

**ESTANDARIZACIÓN DE PRUEBAS EPICUTÁNEAS O PATCH TEST CON
APLICACIÓN REPETIDA EN HUMANOS (HRIPT) EMPLEADA EN LA
DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD CUTÁNEA A MATRICES
COSMÉTICAS MEDIANTE LA TÉCNICA SHELANSKI**



LAURA MARÍA VIVAS RINCÓN

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**ESTANDARIZACIÓN DE PRUEBAS EPICUTÁNEAS O PATCH TEST CON
APLICACIÓN REPETIDA EN HUMANOS (HRIPT) EMPLEADA EN LA
DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD CUTÁNEA A MATRICES
COSMÉTICAS MEDIANTE LA TÉCNICA SHELANSKI**

LAURA MARÍA VIVAS RINCÓN

Proyecto de grado para optar por el título de Químico Farmacéutico

**Tutor
Julián Arbey González, MsC.**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014**



APROBADO POR:

Giovanni Rojas

Evaluador Externo.

Nora Elena Valderrutén Posso

Evaluador Externo.

Julián Arbey González Ospina

Director del Proyecto.

Tabla de contenido

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN DEL PROYECTO | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO..... | 11 |
| 2.1. Justificación del proyecto | 11 |
| 2.2. Marco teórico y estado del arte | 14 |
| 2.2.1. Generalidades del Patch Test | 14 |
| 2.2.2. Patch Test con aplicación repetida en humanos (HRIPT) | 16 |
| 2.2.3. Fundamentos inmunológicos del Patch Test | 17 |
| 2.2.3.1. Eventos bioquímicos de la inflamación..... | 18 |
| 2.2.3.2. Hipersensibilidad mediada por células | 19 |
| 2.2.4. Estandarización del Patch Test | 20 |
| 2.2.5. Consideraciones éticas..... | 21 |
| 2.3. Objetivos | 22 |
| 2.3.1. Objetivo general | 22 |
| 2.3.2. Objetivos específicos | 22 |
| 3. METODOLOGÍA UTILIZADA..... | 23 |
| 3.1. Diseño del protocolo de la prueba HRIPT a estandarizar | 23 |
| 3.1.1. Aspectos relacionados con los voluntarios | 24 |
| 3.1.2. Condiciones ambientales..... | 25 |
| 3.1.3. Zona anatómica a evaluar..... | 25 |
| 3.2. Prueba piloto para la implementación del Protocolo diseñado | 27 |
| 3.2.1. Evaluación dermatológica inicial..... | 27 |
| 3.2.2. Realización de los ensayos..... | 27 |
| 3.3. Comparación de la metodología estandarizada versus resultados reportados | 31 |
| 3.4. Análisis Estadístico | 31 |
| 3.5. Matriz de Marco Lógico | 33 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 35 |
| 4.1. Implementación del protocolo diseñado en una prueba preliminar | 35 |
| 4.1.1. Etapa de sensibilización | 37 |
| 4.1.2. Etapa de desafío | 40 |
| 4.2. Análisis de la proclama “hipoalergénico” del producto | 41 |
| 4.3. Comparación de los resultados obtenidos versus estudios reportados..... | 43 |
| 5. CONCLUSIONES | 45 |
| 6. RECOMENDACIONES | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 7. REFERENCIAS | 48 |
| <i>ANEXOS</i> | 51 |
| 1. Matriz cosmética empleada | 51 |
| 2. Tabla de Distribución binomial | 52 |

Contenido de tablas

| | |
|---|----|
| <i>Tabla 1. Escala de valor de respuestas en el Patch Test</i> | 30 |
| <i>Tabla 2. Cronograma de pruebas y lecturas</i> | 30 |
| <i>Tabla 3. Matriz de marco lógico</i> | 33 |
| <i>Tabla 4. Resultados completos de las pruebas</i> | 36 |
| <i>Tabla 5. Resumen de los resultados de las pruebas por etapas</i> | 36 |

Contenido de imágenes

| | |
|---|----|
| <i>Imagen 1. Ejemplos de cámaras para los Patch Test (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013)</i> | 15 |
| <i>Imagen 2. Ubicación de la zona anatómica de ensayo</i> | 26 |
| <i>Imagen 3. Ubicación anatómica del parche en el estudio</i> | 26 |
| <i>Imagen 4. Parche con producto (columna izquierda)</i> | 28 |
| <i>Imagen 5. Parches empleados (Finn Chambers AQUA®)</i> | 28 |
| <i>Imagen 6. Jeringas empleadas para dispensación del producto en los pozos del parche</i> | 29 |
| <i>Imagen 7. Escala de valor para la lectura de respuestas del Patch Test (T.R.U.E. Test, 2014)</i> | 30 |
| <i>Imagen 8. (a) y (b) Voluntario PT001 en etapa de sensibilización y desafío respectivamente; (c) y (d) Voluntario PT003 en etapa de sensibilización y desafío, respectivamente; (e) y (f) Voluntario PT004 en etapa de sensibilización y desafío, respectivamente</i> | 37 |
| <i>Imagen 9. Voluntario PT002 (retirado)</i> | 38 |
| <i>Imagen 10. Matriz cosmética que se empleó en las pruebas: SUN PRO BLOQUEADOR SOLAR SPF 90 FACIAL (Belleza Express S.A., 2012)</i> | 51 |

Contenido de Figuras

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1. Ruta bioquímica del ácido araquidónico (Jackson, 1990, pág. 27)</i> | 19 |
|--|----|

RESUMEN DEL PROYECTO

Debido al vertiginoso crecimiento que ha presentado a nivel nacional la industria cosmética, ha surgido la necesidad de ofrecer alternativas que puedan ser aprovechadas por este sector industrial con el fin de mejorar la calidad de sus productos y ofrecer cosméticos más seguros. Es por ello que la estandarización realizada en el proyecto permitió el desarrollo de un protocolo y así brindar la realización del Patch Test a las industrias que necesiten evaluar la seguridad de los productos que planean enviar al mercado o ya se encuentran en él.

Teniendo en cuenta lo anterior, este proyecto muestra la estandarización de la prueba del Patch Test o prueba epicutánea con aplicación repetida en humanos (HRIPT), empleada para evaluar la dermatitis por contacto ocasionada por reacciones de hipersensibilidad a matrices cosméticas. Estas pruebas se llevaron a cabo con base a la metodología propuesta por Shelanski que consta de tres etapas: sensibilización o inducción, reposo y desafío, en las cuales se expone la piel de voluntarios al producto cosmético en repetidas oportunidades y por tiempos prolongados de hasta 48 horas.

Para la etapa de sensibilización, los voluntarios fueron expuestos al producto empleando parches oclusivos adheridos a su espalda por 24 horas 3 veces a la semana durante 2 semanas y se monitoreó la respuesta cutánea con la ayuda de un dermatólogo. Luego de la última exposición de la primera etapa, los voluntarios tuvieron una semana libre de exposición para pasar a la última etapa, la de desafío en la que se realizó un último contacto con el producto por 48 horas y nuevamente se evaluó la respuesta de la piel de los voluntarios.

Para la estandarización fue primordial desarrollar un protocolo de la metodología que se realizaría, en el cual se establecieron las condiciones, variables y criterios de inclusión o exclusión de los voluntarios que participarían en la prueba. Luego de realizar la prueba (siguiendo el protocolo diseñado), se observaron los resultados obtenidos por esta estandarización y se compararon con los obtenidos por otros estudios empleando metodologías similares; con el fin de tener una visión general de la validez de la estandarización recién establecida.

Mediante las mencionadas comparaciones se pudo concluir que el protocolo diseñado es adecuado para llevar a cabo pruebas de HRIPT y que puede ser empleado en un futuro para evaluar la seguridad de matrices cosméticas.

ABSTRACT

Due to the vertiginous growing that has shown at national level the cosmetic industry, it has surged the need to offer alternatives which could be exploited by the mentioned industrial sector, in order to improve the quality of their products and offer cosmetics safer. Keeping that in mind, the present project standardized a protocol designed to make Patch Test, which will allow offer a service to the industry that need assess the safety of the products which they are planning to send to the market.

This project shows the standardization of the Human Repeat Insult Patch Test (HRIPT), used to assess the contact dermatitis caused by hypersensitivity to cosmetics. These tests were carried based on the Shelanski methodology which has three stages: sensitization, rest and challenge, in which the skin of the volunteers is exposed to the cosmetic many times and for long, even for 48 hours.

To the stage of sensitization, the volunteers were exposed to the cosmetic product by means of occlusive patches attached to their back for 24 hours, 3 days for two weeks and the cutaneous answer was monitored by a dermatologist. After the last exposition of the first stage, the volunteers had a free week of exposition to move to the last stage, the challenge, in which was performed the last contact with the product for 48 hours and again the dermatologist assessed the cutaneous answer.

The standardization was primordial to develop a protocol of the methodology in which established the conditions, variables and exclusion and inclusion criteria of the volunteers who might participate in the tests. After that the tests were performed, the results were observed and compared with others obtained by others studies that used similar methodologies; in order to have a general vision the validity of the newly standardized methodology.

Through the comparisons mentioned it was concluded that the designed protocol is suitable to carry out HRIPT and that can be used in the future to assess cosmetics safety.

1. INTRODUCCIÓN

El propósito del proyecto consistió en estandarizar las pruebas epicutáneas o Patch Test con aplicación repetida en humanos (HRIPT: Human Repeat Insult Patch Test), las cuales se emplean para evaluar la seguridad de productos cosméticos, mediante la medición de reacciones adversas en la piel tras la exposición prolongada a una matriz cosmética.

La importancia de realizar esta estandarización radica en la necesidad de las industrias cosméticas de realizar pruebas de seguridad a sus productos y de esta manera ofrecer cosméticos más aceptados por los consumidores, debido a que el crecimiento económico de este sector industrial ha venido en ascenso y continuar con dicha tendencia dependerá en gran medida de la seguridad y calidad de los productos que lancen al mercado.

Sin embargo, pruebas como la estandarizada en este proyecto son de poca oferta en el país y por tal motivo industrias cosméticas regionales deben solicitar dichos estudios al extranjero, lo que incrementa los costos de producción. Tras una investigación de mercado realizada por estudiantes de la Universidad Icesi, estas industrias mostraron interés en que la Universidad Icesi ofreciera el servicio de realizar las pruebas mencionadas (Sánchez Melo, 2013).

