el control negativo***

Se dispensaron 70 µl de Tampón Fosfato Salino (PBS) estéril en la superficie de cada tejido.

La placa (con la tapa) que contenía los tejidos se mantuvo como se describe para el producto de ensayo.

El tiempo de contacto del control negativo fue: **24 horas**.

#### ***Tratamiento con el control positivo***

Se dispensaron 70 µl de solución de Tritón X-100 en la superficie de cada tejido.

La placa (con la tapa) que contenía los tejidos se mantuvo como se describe para el producto de ensayo.

Se aplicaron los siguientes tiempos de contacto:

- **10 minutos**
- **1 hora**
- **3 horas**
- **24 horas**

#### ***Lavado y secado***

Tras la exposición, los tejidos se lavaron con PBS. El orden de aplicación se respetó estrictamente.

- Se llenó una pipeta con 25 ml de PBS (ajustada para una dispensación de 1 ml).
- Se retiró la malla de nylon de la superficie del tejido tratado con unas pinzas.
- Se tomó el tejido con unas pinzas.
- Se lavó el tejido 15 veces con 1 ml de PBS para eliminar todas las sustancias residuales de la superficie. Tras el 15 lavado, se sumergió completamente el tejido 3 veces en 150 ml de PBS y se agitó para eliminar los restos de material. Finalmente el tejido se lavó una vez más por cada lado con PBS y se eliminó el exceso.
- Se secó la base el inserto sobre una gasa estéril durante 1 – 2 segundos y se secó el tejido con un hisopo de algodón estéril.

#### ***Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT***

Tras el lavado, se evaluó la viabilidad celular de los tejidos tratados mediante medida de la reducción de MTT. El ensayo MTT es un método simple, exacto y proporciona resultados reproducibles. Este método fue desarrollado por Mossman (1983) (1). El reactivo clave es el 3-[4,5-dimethyltiazol-2-yl]-2,5-

diphenyl tetrazolium bromide o MTT. Esta sustancia es de color amarillo en solución acuosa. La deshidrogenasa mitocondrial de las células viables rompe el anillo tetrazólico llevando a la formación de cristales de formazán de color púrpura, insolubles en agua. Los cristales se disuelven con solución alcohólica y la solución obtenida puede ser medida espectrofotométricamente. La cantidad de coloración obtenida es proporcional a la cantidad de formazán producido por las células viables y con ello, indica el grado de viabilidad del tejido. La disminución en el grado de viabilidad del tejido producido por el contacto con sustancias o productos se puede aplicar como medición de la citotoxicidad del producto.

#### Incubación en la solución de MTT

- Se preparó la solución de MTT para el uso (1 mg/ml).
- Se llenaron placas de 24 pozos con 300 µl de solución MTT y se protegieron de la luz con papel de aluminio hasta la transferencia de los tejidos. El exceso de medio de cultivo de los tejidos se retiró de la base con papel absorbente.
- Se transfirieron los tejidos tratados a la placa de 24 pozos, verificando la ausencia de burbujas de aire.
- Se incubaron los tejidos durante 3 horas (+/- 5 minutos) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ≥ 95% RH.

#### Extracción de Formazán

- Se llenaron placas de 24 pozos con 800 µl de isopropanol.
- Al final de las 3 horas (+/- 5 minutos) de incubación con MTT, se transfirieron los tejidos a la solución de isopropanol, utilizando pinzas estériles y secando la base del inserto en papel absorbente estéril.
- Se añadieron 700 µl de isopropanol sobre cada tejido, asegurando que el tejido quedaba totalmente cubierto por la solución.
- Se incubaron las placas durante 2 horas (+/- 5 minutos) a temperatura ambiente en agitación (aproximadamente 150 rpm) para la extracción del formazán.

#### Medida de Absorbancia / Densidad óptica

- Se utilizó isopropanol como blanco (6 réplicas).
- Se sujetaron los insertos con unas pinzas y se rompieron los tejidos con una pipeta para mezclar toda la solución de extracción en el pozo.
- Se homogenizó la solución de extracción con una pipeta para la solubilización completa de los cristales de formazán.
- Se transfirieron 3 volúmenes de 200 µl de la solución de extracción por pozo (= 3 pozos por tejido, 3 réplicas por tejido) a una placa de 96 pocillos.
- Se leyeron las densidades ópticas (OD) utilizando un espectrofotómetro para placas de 96 a 570 nm de longitud de onda.
- Se comprobaron los datos primarios obtenidos.