Todo lo anterior impulsa a que el grupo de investigación en Biocosmética y Biofarmacia de la Universidad Icesi se interese en estandarizar este tipo de análisis, para que luego de ser debidamente desarrolladas puedan ser ofrecidas como un servicio a las industrias cosméticas interesadas.

Las pruebas HRIPT se emplean para determinar la hipersensibilidad cutánea que puede generar alguna sustancia al entrar en contacto con la piel; en el contexto biocosmético, algunos ingredientes presentes en matrices cosméticas pueden generar reacciones adversas en la piel, algunas de estas se conocen como dermatitis por contacto. En particular, los productos cosméticos son la causa de aproximadamente una décima parte de los casos reportados de dermatitis por contacto (Tomar, Jain, Aggarwal, Dayal, & Gupta, 2005).

Las HRIPT se fundamentan en propiciar el contacto entre piel de personas sanas y el producto a evaluar a diferentes intervalos de tiempo, en dos etapas principales. Esto basado en la fisiopatología de la dermatitis por contacto, la cual es una reacción de hipersensibilidad mediada por células, es decir que al momento de un primer contacto entre la piel y la sustancia alergénica, esta última se combina con células capaces de sensibilizar la respuesta inmune (este proceso puede tardar hasta 10 días), de manera que tras una posterior exposición, luego de la sensibilización, el sistema inmune reconocerá más rápido (aproximadamente

dos días) la sustancia extraña y presentará una reacción de hipersensibilidad cutánea, conocida como etapa de provocación (Jackson, 1990).

Teniendo en cuenta lo anterior, la prueba genera la sensibilización mediante el contacto de la piel de sujetos sanos y el producto por varios días, luego suspende la administración de éste con el fin de completar esta primera etapa, para luego de una semana reiniciar el contacto, estimulando la etapa de provocación o desafío y observar si dicho producto en estudio ha generado el tipo hipersensibilidad explicado.

A pesar de que todas las HRIPT comparten el mismo fundamento basado en las etapas explicadas, los tiempos y metodologías varían de una a otra, lo que ha llevado a que a lo largo del tiempo existan diversas maneras de realizar dichas pruebas y no se ha establecido una metodología estándar que los interesados en probar la seguridad de sus productos puedan emplear. Al cambiar las condiciones de un método al otro, los resultados también pueden variar, por lo cual se recomienda que se realice una estandarización de éste antes de ser empleado para la evaluación de cosméticos.

Este proyecto estandarizó una prueba de HRIPT basada en la metodología propuesta por Shelanski, la cual cuenta con una etapa de sensibilización de 2 semanas con hasta 3 aplicaciones por semana; y una etapa de provocación final una semana posterior a la sensibilización.

El producto definitivo de esta investigación fue el desarrollo de un protocolo, el cual ofrece las condiciones establecidas para llevar a cabo las pruebas y brindar una guía final para realizarlas de una única manera; este protocolo podrá ser ofertado a las industrias nacionales y regionales para evaluar la seguridad de sus productos y resolver la necesidad de realizar dichas pruebas evitando la contratación de estos servicios por fuera de Colombia.

Este documento presentará una justificación que muestra la importancia de su realización, además de un marco teórico que contextualizará el proyecto y le dará los fundamentos conceptuales necesarios para entender lo llevado a cabo; en adición se podrán encontrar los objetivos a cumplir, cómo se materializaron y los resultados obtenidos, para finalmente realizar una discusión y ofrecer una conclusión y un protocolo definitivo para futura aplicación.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1. Justificación del proyecto

El sector de la industria cosmética y de productos de aseo en el país ha venido en constante ascenso, tanto porque empresas multinacionales han elegido Colombia como lugar para su establecimiento, como por las empresas nacionales que han presentado un crecimiento económico considerable (**Proexport Colombia, 2011**).

A pesar que Estados Unidos continua siendo líder en la producción de cosméticos y elementos de aseo, Latinoamérica ha experimentado un crecimiento acelerado en la demanda de productos cosméticos, por lo cual se espera que esta región se convierta también en líder en el sector industrial cosmético. Sólo en Colombia del 2003 al 2008 las ventas de productos cosméticos aumentaron un 15,8%, según un informe en el 2011 de la entidad colombiana encargada de la promoción de turismo, inversión y exportaciones (**Proexport Colombia, 2011**).

Es por ello que el desarrollo y fabricación de productos cosméticos se ha convertido en un punto atractivo para el crecimiento económico del país; sin embargo, esto dependerá de la calidad, efectividad, seguridad y aceptación que tengan éstos en el mercado.

Para evaluar la seguridad de un producto cosmético, por ejemplo una crema, es necesario realizar pruebas que permitan descartar la probabilidad de generar reacciones de hipersensibilidad cutánea por contacto con el producto, ya que esto puede presentarse como consecuencia de los diversos compuestos que componen una matriz cosmética; algunos de estos compuestos podrían ser fragancias, aceites naturales, surfactantes, conservantes, emolientes, entre otros, que pueden llegar a ser, en ciertos individuos sensibles, un alérgeno.

Un cosmético que haya sido sometido a un proceso de pruebas de seguridad y las haya superado satisfactoriamente, es un producto que está garantizando su uso seguro bajo ciertas condiciones establecidas, lo que se traduce en un aumento en la calidad y un valor agregado, que a su vez generará una mayor aceptación entre los consumidores y un beneficio para el sector que lo fabrica.

Una de las pruebas que se realiza para evaluar la seguridad de las matrices cosméticas es el Patch Test o pruebas epicutáneas, las cuales se han utilizado inicialmente para descubrir el agente etiológico de la dermatitis alérgica por contacto en individuos sensibles, es decir, que son utilizadas como una prueba diagnóstico, todo mediante el contacto del individuo con el agente irritante y la observación de las respuestas.

Para las pruebas en cosméticos, en lugar de emplear diversos alérgenos, se utiliza el producto comercial que se quiere desafiar y de esta manera se evalúan las posibles reacciones en la piel que éste puede causar.

A pesar de ser una prueba ampliamente utilizada en la evaluación de la seguridad de productos cosméticos, no existe un consenso internacional que estandarice la realización de la prueba, sino que diversas sociedades especialistas en el tema han realizado sus propios protocolos.

Es importante mencionar que es crucial que se realice una previa estandarización de las prueba de Patch Test si se desean seguir empleando en la evaluación de los cosméticos, dado que las variaciones de las condiciones, tales como cantidad aplicada, tiempos de exposición, características de los humanos a quienes se les realizará las pruebas, condiciones ambientales, materiales empleados, entre otros, pueden variar los resultados y la interpretación de los mismos.

La interpretación de los resultados de las pruebas epicutáneas es un proceso crítico, puesto que al tratarse de una lectura cualitativa, puede estar sujeta a sesgos relacionados con la subjetividad del que observa las reacciones en la piel, pueden presentarse falsos positivos o falsos negativos. Si se logra estandarizar la prueba, se disminuirá la variabilidad en los resultados consecuente de las condiciones en las que se realizó, pues si se utilizan las mismas condiciones para todas las pruebas, se espera que los resultados sean más uniformes y las variaciones sean atribuibles a la hipersensibilidad causada por el producto.

En el contexto regional, según un estudio realizado por Catalina Sánchez en su proyecto de grado, en el cual encuestó las industrias cosméticas regionales con el fin de realizar un análisis de mercadeo para la implementación de un laboratorio de prestación de servicios analíticos para estas industrias, 4 de los 8 encuestados realizaban pruebas de seguridad en cosméticos por medio de laboratorios terceros en el exterior. Los demás no realizaban estas pruebas (Sánchez Melo, 2013).

Entre las pruebas de seguridad que las industrias cosméticas mandaban a hacer al exterior se encuentran las de HRIPT, lo que muestra la gran necesidad de ofrecer este servicio para este sector (Sánchez Melo, 2013).

Bajo este contexto, ¿es posible realizar la estandarización de la prueba de Patch Test, con el fin de realizar un protocolo para su realización y ser aprovechado por las industrias cosméticas en la región y el país?

Con este proyecto se realizó la estandarización del Patch Test empleando como guía la metodología propuesta por Shelanski, para obtener un protocolo que establezca recomendaciones de las condiciones óptimas necesarias para realizar

la prueba, y así brindar un servicio a las industrias cosméticas que deseen evaluar la seguridad de sus productos con esta técnica.

2.2. Marco teórico y estado del arte

Los productos cosméticos se fabrican para ser aplicados en partes externas del cuerpo, como en la epidermis, los sistemas capilares, las uñas, con el fin de limpiar, cambiar la apariencia, perfumar, entre otros. Debido a este contacto, los cosméticos pueden generar efectos adversos, de los cuales se han reportado desde simples irritaciones en la piel hasta dermatitis severas (An, y otros, 2014)

Las reacciones adversas de los cosméticos representan una pequeña (aproximadamente el 10%), pero no insignificante fracción de los casos de dermatitis por contacto. Sin embargo, esto puede ser un dato no completamente cierto, luego puede ser resultado de un sub-registro, ya que son pocas las personas que consultan al médico por una alergia a cosméticos, la mayoría suspenden su uso (Tomar, Jain, Aggarwal, Dayal, & Gupta, 2005).

Estos productos son de amplio uso alrededor de todo el planeta, por lo tanto una gran cantidad de la población se encuentra expuesta a ellos y es necesario garantizar la seguridad de los mismos. En orden de conseguir lo anterior, existen varias pruebas para determinar la seguridad de los cosméticos; entre las cuales se destaca el Patch Test que puede ser de aplicación simple o el Patch test en humanos con aplicación repetida (HRIPT, de sus siglas en inglés) (An, y otros, 2014).

Se recomienda que el Patch Test se realice con productos cosméticos que se sospeche que puedan causar dermatitis por contacto, para lograr determinar cuál de los ingredientes es en sí el alérgeno. En personas que son sensibles a varios alérgenos, deberían realizar también esta prueba con los cosméticos de uso personal (Tomar, Jain, Aggarwal, Dayal, & Gupta, 2005).

2.2.1. Generalidades del Patch Test

Las pruebas epicutáneas o *Patch Tests*, han sido ampliamente empleadas para determinar la etiología de ciertas reacciones de hipersensibilidad en la piel debida al contacto con agentes que causan alergias. Se puede considerar que el punto crítico de esta prueba es la interpretación de los resultados, por lo cual se necesita que el personal encargado de leerlos esté entrenado y capacitado, dado que de estos datos dependerá el diagnóstico clínico de la dermatitis (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

Durante los siglos XVII, XVIII y XIX, por medio de prácticas empíricas, algunos investigadores empleaban agentes que desencadenaban dermatitis en las personas tratadas con el fin de encontrar las causas de estas reacciones. Fue así, como en Octubre de 1895 el médico alemán Joseph Jadassohn presentó los resultados que había obtenido empleando una “herramienta” que creó para el diagnóstico de las alergias cutáneas, la cual llamó *Patch test* (Lachapelle, 2009).

El equipo de Jadassohn continuó con el trabajo del investigador alemán, principalmente tratando de medir la intensidad de las respuestas del *Patch Test*. Luego de la Segunda Guerra Mundial, la dermatitis por contacto se convirtió en una tendencia entre los investigadores médicos. Lo anterior llevó a la necesidad de estandarizar esta prueba, puesto que todos los médicos empleaban diferentes técnicas de aplicación, concentraciones y vehículos. Por tal motivo, surge El Grupo de Investigación Internacional de Dermatitis por Contacto (ICDRG, por sus siglas en inglés) en 1967, esto se consideró un paso trascendental en la estandarización del Patch Test (Lachapelle, 2009).

Las pruebas epicutáneas consisten en aplicar, generalmente sobre la espalda de la persona a la que se le realiza la prueba, diferentes sustancias que podrían causar alergias, empleando diversos vehículos que permitan el contacto prolongado del alérgeno y la piel. Cuando se emplean en estudios de seguridad de cosméticos, la sustancia a aplicar es el producto que se está evaluando, para ello se utiliza un set de cámaras en las cuales van los agentes irritantes y que están hechas de materiales que permitan la adhesión sobre la piel y que no causen hipersensibilidad sobre ésta para que no se generen falsos positivos (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013). Algunos ejemplos de las cámaras, también llamadas *parches*, se observan en la imagen 1.



Imagen 1. Ejemplos de cámaras para los Patch Test (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013)

2.2.2. Patch Test con aplicación repetida en humanos (HRIPT)

El tipo de prueba que se realizó en este proyecto es la de Patch test en humanos con aplicación repetida (HRIPT); en esta prueba la concentración del material que será evaluado depende de varios factores: la experiencia previa de los voluntarios con el producto, los estudios previos de seguridad en animales y estudios previos en humanos (Basketter, Casati, Gerberick, Griem, Philips, & Worth, 2004).

Las pruebas HRIPT pueden ser realizadas de diferentes maneras, una de ellas es la establecida por Shelanski y colaboradores en 1953, la cual lleva su nombre. La técnica de Shelanski para realizar el Patch Test es la empleada en este proyecto (Basketter, Casati, Gerberick, Griem, Philips, & Worth, 2004).

En la prueba de Shelanski se emplean parches con el producto a evaluar para inducir la respuesta inflamatoria, los cuales se colocan sobre la piel sana del brazo o la espalda de los individuos y se dejan por 24 horas; se evalúa cada sitio de exposición para determinar si se ha presentado eritema y edema tras retirar el parche. Este procedimiento se realiza 3 veces a la semana durante 2 o 3 semanas (de 6 a 9 parches en total). Si durante estas inducciones se presenta alguna de las respuestas mencionadas, el parche debe trasladarse a un área cercana que no haya sido intervenida (Shelanski & Shelanski, 1953).

Luego de la última inducción se instala de nuevo un parche, pero esta vez por 48 horas con el fin de realizar la última parte de la prueba que pretende desafiar el producto de estudio, por ello se realiza una exposición más prolongada, la cual será igualmente medida a las anteriores. De este modo, se puede evaluar la respuesta inmediata, la respuesta acumulativa y la respuesta por exposición prolongada (Shelanski & Shelanski, 1953).

Además de la prueba de Shelanski existen diferentes tipos de pruebas HRIPT que varían en condiciones y parámetros, pero cuyo fundamento sigue siendo el mismo: evaluar las reacciones de sensibilidad cutánea tras la exposición prolongada o repetida a matrices cosméticas.

Por ejemplo el Draize Test, que al igual que en la técnica de Shelanski, se disponen los parches en el brazo o espalda del voluntario y se observa la aparición de edema o eritema, 3 veces durante una sola semana. Luego de esta última intervención se esperan dos semanas para realizar una última aplicación y observarla a las 24 horas. Este tipo de prueba pretende comparar los resultados obtenidos tras la primera semana con los resultados de la última exposición (Basketter, Casati, Gerberick, Griem, Philips, & Worth, 2004).

También existe el Draize Test modificado o Marzulli and Maibach Test, donde se coloca un parche por cada intervención y se realizan 3 veces por semana. Este procedimiento se lleva a cabo hasta que se completen 10 parches. El sitio de exposición deberá ser el mismo, mientras no se presente una reacción de

sensibilidad cutánea. Luego de esta primera fase se realiza la etapa de desafío, tras dos semanas de la última intervención se pone un nuevo parche y se deja por 72 horas para evaluar la exposición prolongada al producto. El objetivo de esta prueba es determinar el potencial de sensibilización cutánea tardía del producto a evaluar (Basketter, Casati, Gerberick, Griem, Philips, & Worth, 2004); (Alba Science, 2014).

Voss-Griffith Test es otra modalidad del HRIPT, el cual es igual al Draize Test, la diferencia radica en la etapa de desafío, donde se pone el décimo parche en la zona intervenida y otro adicional en la zona opuesta (ejemplo: brazo izquierdo y brazo derecho). Esto se realiza cuando las respuestas que se han obtenido en estudios previos han mostrado resultado dudosos (Basketter, Casati, Gerberick, Griem, Philips, & Worth, 2004).

La metodología de Shelanski, arroja los resultados necesarios para determinar si una matriz cosmética puede generar hipersensibilidad en la piel; además de esto, en comparación con las demás técnicas, ésta es la que podría tener menor duración, dado que la etapa primera de sensibilización es válida para dos semanas. Lo anterior es una ventaja debido a que una menor cantidad de tiempo invertida en las pruebas se traduce en menores costos de material y personal, adicionalmente los resultados estarán listos más rápido.

2.2.3. Fundamentos inmunológicos del Patch Test

Estas pruebas se fundamentan en las respuestas inflamatorias que se desencadenan en la piel cuando entra en contacto con agentes extraños, y que corresponde generalmente a manifestaciones clínicas tales como dermatosis eccematosa (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

Para que un alérgeno logre atravesar la piel debe cumplir con ciertas características fisicoquímicas: un peso molecular, menor de 500 Da; ser lipofílico para atravesar membranas (De Benedetto, Kubo, & Beck, 2012).

Cuando se genera el contacto con el agente irritante en personas susceptibles, el primer suceso es el daño en la integridad de la piel, esto se debe a la disminución de la capa lipídica de esta barrera, lo que altera la permeabilidad de la misma. Posteriormente, el alérgeno puede atravesar la piel y entrar en contacto con proteínas internas de los individuos. Como consecuencia el sistema inmune dérmico responde ante la presencia de tal agente extraño (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

El sistema inmune de la piel está conformado por el tejido linfoide asociado a ella (SALT por sus siglas en inglés), responsable de inducir la tolerancia e inmunidad; a su vez éste se encuentra conformado por diversos tipos de células entre las cuales se encuentran las Células de Langerhan, keratinocitos, células endoteliales y nodos linfáticos de la piel (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

Otro componente del sistema inmune de la piel es la microvasculatura dermal (DMU), compuesto por células endoteliales, células dendríticas (DC) y leucocitos; estos últimos son los responsables de la reacción inflamatoria (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

2.2.3.1. Eventos bioquímicos de la inflamación

Las prostaglandinas y los leukotrienos son una familia de mediadores celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria. Para que estos mediadores sean sintetizados, se necesita de ciertos precursores que vienen de la conversión de fosfolípidos de las membranas celulares, donde se presente la lesión o irritación (Jackson, 1990).

Las sustancias químicas irritantes estimulan la síntesis de fosfolípidos, lo que desencadena la respuesta a esta irritación, produciendo diferentes especies moleculares en respuesta a este insulto, por ejemplo la fosfolipasa, enzima encargada de la conversión de fosfolípidos a ácido araquidónico (Jackson, 1990).

Cuando el ácido araquidónico se encuentra en la membrana celular puede tomar diferentes rutas bioquímicas. Por ejemplo, si es tomado por la ciclooxigenasa se generan las prostaglandinas, las cuales son precursores de otras sustancias que generarán el proceso de inflamación, causando vasodilatación, dolor y edema (Jackson, 1990).

El ácido araquidónico también puede reaccionar con la enzima 12-lipoxigenasa y dar origen al ácido hidroperóxido eicosatetraenoico (HETE). Este posteriormente es transformado en leukotrienos, los cuales son responsables de causar múltiples procesos pro-inflamatorios: broncoconstricción, incremento en la permeabilidad vascular, producción de moco, entre otros (Jackson, 1990).

Es importante entender este proceso para determinar la estrategias que se pueden utilizar en el caso que se presente una reacción inflamatoria, ya sea inhibiendo la producción de ácido araquidónico o de sus productos. En la figura 1 se presenta un esquema que sintetiza lo explicado en los anteriores apartados.