## 9.9. Criterios de aceptación

### Criterio de Aceptación del ensayo 1: Control negativo

El valor absoluto de DO de los tejidos del control negativo (NC) tratados con PBS estéril en el ensayo MTT es un indicador de la viabilidad del tejido en el laboratorio de ensayo tras el transporte y el almacenaje y bajo las condiciones específicas de uso.

El ensayo cumple con el criterio de aceptación si el promedio OD570 de tejidos NC es  $> 0.8$ .

### Criterio de Aceptación del ensayo 2: Control positivo

El ensayo cumple con el criterio de aceptación si el promedio de viabilidad de los tejidos PC expresado como porcentaje del control negativo es  $\leq 50\%$  al tiempo de contacto más largo.

### Criterio de Aceptación del ensayo 3: Desviación estándar (SD)

Debido a que en cada ensayo del potencial de irritación se lleva a cabo la predicción mediante el promedio de viabilidad a partir de 3 tejidos independientes, la variabilidad de los tejidos debe ser aceptablemente baja.

El ensayo cumple con el criterio de aceptación si la SD calculada a partir de los % individuales de viabilidad de los tejidos de las 3 réplicas es  $\leq 18\%$ .

En ensayo es válido si cumplen los requisitos de los criterios del control negativo y positivo indicados.

## 9.10. Análisis de resultados

### **Cálculos**

#### Blanco:

- Se utiliza IPA para el cálculo del blanco. Se calcula el promedio de OD de las 6 réplicas de cada placa  $OD_{\text{blank}}$

#### Controles negativos:

- Se calcula el valor corregido con el blanco:  $OD_{\text{NC}} = OD_{\text{NCraw}} - OD_{\text{blank}}$
- Se calcula el OD promedio por tejido (3 réplicas)
- El promedio de los tejidos corresponde al 100% de viabilidad = mean  $OD_{\text{NC}}$

#### Controles positivos:

- Se calcula el valor corregido con el blanco:  $OD_{\text{PC}} = OD_{\text{PCraw}} - OD_{\text{blank}}$
- Se calcula el OD promedio por tejido (3 réplicas)
- Se calcula la viabilidad por tejido:  $\%PC = [OD_{\text{PC}} / \text{mean } OD_{\text{NC}}] \times 100$
- Se calcula el promedio de viabilidad de todos los tejidos:  $\text{Mean PC} = \Sigma \%PC / \text{number of tissues}$

#### Producto de ensayo:

- Se calcula el valor corregido con el blanco:  $OD_{\text{TT}} = OD_{\text{TTraw}} - OD_{\text{blank}}$
- Se calcula el OD promedio por tejido (3 réplicas)
- Se calcula la viabilidad por tejido:  $\%TT = [OD_{\text{TT}} / \text{mean } OD_{\text{NC}}] \times 100$

— Se calcula el promedio de viabilidad de todos los tejidos:  $\text{Mean TT} = \Sigma \% \text{TT} / \text{number of tissues}$

Se calculan las desviaciones estándar de los valores de OD y del porcentaje de viabilidad celular.

A partir de los resultados de viabilidad celular a cada tiempo de contacto se calcula la relación "Viabilidad celular (%) versus Tiempo de Contacto (horas)". A partir de la regresión lineal, se calcula el valor de  $\text{ET}_{50}$  para el producto de ensayo y para el control positivo.

## 10. RESULTADOS

### **CONTROLES INTERNOS DEL ENSAYO DE IRRITACIÓN**

La muestra de ensayo del producto **GEL PLUS DSO** no era coloreada pero interaccionó reduciendo el MTT utilizado para el ensayo de viabilidad celular. Se aplicaron controles adicionales para la evaluación de interferencia con MTT y se aplicó la corrección correspondiente a los resultados.