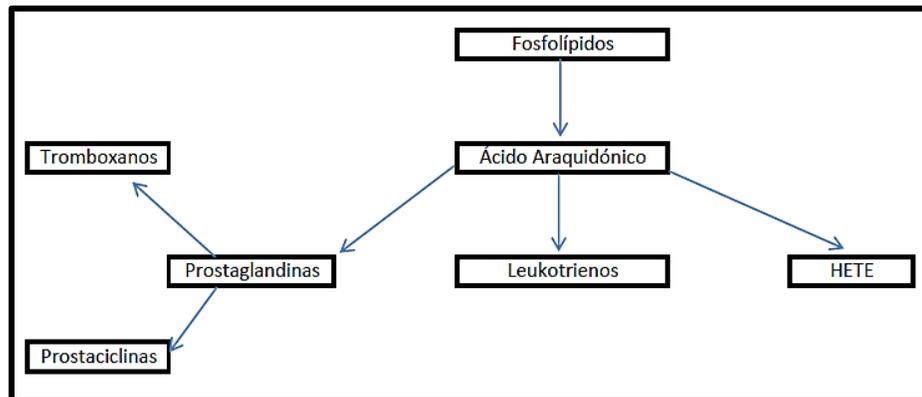


Figura 1. Ruta bioquímica del ácido araquidónico (Jackson, 1990, pág. 27)

2.2.3.2. Hipersensibilidad mediada por células

Gell y Coombs clasificaron las reacciones de hipersensibilidad en cuatro clases, de las cuales la tipo IV es la que explica lo que sucede a nivel inmunológico cuando se presenta una dermatitis alérgica por contacto; este tipo de hipersensibilidad se denomina mediada por células (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

En estos casos el alérgeno, que es por sí solo inofensivo, al combinarse con proteínas es capaz de despertar la respuesta inmune, debido a que la proteína unida a este agente se reconoce como no propia del organismo y debe ser atacada. Los islotes de Langerhan son infiltrados por células T, macrófagos, NK, entre otros leucocitos, que llevan a la posterior destrucción de éstas células que han sido mal identificadas, causando muerte apoptótica y citotoxicidad (Rajan, 2003).

Lo anterior se denomina como la fase de sensibilización y ocurre en aproximadamente 10 días. Si el individuo es expuesto de nuevo al agente causante de la alergia, se presentará una respuesta inflamatoria más rápida (2 a 3 días), que disminuirá al momento que se detenga el contacto, esta fase se denomina de “provocación” (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

Es por medio de esta última fase (provocación) que el Patch Test realiza su función; es decir, intentan generar una fase de provocación controlada de la dermatitis por contacto para lograr identificar el agente causante de tal reacción (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013). Esto en el caso de ser empleados como herramientas de diagnóstico de este tipo de alergias cutáneas, sin embargo, para evaluar la seguridad de productos cosméticos se asume que éste es el alérgeno y se pone en contacto con los individuos con el fin de identificar si se presenta o no una respuesta de hipersensibilidad.

2.2.4. Estandarización del Patch Test

Como se ha venido mencionando, la estandarización de las pruebas epicutáneas constituyen un proceso fundamental al momento de realizar estos estudios, puesto que se debe disminuir al máximo la variabilidad de condiciones entre las pruebas para no afectar los resultados ni la interpretación de éstos.

Por lo general no existe un único proceso mundialmente estandarizado para la realización de estas pruebas, sino que cada institución u organización realiza su propia estandarización y la evalúa. Por ejemplo, el grupo de estudio de dermatitis por contacto de Brasil ha establecido sus condiciones estándares para realizar estas pruebas, las cuales son recomendadas a todos los que realicen el Patch Test en su país. Según un estudio retrospectivo que se realizó entre el 2006 y el 2011, con el fin de evaluar los resultados de las pruebas realizadas siguiendo las recomendaciones de esta entidad para los Patch Tests, se logró concluir en este estudio que la estandarización permitió obtener resultados uniformes (Duarte, y otros, 2013).

Además del grupo en Brasil existen diversas comunidades que han estandarizado las pruebas que se realizan con el Patch Test, entre ellas la europea (Grupo de Investigación Internacional de Dermatitis por Contacto –ICDRG-) y la americana (Grupo de Investigación Norteamericano de Dermatitis por Contacto –NACDRG-), aunque la metodología adoptada al momento de la interpretación de los resultados es por lo general la sugerida por el Grupo Europeo (Duarte, Silva, Malvestit, Machado, & R., 2012).

El patrón que sugiere el ICDRG para leer los resultados aplican tanto para respuestas negativas como para repuestas positivas, éstas últimas se clasifican según su intensidad en tres niveles, las cuales se representan así: +, ++ y +++ (Nelson & Mowad, 2010). A pesar de que esta convención es aceptada internacionalmente, la lectura correcta de los resultados puede variar y verse afectada por las condiciones de la prueba, además no se encuentran reportados en la bibliografía estudios que validen los resultados positivos de los Patch Tests en función de la intensidad de la respuesta (Duarte, Silva, Malvestit, Machado, & R., 2012).

La estandarización debe contemplar algunos aspectos que resultan críticos al momento de la interpretación de los resultados de las pruebas, es por ello que todos deben ser considerados y tenidos en cuenta al momento de realizar el protocolo. Algunos de estos aspectos críticos son la matriz cosmética a evaluar, la cantidad o concentración de la misma, la oclusión, la población de estudio y la potencia alergena de la sustancia (McNamee, y otros, 2008).

2.2.5. Consideraciones éticas

Es importante tener presente que debido a que el desarrollo del presente proyecto requiere de la participación de voluntarios es necesario que la realización de cualquier actividad tenga como pilares los siguientes tres principios éticos: respeto por las personas, beneficencia y justicia, los cuales deben ser la guía para la preparación responsable de protocolos (CIOMS, 2002).

Respecto al principio de respeto a las personas se debe importancia hacer énfasis en el respeto por la autonomía, es decir que la participación en la investigación debe ser totalmente voluntaria y podrán tomar la decisión de retirarse y en caso tal esta decisión deberá respetarse (CIOMS, 2002).

Por otro lado, el principio de la beneficencia se refiere a que toda posibilidad de daño deberá ser minimizada, mientras que la posibilidad de beneficio para los voluntarios deberá primar en todo caso. Para la consecución de este principio es necesario que se cuente con personal competente para llevar a cabo la investigación (CIOMS, 2002).

El principio de justicia hace referencia específicamente a la justicia distributiva, es decir, que las probabilidades de daños y beneficios sean equitativos entre los voluntarios sin ningún tipo de distinción que no sea relevante para la investigación, así como tampoco pasar por encima de ciertas vulnerabilidades que estas personas puedan presentar (CIOMS, 2002).

Un último, pero no menos importante aspecto sobre la investigación en humanos, es la necesidad de presentar la propuesta o protocolo preliminar del proyecto a realizar ante un comité de ética, el cual tendrá la responsabilidad de evaluar el mérito científico y la aceptabilidad ética del mismo. Dicho comité deberá ser independiente de los responsables y/o financiadores del estudio, ya que la valoración crítica de la propuesta debe ser transparente y objetiva. Es imprescindible la aprobación por parte de un comité de ética para la realización de la investigación, sin esto no podrá iniciar el proceso (CIOMS, 2002).

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Estandarizar la pruebas epicutánea o Patch Test con aplicación repetida en humanos (HRIPT), usando como base la metodología de Shelanski; empleada para evaluar la seguridad de productos cosméticos, midiendo las reacciones adversas y la sensibilidad cutánea, mediante la exposición prolongada a una matriz cosmética en voluntarios humanos y que los resultados obtenidos sean comparables con metodologías aprobadas internacionalmente.

2.3.2. Objetivos específicos

- Diseñar el protocolo con base en lo reportado en la literatura, para la aplicación de la metodología basada en la técnica de *Shelanski* para la evaluación de la respuesta inmunológica cutánea.
- Estandarizar una metodología basada en la técnica de Shelanski, para evaluar la seguridad de matrices cosméticas, a partir de los parámetros y condiciones que permitan la lectura de resultados por medio de la evaluación dermatológica de la zona expuesta, por ejemplo: tiempo de exposición, cantidad de voluntarios, tipo de parches a utilizar, entre otros.
- Comparar los resultados obtenidos durante la estandarización de la técnica con los resultados reportados en la bibliografía y que ya han sido aprobados, para confirmar la efectividad de la prueba.

3. METODOLOGÍA UTILIZADA

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en tres etapas: primero el diseño del protocolo de la prueba, seguido de la realización de las pruebas piloto que lleven a la estandarización y por último la comparación de los resultados obtenidos con los reportados en la bibliografía para comprobar que se realizaron adecuadamente.

3.1. Diseño del protocolo de la prueba HRIPT a estandarizar

Diseñar un protocolo para realizar un estudio de seguridad en cosméticos es un paso crítico, del cual depende el éxito de las pruebas; para esto es importante establecer qué se debe tener en cuenta y cuáles son los aspectos a desarrollar.

Algunos investigadores establecen que cualquier protocolo para un ensayo debe tener una pregunta que se quiere resolver, un contexto, objetivos y metodología; esta última debe incluir las variables a evaluar, tamaño de la muestra, diseño, descripción, criterios de exclusión e inclusión, intervenciones, seguridad y eficacia en la toma de datos o medidas, y el tipo de análisis estadístico que se llevará a cabo; además del consentimiento informado que firmarán los voluntarios que se someterán al estudio (Bagatin & Miot, 2013).

Para el desarrollo de estos protocolos el primer paso consiste en definir cuál es la línea de estudio de su área de interés, seguido de una investigación a profundidad del tema, para determinar qué contenido deberá ir en el protocolo (Bagatin & Miot, 2013).

En este orden de ideas, se realizó primero una revisión bibliográfica con el fin de determinar las condiciones y parámetros que se deben tener en cuenta para definir el desarrollo de las pruebas. Por ejemplo, cantidad de matriz cosmética a aplicar, características de los individuos, así como condiciones y consideraciones ambientales.

Luego de establecer todas las condiciones de la prueba, se realizó el protocolo escrito, primero para que sea evaluado por el comité de ética y luego para realizar las pruebas.

En el protocolo se podrán encontrar las siguientes secciones:

Una introducción que cumple la función de contextualizar las partes interesadas, junto con el objetivo del estudio y la justificación del mismo. Seguidamente se expone la proclama o atributo que pretende evaluar la prueba, en este caso la seguridad del producto, determinando si puede causar hipersensibilidad cutánea.

Posteriormente, se indica cuál es el equipo investigador, el lugar donde se realiza el estudio, los materiales necesarios y la descripción del producto que se va a evaluar.

Con los aspectos enmarcadores ya establecidos, se pasó a determinar los parámetros técnicos necesarios para llevar a cabo las pruebas de HRIPT. Para la realización del protocolo fue necesario establecer las características del estudio y de los voluntarios, el diseño experimental, la zona a evaluar, las condiciones ambientales del ensayo y un paso a paso de la realización de la prueba.