**CONTROL NEGATIVO:** El promedio de OD de los tejidos utilizados para el control negativo fue 0.97. La desviación estándar (SD) de los porcentajes de viabilidad fue 6.9%; este valor cumple con el criterio de aceptación para  $SD \leq 18\%$ .

**CONTROL POSITIVO:** La Tabla 1 muestra la viabilidad de los tejidos HVE tratados con el control positivo (Solución de Tritón X-100) a diferentes tiempos de contacto.

*Tabla 1. Viabilidad celular (%) y desviación estándar (SD) de tejidos HVE tratados con el control positivo.*

<i>Tiempo de contacto</i>	<i>Viabilidad celular (%)</i>	<i>SD viabilidad (%)</i>
10 min	86.5	4.5
1 hora	12.3	2.8
3 horas	2.2	0.3
24 horas	1.0	0.1

La viabilidad de los tejidos tratados con el control positivo desciende cuando aumenta el tiempo de contacto. Para el máximo tiempo de contacto ensayado, la viabilidad fue 1.0%, cumpliendo con el criterio de aceptación de viabilidad celular  $\leq 50\%$ .

La desviación estándar de los porcentajes de viabilidad a cada tiempo de contacto fue  $< 18\%$ , cumpliendo con el criterio de aceptación para  $SD \leq 18\%$ .

**RESULTADOS DEL ENSAYO**

La Tabla 2 muestra la viabilidad de los tejidos HVE tratados con el producto de ensayo **GEL PLUS DSO**.

Tabla 2. Viabilidad celular (%) y desviación estándar (SD) de tejidos HVE tratados con el producto de ensayo.

Tiempo de contacto	Viabilidad celular (%)	SD viabilidad (%)
10 min	124	3.3
1 hora	118	9.2
3 horas	110	6.3
24 horas	102	14.2

La desviación estándar de los porcentajes de viabilidad a cada tiempo de contacto fue < 18%, cumpliendo con el criterio de aceptación para SD ≤18%.

A partir de los resultados de viabilidad celular de cada tiempo de contacto, se calculó el valor de ET<sub>50</sub>. La Figura 1 muestra la representación gráfica de la viabilidad celular (%) respecto al tiempo de contacto (min).

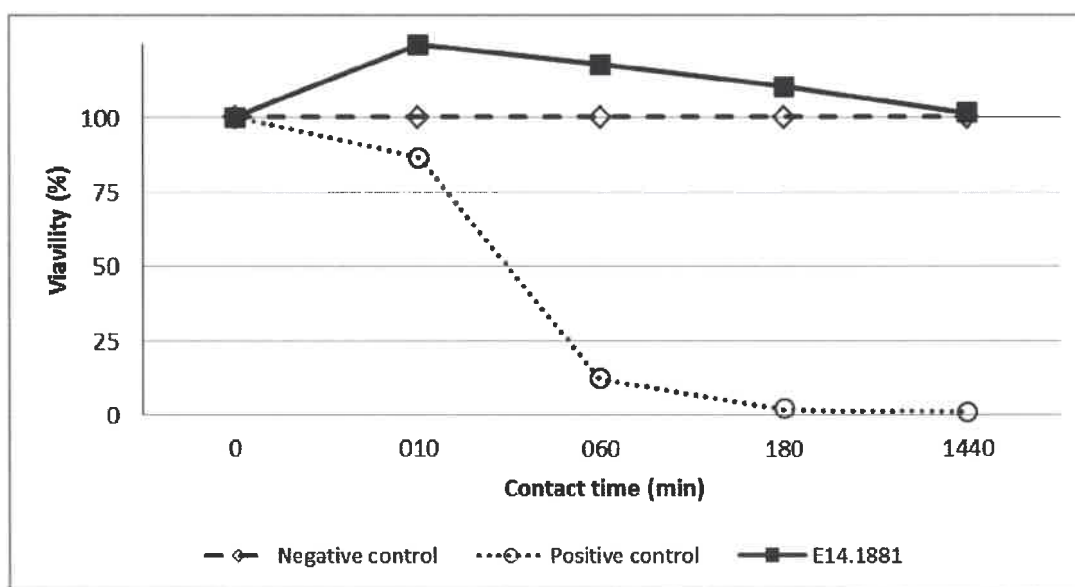


Figura 1 – Viabilidad celular de las condiciones de ensayo.

La Tabla 3 muestra los resultados del cálculo del valor de  $ET_{50}$ . A partir de cada recta se calculó la regresión lineal para obtener el valor de  $ET_{50}$ . Para este cálculo, los valores de viabilidad se expresaron con porcentaje y los de tiempo de contacto en logaritmos de los minutos. Así pues, la función fue  $y = a \cdot \text{Log } t + b$ . Este procedimiento permite obtener valores de correlación por encima de 0.90 (Klausner et al 2007).

*Tabla 3. Valor de  $ET_{50}$  (tiempo de contacto necesario para producir una pérdida de viabilidad del 50%) del control positivo y del producto de ensayo.*

<i>Muestra</i>	<i><math>ET_{50}</math> (min)</i>	<i>Correlación (<math>R^2</math>)</i>
Control positivo	23.9	0.84
Muestra de ensayo	> 24 hours	-

Los datos primarios se incluyen en el Anexo 1.

## 11. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, la muestra analizada del producto de ensayo

### **GEL PLUS DSO**

**(Batch: 24/5-2014-420)**

En las condiciones experimentales, a una concentración 100%, presentó un valor de  $ET_{50}$  (tiempo de contacto que produce una pérdida de viabilidad del 50% del tejido vaginal humano reconstruido utilizado como modelo (HVE)) de **más de 24 horas**.

## 12. DESVIACIONES

No se produjeron desviaciones durante la fase experimental del estudio.

## 13. ARCHIVO

Toda la documentación generada y el material relacionado se mantienen en archivo durante 5 años en las instalaciones de Eurofins BioPharma Product Testing Spain S. L. U. en condiciones BPL.

Aproximadamente 3 meses antes de la finalización de dicho periodo el laboratorio avisará al promotor del estudio que decidirá si alargar el periodo de archivo o no. Si se decide prolongar el periodo de archivo se redactará un protocolo específico que defina las nuevas condiciones. Si se decide traspasar el material en archivo al promotor, se preparará la transferencia del material al Promotor que se debe comprometer a mantenerlo en condiciones de archivo BPL durante el tiempo establecido por la normativa vigente.

Al finalizar el estudio, una fracción de la muestra restante en su envase original (cantidad suficiente para la ejecución del ensayo), se mantendrá en archivo durante el tiempo de validez de la muestra.



#### 14. REFERENCIAS

- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55-63.
- Srinivasan, V., Alonso, A., Bertino, B., Costin, G-E., de Brugerolle de Fraissinette, A., Orak, D., Inglis, H., Kazmi, P., Raabe, H., Re, T. Integrated in vitro vaginal safety screening approach for bath and body wash products utilizing SkinEthic human vaginal epithelium (HVE) model.

## 15. ANEXO

### Anexo 1. Datos primarios

Condición de ensayo	Tiempo de contacto	OD valores			Viabilidad celular (%)			SD (%)
Control negativo	24 horas	0,90	1,00	1,02	92,14%	102,81%	105,04%	6,9%
Control positivo	10 min	0,85	0,88	0,79	87,82%	90,26%	81,48%	4,5%
Control positivo	1 hora	0,10	0,11	0,15	10,39%	11,05%	15,51%	2,8%
Control positivo	3 horas	0,02	0,02	0,02	2,54%	1,89%	2,02%	0,3%
Control positivo	24 horas	0,01	0,01	0,01	1,10%	0,99%	0,96%	0,1%
Muestra (E14.1881)	10 min	1,24	1,17	1,22	127,17%	120,72%	125,25%	3,3%
Muestra (E14.1881)	1 hora	1,22	1,04	1,18	125,11%	107,48%	121,13%	9,2%
Muestra (E14.1881)	3 horas	1,00	1,12	1,09	103,36%	115,71%	111,87%	6,3%
Muestra (E14.1881)	24 horas	1,10	1,03	0,83	112,97%	105,97%	85,59%	14,2%