Durante el diseño del protocolo se desarrollaron adicionalmente algunos documentos anexos necesarios para la aprobación del estudio por parte del comité de ética, que pueden ser incluidos en el protocolo final, puesto que son de gran utilidad al momento de llevar a cabo las pruebas HRIPT. Los anexos mencionados incluyen el consentimiento informado para los voluntarios, una plantilla de calendario de pruebas con recomendaciones e instrucciones para la adecuada apropiación de los voluntarios. También se encuentran los formatos de la evaluación dermatológica inicial, del reporte de reacciones adversas y de la toma de medidas.

A continuación se describirá de manera más detallada el procedimiento realizado para determinación de algunos parámetros necesarios para el desarrollo del protocolo.

3.1.1. Aspectos relacionados con los voluntarios

Lo primero que se realizó fue determinar las consideraciones éticas que aplicarían para el estudio, por tal motivo se tuvo en cuenta los principios en investigación biomédica establecidos por el Consejo de organizaciones internacionales de las ciencias médicas, la declaración de Helsinki y las Buenas prácticas clínicas. En síntesis el planteamiento de cada una de las fuentes mencionadas coincide en respetar los voluntarios y sus decisiones, poner por encima el bienestar de ellos reduciendo al máximo las probabilidades de daño e informar de manera clara y transparente a los voluntarios de todo el proceso de estudio y de su participación en el mismo.

Es importante que las consideraciones éticas siempre se encuentren en un protocolo de estudio con humanos, de esta manera quedará explícito que deben ser tenidas en cuenta durante el desarrollo de las pruebas que involucren seres humanos.

Otro aspecto importante sobre los voluntarios es la selección de los mismos, para tal fin era necesario establecer los criterios de inclusión y exclusión. Como primera medida a los interesados en participar se les debe realizar una evaluación previa para determinar si la piel cumple con las características necesarias para el estudio. A continuación se enumeran los criterios de inclusión y exclusión:

- Criterios de inclusión

Las siguientes condiciones incluirán a un voluntario en el grupo de prueba:

- I. Personas entre los 18 y 40 años de edad
- II. Estar afiliado a una EPS
- III. No estar en estado de embarazo o lactancia
- IV. Buen estado nutricional
- V. Anamnesis negativa de dermatitis alérgica

- Criterios de exclusión

Las siguientes condiciones excluirán automáticamente a un voluntario del grupo de prueba:

- I. Historial de respuesta anormal a productos cosméticos
- II. La zona de prueba con heridas, quemaduras o marcas
- III. Exposición intensa al sol o bronceado artificial dos semanas antes y durante el período del estudio
- IV. Historial conocido de trastornos hepáticos
- V. Empleo de algún agente tópico en las áreas testeadas que puedan interferir con el estado natural de la piel
- VI. Mujeres en terapia de reemplazo hormonal

En esta sección también se determinó en qué casos los voluntarios serían retirados del estudio.

3.1.2. Condiciones ambientales

Se determinó que las condiciones ambientales no serían un factor a controlar, puesto que los voluntarios emplearán el parche durante sus actividades cotidianas durante 24 horas, por tal motivo establecer condiciones ambientales no sería práctico. Sin embargo, sí se determinó que durante las lecturas y aplicaciones se debe garantizar un ambiente de confort para los voluntarios, de modo que los mencionados procedimientos no sean experiencias desagradables para ellos y evitar la deserción. Se establece entonces que la temperatura del cuarto donde se realice la aplicación y lectura será de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.1.3. Zona anatómica a evaluar

Para el desarrollo de las pruebas HRIPT se deben emplear áreas grandes de piel, ya que es necesario para la fácil visualización de posibles respuestas cutáneas. Por tal motivo se eligen zonas del cuerpo que presente extensa área de piel uniforme. Uno de los lugares más empleados son las extremidades, sin embargo no se eligieron puesto que, en primer lugar, presentan mayor crecimiento capilar en comparación con otras zonas anatómicas, lo que interfiere en el estudio; en segundo lugar, puede resultar de mayor incomodidad para los voluntarios en el

desarrollo de sus actividades diarias. Por lo mencionado anteriormente se determinó que la zona anatómica para las pruebas sería la espalda, dado que esta presenta un amplia área, un menor crecimiento capilar y mayor comodidad para los voluntarios. En este orden de ideas, los parches se dispondrán como se muestra en la imagen 2.



Imagen 2. Ubicación de la zona anatómica de ensayo

Sin embargo, no era necesario colocar tantos parches porque sólo con uno se obtienen cinco repeticiones por cada voluntario, de esta manera se ahorra material y se disminuye la incomodidad para los voluntarios. Bajo este contexto, se dispuso un parche en la escápula media izquierda como se observa en la imagen 3.



Imagen 3. Ubicación anatómica del parche en el estudio

La metodología de los ensayos, la cual está basada en la metodología de Shelanski se detalla en la siguiente sección.

3.2. Prueba piloto para la implementación del Protocolo diseñado

La segunda etapa se llevó a cabo luego de la aprobación por parte del comité de ética del protocolo diseñado para la realización de las pruebas. Para esta parte del proyecto se realizó primero una intervención con los interesados en participar del estudio (seis personas), en la cual se les explicó en qué consistía la prueba, cuáles eran sus responsabilidades y todas las recomendaciones que deberían tener presentes al momento que se estuvieran llevando a cabo los ensayos; en este instante los voluntarios firmaron el consentimiento informado, el cual había sido previamente realizado junto con el protocolo.

Luego de esta reunión informativa, los seis voluntarios pasaron a ser evaluados por el dermatólogo, el cual les hizo una anamnesis mediante la cual se identificó si los voluntarios cumplían con las condiciones establecidas en el protocolo para ser parte del estudio; el dermatólogo empleó los formatos desarrollados para el protocolo.

3.2.1. Evaluación dermatológica inicial

En este punto del proceso los seis interesados en participar del estudio fueron evaluados por el dermatólogo asesor del proyecto. Durante dicha consulta se indagaron aspectos generales del voluntario como peso, talla, EPS a la que se encuentra afiliado, enfermedades, tipo de piel y antecedentes de dermatitis; todo con el fin de establecer si los candidatos eran óptimos para hacer parte de las pruebas. Adicionalmente, el dermatólogo evaluó la zona anatómica de estudio para identificar posibles irregularidades que pudieran interferir con los resultados del estudio; el médico diligenció un formato previamente realizado.

De las anteriores evaluaciones se determinó que cuatro de los seis interesados eran óptimos para participar del estudio, puesto que los dos restantes presentaban historia de dermatitis irritativas a productos cosméticos y de aseo; en ese caso es necesario no aceptar dichas personas por dos motivos: en primer lugar en caso de desarrollar dermatitis durante el estudio no se tendría certeza si se trata del producto en evaluación o de una respuesta intrínseca del voluntario. En segundo lugar, esto puede significar que el voluntario tenga un sistema inmune muy sensible ante sustancias tóxicas y participar en la prueba significaría un riesgo para su seguridad.

3.2.2. Realización de los ensayos

Luego de la evaluación dermatológica inicial se pasó a realizar los ensayos en los individuos, siguiendo lo establecido en el protocolo. La matriz empleada para la estandarización fue un protector solar facial hipoalergénico con un SPF de 90 (ver anexo 1). Este proyecto se basa en la metodología propuesta por Shelanski, la

cual consiste en utilizar los parches que se emplean para las pruebas de diagnóstico de dermatitis por contacto, que junto con la matriz cosmética se colocaron en la espalda de los voluntarios y se realizó la medida de los resultados con el apoyo del dermatólogo.

Como se mencionó anteriormente, los parches empleados están conformados por 10 cámaras o pozos de aproximadamente dos centímetros de diámetro, los cuales están hechos de aluminio y cubiertos por un papel filtro. En estas cámaras es donde se ubican los alérgenos cuando el parche es empleado para el diagnóstico de alergias, en este caso en los pozos que se encuentran dispuestos en dos columnas de cinco pozos cada una, se utilizó la columna izquierda para depositar el producto a evaluar y la columna de la derecha se dejó vacía, con el objetivo de ser empleada como control (imagen 4).



Imagen 4. Parche con producto (columna izquierda)



Imagen 5. Parches empleados (Finn Chambers AQUA®)

Las cámaras o pozos mencionados se encuentran sobre un adhesivo impermeable, el cual es el responsable de mantener el contacto entre la piel y el contenido de las mismas, además de asegurar el confort de los voluntarios, dado que este no interfiere en las actividades cotidianas que involucren agua (ejemplo: tomar un baño, hacer deporte, entre otros). En la imagen 5 se pueden observar los parches empleados, los cuales son de la marca Finn Chambers AQUA®.

En cada uno de los cinco pozos de la columna izquierda del parche se agregaron aproximadamente 20µL, este valor se determinó con base las recomendaciones del fabricante de los parches, las cuales sugerían entre 20 y 30µL por pozo. Para la medición de estos volúmenes se emplearon jeringas de 1mL comúnmente empleadas para la aplicación de insulina (imagen 6).

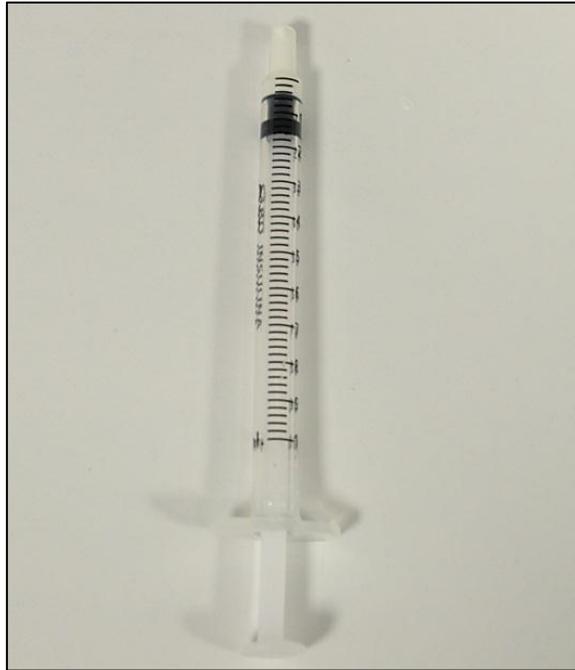


Imagen 6. Jeringas empleadas para dispensación del producto en los pozos del parche

La metodología desarrollada presenta dos etapas: la primera es la etapa de sensibilización, la cual consiste en exponer al voluntario al producto de prueba durante 10 días con el fin de generar la activación de las células responsables de la hipersensibilidad tipo IV en caso de que se presentara. Esta primera etapa se divide en 3 aplicaciones en dos semanas, las cuales se revisaban cada 24 horas, es decir se ponía un parche con el producto y al siguiente día se retiraba para la evaluación y se ponía un segundo parche y así hasta completar dos semanas, para un total de 6 parches por voluntario en dos semanas.

La segunda etapa, denominada de desafío, se realizó con el fin de generar la respuesta inmune de las células previamente sensibilizadas con el producto, en el caso de que se hubiera logrado. Para esta etapa tras una semana de no exposición al producto de prueba, se puso un último parche a los voluntarios y se dejó en contacto prolongado (48 horas) para luego realizar la evaluación.

La evaluación o lectura fue realizada por un dermatólogo empleando la siguiente escala que se presenta en la tabla 1 y la imagen 7, la cual es la más aceptada internacionalmente para el reporte de resultados de este tipo de pruebas.

Tabla 1. Escala de valor de respuestas en el Patch Test

| Escala de valor de respuestas en el Patch Test | | | | | |
|--|--|---|---|---|------------------------------|
| Positivo extremo | Positivo fuerte | Positivo débil | Irritante | Dudoso | Negativo |
| +++ | ++ | + | IR | (?) | (-) |
| Reacción con ampollas, vesículas coalescentes | Eritema, infiltración, vesículas discretas, pápulas. | Eritema, infiltración, pápulas discretas. | Eritema discreto, irregular, folicular u homogéneo sin infiltración | Eritema leve u homogéneo sin infiltración | No presenta ninguna reacción |

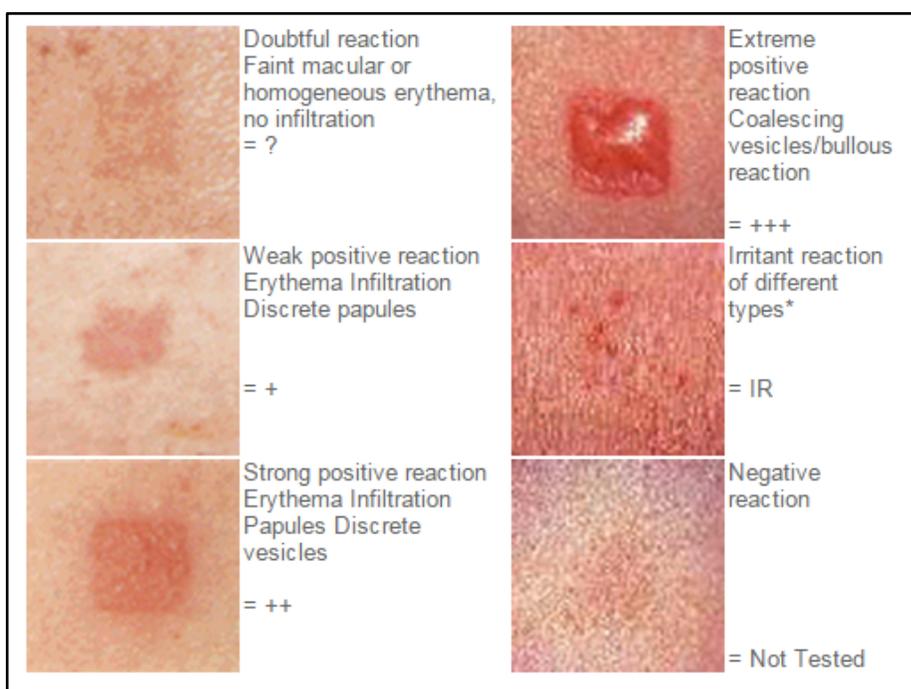


Imagen 7. Escala de valor para la lectura de respuestas del Patch Test (T.R.U.E. Test, 2014)

Las aplicaciones y lecturas se realizaron siguiendo el siguiente cronograma:

Tabla 2. Cronograma de pruebas y lecturas

| Semana 1: Etapa sensibilización | | | |
|---------------------------------|-------|-----------|-------|
| Aplicación 1 | Día 1 | Lectura 1 | Día 2 |
| Aplicación 2 | Día 2 | Lectura 2 | Día 3 |
| Aplicación 3 | Día 3 | Lectura 3 | Día 4 |

| Semana 2: Etapa sensibilización | | | |
|---|--------|---------------|--------|
| Aplicación 4 | Día 6 | Lectura 4 | Día 7 |
| Aplicación 5 | Día 7 | Lectura 5 | Día 8 |
| Aplicación 6 | Día 8 | Lectura 6 | Día 9 |
| Semana 3: Reposo (Día 10 hasta Día 16) | | | |
| Semana 4: Etapa de desafío | | | |
| Aplicación final | Día 17 | Lectura final | Día 19 |

Para asegurar que los parches se pusieran siempre en la misma ubicación de la espalda de los voluntarios se emplearon PatchTestMap, plantillas plásticas transparentes, las cuales se marcaron con el código de cada voluntario y se pusieron en la espalda de éstos para marcar dónde se puso el parche por primera vez y puntos de referencia como cicatrices y lunares; esto con el fin de ubicar la plantilla cada vez que se iba a poner un parche y de esta manera lograr la misma ubicación.

3.3. Comparación de la metodología estandarizada versus resultados reportados

Posterior a la realización de la prueba piloto se compararon los resultados obtenidos durante la estandarización con los datos obtenidos en un meta-análisis de 64 estudios de HRIPT de matrices cosméticas similares a la empleada en este estudio; con el fin de comprobar si los resultados de la estandarización son confiables. Para esto se compararon tanto las metodologías como los resultados obtenidos. Adicionalmente se realizó una revisión del informe del estudio de sensibilidad del producto empleado en el estudio.

3.4. Análisis Estadístico

Una de las maneras de comprobar que el protocolo diseñado fue adecuado es analizando si los datos obtenidos en el estudio pueden probar la proclama de hipoalergenicidad del producto empleado en la estandarización de la metodología. Se espera que los datos permitan determinar de manera confiable si el producto es o no es hipoalergénico. Para lograr esto se realizará una prueba de hipótesis asumiendo una distribución binomial, debido a que las respuestas podían ser positivas o negativas.

Se asume que un producto hipoalergénico es aquel que genera alergia en el 10% o menos de la población estudiada, este supuesto se explicará en la discusión; se opta por tomar un valor de confianza del 95% para realizar esta prueba.

Es importante tener presente que los datos que representan la hipersensibilidad mediada por células son los obtenidos en la etapa de desafío, ya que los primeros solo correspondían a generar la sensibilización del sistema inmune y los últimos darían resultados de dermatitis por contacto. Por tal motivo, sólo se tendrán en cuenta los 15 datos de esta última prueba y se espera que con este tamaño de muestra se pueda probar la hipótesis de que el producto es hipoalergénico.

Teniendo en cuenta lo anterior se realiza una prueba de hipótesis, en la cual la hipótesis nula determina que la probabilidad de obtener una respuesta positiva es menor o igual al 10% (Caffareli, Baldi, & Bendani, 2010); (Vandenplas, Brueton, & Dupont, 2007), mientras que la hipótesis alterna, establece que la probabilidad de las respuestas positivas son mayores al 10%, es decir que el producto no es hipoalergénico según el supuesto planteado, para un valor de α de 0,05:

$$H_0: p \leq 0,1$$

$$H_1: p > 0,1 \quad \alpha = 0,05$$

Respuestas positivas (x) = 0

Dónde: H_0 es la hipótesis nula, H_1 es la hipótesis alterna, p es la probabilidad de obtener una respuesta positiva de hipersensibilidad, x es el número de respuestas positivas de hipersensibilidad y α es el valor de significancia estadística.

Criterio de rechazo

Se rechaza H_0 si el valor P es menor que el valor α :

$$p < \alpha (0,05); \text{Rechaza } H_0$$

3.5. Matriz de Marco Lógico

Tabla 3. Matriz de marco lógico

| Objetivo General | | | |
|--|---|--|---|
| Estandarizar la pruebas epicutánea o Patch Test con aplicación repetida en humanos (HRIPT), usando como base la metodología de Shelanski; empleada para evaluar la seguridad de productos cosméticos, midiendo las reacciones adversas y la sensibilidad cutánea, mediante la exposición prolongada a una matriz cosmética en voluntarios humanos y que los resultados obtenidos sean comparables con metodologías aprobadas internacionalmente. | | | |
| Objetivo específico | Actividades | Supuestos | Indicador |
| Diseñar el protocolo con base en lo reportado en la literatura, para la aplicación de la metodología basada en la técnica de <i>Shelanski</i> para la evaluación de la respuesta inmunológica cutánea. | <p>Realizar una revisión bibliográfica para conocer cuáles son las variables que se manejan en la metodología.</p> <p>Seleccionar la zona y la frecuencia de aplicación.</p> <p>Determinar la cantidad de producto cosmético que se va a aplicar.</p> <p>Realizar la solicitud al comité de ética para la realización del estudio en voluntarios humanos.</p> | Se dispone de suficiente información de fuentes bibliográficas confiables acerca de la metodología. | El protocolo de la metodología que se va a estandarizar. |
| Estandarizar una metodología basada en la técnica de Shelanski, para evaluar la seguridad de matrices cosméticas, a partir de los parámetros y condiciones que permitan la lectura de resultados por medio de la evaluación dermatológica de la zona expuesta, por ejemplo: tiempo de exposición, cantidad de voluntarios, tipo de parches a utilizar, | <p>Seleccionar específicamente la población sobre la cual se realizará el estudio.</p> <p>Identificar las posibles respuestas de sensibilidad cutánea.</p> <p>Realizar las aplicaciones a las frecuencias determinadas.</p> <p>Realizar el seguimiento y lectura a las aplicaciones realizadas.</p> | <p>Aprobación del comité de ética para la realización del estudio.</p> <p>Se cuenta con los voluntarios para realizar la prueba.</p> <p>Se dispone del producto cosmético que se va a evaluar y de los parches indicados para la prueba.</p> <p>Se cuenta con el acompañamiento de un dermatólogo.</p> | <p>-Tener las variables y condiciones determinadas para la metodología.</p> <p>-Los resultados de las pruebas que se realizaron con la metodología.</p> |

| | | | |
|--|---|---|---|
| entre otros. | | | |
| Comparar los resultados obtenidos durante la estandarización de la técnica con los resultados reportados en la bibliografía y que ya han sido aprobados para confirmar la efectividad de la prueba | <p>Recopilar los resultados obtenidos durante la prueba.</p> <p>Comparar los resultados de la prueba frente los resultados de otra aprobada internacionalmente.</p> | Se cuenta con la información de los resultados de una prueba similar llevada a cabo en otro país y que se encuentre aprobada. | Los resultados de las pruebas realizadas sean similares a los resultados reportados en la bibliografía. |

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este proyecto se realizó un ensayo piloto en el cual se evaluaron todas las condiciones establecidas en el protocolo diseñado para la estandarización de una prueba epicutánea de insulto repetido en humanos (HRIPT). Los datos fueron analizados y comparados con los obtenidos por una metodología ya estandarizada, con el fin de validar la aplicabilidad de la metodología propuesta en el protocolo.

Todas las pruebas de tipo HRIPT cumplen con las mismas etapas (sensibilización o inducción, reposo y desafío o provocación) y es en la última en la que se obtiene el resultado definitivo, es decir que por medio de la medición de la respuesta de la piel ante la exposición, tras una previa sensibilización, se puede determinar si el producto probado ha causado una respuesta de hipersensibilidad retardada o mediada por células. No todas las pruebas HRIPT se realizan de la misma manera, dado que pueden variar en la duración de cada una de las etapas, sea por el tiempo de exposición a la sustancia, las repeticiones o el espacio temporal entre ellas, así como también el lugar de aplicación, la cantidad de voluntarios, entre otros (McNamee, y otros, 2008). Por lo anterior resulta necesario establecer de manera clara en el protocolo todos estos parámetros críticos que puedan afectar los resultados.

4.1. Implementación del protocolo diseñado en una prueba preliminar

Luego de diseñado el protocolo se realizó una prueba piloto con tres voluntarios con el fin de corroborar que los parámetros establecidos en el mismo eran los más adecuados para la realización del estudio. Vale la pena mencionar que en la metodología se expresó que se trabajaría con cuatro voluntarios, sin embargo durante las pruebas fue necesario retirar a uno de ellos debido a que presentó dermatitis irritativa a los componentes del parche mas no a la matriz cosmética; este caso se revisará más adelante.

La determinación de la hipersensibilidad cutánea tipo IV a matrices cosméticas, se realizó mediante una prueba epicutánea que constaba de dos etapas: sensibilización y desafío. A continuación se muestran los resultados para cada voluntario, los cuales fueron identificados con un código alfanumérico (PT001, PT003 y PT004), cada voluntario era expuesto al producto en cinco de los diez pozos del parche, por lo cual se determina que cada voluntario tenía 5 repeticiones de cada prueba en cada una de las etapas del estudio, a continuación (tabla 4) se muestran los datos completos obtenidos en el estudio:

Tabla 4. Resultados completos de las pruebas

| Voluntario | Repetición | Resultados Etapa de sensibilización | | | | | | Resultados etapa desafío |
|------------|------------|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------------|
| | | Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 | Prueba 4 | Prueba 5 | Prueba 6 | Prueba 7 |
| PT001 | 1 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT001 | 2 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT001 | 3 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT001 | 4 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT001 | 5 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT003 | 1 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT003 | 2 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT003 | 3 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT003 | 4 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT003 | 5 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT004 | 1 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT004 | 2 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT004 | 3 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT004 | 4 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| PT004 | 5 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |

A continuación, se presenta la tabla 5, la cual muestra los resultados según cada etapa del estudio.

Tabla 5. Resumen de los resultados de las pruebas por etapas

| Voluntario | Resultados | | | |
|------------|--------------------------|---------|------------------|---------|
| | Etapa de Sensibilización | | Etapa de Desafío | |
| | Prueba | Control | Prueba | Control |
| PT001 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| PT003 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| PT004 | (-) | (-) | (-) | (-) |

Las siguientes imágenes muestran los tres voluntarios tras la lectura en cada una de las etapas (sensibilización y desafío).

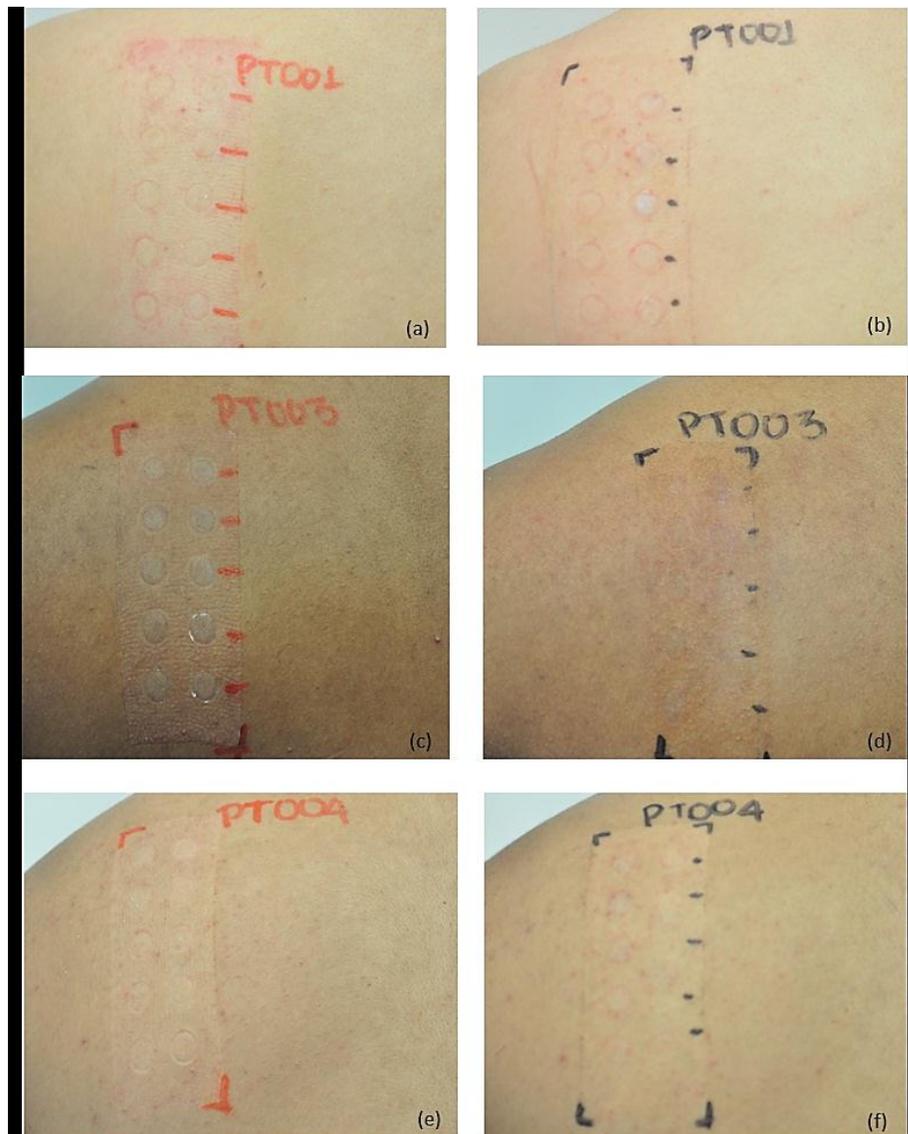


Imagen 8. (a) y (b) Voluntario PT001 en etapa de sensibilización y desafío respectivamente; (c) y (d) Voluntario PT003 en etapa de sensibilización y desafío, respectivamente; (e) y (f) Voluntario PT004 en etapa de sensibilización y desafío, respectivamente

4.1.1. Etapa de sensibilización

Como se observa en las tablas 4 y 5, durante la etapa de sensibilización los voluntarios no presentaron ningún tipo de reacción al producto cosmético evaluado; esto se determina puesto que en la zona de la piel expuesta a la columna de pozos con producto no se observó irritación.

La determinación de resultados negativos fue confirmada por el dermatólogo que apoyó el estudio. En la imagen 8 se presentan algunas fotografías de los voluntarios durante esta etapa (a, c y e).

En la imagen 8a, 8c y 8e se muestra la piel de los voluntarios expuesta al producto tras 24 horas de una de las aplicaciones de la primera etapa. En el caso de los tres voluntarios, en la zona expuesta a la columna derecha del parche (donde se encontraba el producto) no se observó ninguna reacción, al igual que el lado del control. Estas respuestas fueron iguales las demás obtenidas en la etapa de sensibilización.

Es importante destacar un evento sucedido durante esta etapa, como se observa en la imagen 8a, el voluntario PT001 presenta una pequeña irritación en la zona donde se encontraba el adhesivo del parche de prueba, sin embargo no se le retiró del estudio dado que presentó mejoría y la irritación desapareció. Caso contrario con el voluntario PT002, el cual no se tuvo en cuenta para el estudio, debido a que la irritación que presentó al parche fue muy fuerte y por su seguridad se prescindió de su participación.



Imagen 9. Voluntario PT002 (retirado)

Como se observa en la imagen 9, el voluntario PT002 presentó una dermatitis irritativa, que según el patrón del eritema se trató de una reacción adversa al adhesivo del parche, puesto que los únicos lugares donde el voluntario no mostró esta reacción fue donde no había presencia del pegante, es decir en los pozos, por tal motivo se descarta que la reacción se haya presentado por el producto evaluado.

La irritativa de contacto se caracteriza por una erupción eccematosa causada por la exposición repetida a irritantes generalmente suaves, lo que explica porque aun siendo el parche hipoalergénico logró causar tal respuesta en la persona. En estos casos es necesario suspender el contacto de la piel con el agente irritante para evitar una dermatitis crónica (Campbell, Habif, Chapman, Dinulos, & Zug, 2006).

Bajo este contexto, el dermatólogo recomendó retirar el voluntario PT002 del estudio por dos razones principales: en primer lugar la reacción le ocasionaba al

voluntario comecón, generándole incomodidad, adicionalmente por seguridad del mismo lo correcto era suspender la exposición de la piel afectada con el estímulo irritativo (el parche). En segundo lugar, la irritación arrojaba resultados dudosos sobre el área de estudio, el eritema causado por el parche podría desplazarse sobre la zona de los pozos, arrojando posibles falsos positivos.

Siguiendo las recomendaciones del dermatólogo se tomó la decisión de retirar el voluntario PT002 y continuar el estudio con una muestra de 3 voluntarios. Luego del retiro el dermatólogo recomendó al voluntario emplear un tratamiento farmacológico tópico para evitar secuelas en la zona afectada.

Diferente del caso del voluntario PT002, ningún otro caso de irritación se presentó en la etapa de sensibilización. Sin embargo, es importante recordar que este proyecto pretende estandarizar una metodología para la hipersensibilidad mediada por células, y en este tipo de sensibilidad no se espera obtener resultados en la etapa de sensibilización, sino en la etapa final de desafío. Lo anterior debido a que en esta primera etapa sólo se pretende sensibilizar las células responsables de la respuesta inmune. En caso de que se hubiera presentado una respuesta inmune al producto en esta primera etapa no se trataría de una hipersensibilidad tipo IV (mediada por células), sino de una hipersensibilización inmediata, generada por otros mecanismos diferentes a los conocidos para la de tipo IV. Es decir, que no hubiera sido concluyente para los objetivos del estudio (Jackson, 1990).

Aunque la respuesta inmune inmediata no es objetivo de estudio de este proyecto, era necesario monitorear la respuesta de los voluntarios ante la exposición con una matriz cosmética, puesto que por seguridad era importante hacer seguimiento a posibles eventos de sensibilidad cutánea dado el evento con PT002. Además, era importante establecer si los voluntarios se comportaban de igual manera o si alguno presentaba una respuesta inmune diferente al resto; respecto a esto último se pudo comprobar que los voluntarios no se comportaron de manera distinta, puesto que en todas las lecturas, para todas sus repeticiones la respuesta fue negativa.

Teniendo en cuenta lo mencionado se puede concluir que la etapa de sensibilización se llevó a cabo con éxito, pues los voluntarios estuvieron 10 días en constante exposición al producto y durante este periodo no presentaron ningún tipo de respuesta de sensibilidad cutánea. Luego de esta etapa, los voluntarios tuvieron 7 días de descanso, es decir que no hubo exposición al producto. Este tiempo es importante, puesto que la hipersensibilidad tipo IV se manifiesta luego del contacto con la sustancia que antes ha sensibilizado las células, por lo tanto no se puede realizar inmediatamente después a la etapa de sensibilización, pues en caso de presentarse una reacción alérgica podría deberse al contacto prolongado y acumulativo con el producto.

Este tiempo de descanso no se puede pasar por alto o reducirlo a menos de una semana, debido a que es necesario para que la respuesta inmunológica mediada por células se desarrolle y para que en caso de haberse iniciado una reacción de tipo irritativa inmediata por la etapa de sensibilización esta se pueda calmar (McNamee, y otros, 2008). Luego de la etapa de descanso se pasó a la etapa de desafío.

4.1.2. Etapa de desafío

La etapa de desafío debe ser considerada como la más importante del estudio, puesto que como se explicó en el marco teórico, la metodología que se estandarizó está basada en la propuesta por Shelanski, un tipo de Patch Test con aplicación repetida en humanos (HRIPT) y que su objetivo principal es determinar si el producto evaluado causa hipersensibilidad cutánea mediada por células y es gracias a esta etapa que se puede obtener tal conclusión.

Es importante mencionar que la etapa de desafío pretende simular una posible reacción adversa cutánea tras un contacto fortuito de las personas con el producto, luego de una sensibilización previa. Esto difiere, por ejemplo, de una respuesta inmediata, la cual se presentaría tras los primeros contactos entre el producto y la piel (etapa de sensibilización).

Por lo anterior, es necesario dejar descansar la piel de los voluntarios por 7 días, posteriormente se realiza una última exposición, por 48 horas, con el fin de garantizar una completa y buena interacción entre la matriz cosmética y la piel. Las observaciones fueron realizadas de igual manera que en la etapa de sensibilización y la escala de evaluación de respuesta cutánea fue la misma (ver tabla 1 e imagen 7).

Se obtuvo entonces, que los tres voluntarios en los cinco pozos con producto no presentaron ningún tipo de respuesta adversa al cosmético y se puede apreciar en la imagen 8b, 8d y 8f.

Con base en estos resultados se puede inferir que la matriz cosmética no generó hipersensibilidad cutánea tipo IV; dado que en la etapa final, la de desafío que es especialmente diseñada para detectar estas respuestas, los voluntarios no presentaron irritación asociada al producto.

En la imagen 8b se puede apreciar que el voluntario PT001 presenta una leve irritación alrededor de la marca de los pozos, básicamente donde se encontraba el pegante, debido a la larga exposición de la piel con este agente, que fue de 48 horas. Sin embargo, el voluntario no reportó comezón ni malestar.

Lo anterior era de esperarse, puesto que el producto es hipoalergénico y ha sido sometido a estudios de sensibilidad previa su comercialización. Si el protocolo fue

bien diseñado, los resultados no deberían arrojar resultados distintos a los obtenidos por los estudios de seguridad realizados por el laboratorio fabricante.

Sin embargo, algunas publicaciones sugieren incorporar a la metodología clásica del HRIPT una cuarta etapa, denominada *re-desafío*, la cual consiste en aumentar la cantidad de exposiciones que se hacen en la etapa final, es decir no realizar una sola aplicación/lectura, sino someter a los voluntarios a dos o incluso tres parches más, luego del reposo. Esta nueva variedad de etapa de desafío se ha hecho cada vez más popular, puesto que algunos investigadores afirman que eso incrementa la sensibilidad de la prueba y la confiabilidad (Agin, Ruble, Hermansky, & McCarthy, 2008).

En este proyecto no se incluyó la etapa de re-desafío, puesto que se planteó desarrollar una metodología válida pero más corta y teniendo presente que con una sola etapa de desafío se puede generar la respuesta de hipersensibilidad cutánea, se decidió no agregar más pasos a la metodología. Sin embargo, para futuras aplicaciones, modificaciones o revisiones del protocolo desarrollado se puede considerar implementar la etapa de re-desafío, con el fin de generar mayor confianza en los resultados.

4.2. Análisis de la proclama “hipoalergénico” del producto

Partiendo de la proclama del cosmético empleado, la cual establecía que el producto es hipoalergénico, es decir que ha sido formulado especialmente para evitar respuesta inmune en la piel de los usuarios y que, además ha sido evaluado dermatológicamente para demostrar tal cualidad, se esperaba entonces que los resultados a dermatitis por contacto fueran mínimos.

Según la FDA (Food and Drug Administration) no existen estándares o una definición clara de qué es un cosmético hipoalergénico, debido a que esto depende de la compañía que ofrezca dicho producto (FDA, 2014). Sin embargo, algunas publicaciones han aceptado de manera general que los productos hipoalergénicos son aquellos que causan alergias a menos del 10% de la población estudiada (Caffareli, Baldi, & Bendani, 2010) (Vandenplas, Brueton, & Dupont, 2007). En este orden de ideas se esperaba determinar si el cosmético cumplía con la proclama de “hipoalergénico”.

Probar la hipoalergenicidad del producto, desde otro punto de vista, validaría en cierto modo la metodología, pues en caso de que se pudiera comprobar que el producto es hipoalergénico daría una idea general de que el protocolo desarrollado fue adecuado en la medida que se obtuvieron los resultados esperados.

Para llegar a la meta mencionada en el párrafo anterior era necesario determinar si se presentó dermatitis por contacto teniendo en cuenta únicamente los datos de la etapa de desafío, dado que esta es la prueba definitiva en la cual el sistema inmune de las personas que han sido sensibilizadas por tal estímulo, tras una última exposición a éste, presentan una respuesta visible (eritema, enrojecimiento, eccema, entre otros) (Duarte, Silva, Malvestit, Machado, & R., 2012). Sin embargo, como se observa en las tablas 4 y 5, en la etapa de desafío no se presentó ninguna respuesta positiva, puesto que ninguna de las repeticiones de los voluntarios presentó una reacción alérgica.

Bajo este contexto fue importante establecer si la cantidad de datos ($n=15$) eran suficientes para determinar que efectivamente el cosmético era hipoalergénico. En otras palabras, si con sólo 15 repeticiones de la prueba se podía afirmar que el cosmético causaba el 10% o menos de hipersensibilidad cutánea con un nivel de significancia del 95%.

Como se mencionó en la metodología, se empleó una prueba de hipótesis de distribución binomial, ya que esta se emplea para variables dicotómicas, es decir que sólo es posible que tomen dos tipos de valores los cuales son mutuamente excluyentes (Álvarez Cáceres, 2007). En este estudio por ejemplo, las posibles respuestas era presentar una irritación (cualquiera que fuere su severidad) o no presentarla, es decir que los resultados podían ser positivos o negativos. Adicionalmente, la prueba binomial permite probar una hipótesis acerca de la proporción de casos en una población determinada.

Para obtener el valor p se empleó la tabla de distribución binomial (anexo 2), la cual indica que para un total de cero éxitos (respuestas positivas) con una muestra de 15 pruebas y una probabilidad de 0,1, el valor p es 0,2059, entonces:

$p(0,2059) > \alpha(0,025)$; No se rechaza H_0 .

Los resultados obtenidos indican que no se puede de refutar que la probabilidad de que se presente una respuesta positiva sea menor al 10%. Por tanto se puede concluir, que según los supuestos tomados con base a la bibliografía el producto efectivamente es hipoalergénico.

Es importante entender la implicación de este resultado sobre el protocolo diseñado y la metodología estandarizada. A pesar de tratarse de una prueba preliminar, con una muestra pequeña y solo con el fin de implementar el protocolo y realizar los ajustes pertinentes en la marcha, mediante este pequeño ensayo se ha podido demostrar que el producto es hipoalergénico indicando que el protocolo cumple a grandes rasgos las características necesarias para la realización de una prueba de seguridad de cosméticos, específicamente estudios de hipersensibilidad cutánea.

Vale la pena aclarar que en un futuro, cuando se decida utilizar el protocolo para probar un cosmético, es decisión del investigador del momento realizar un diseño experimental, para que de este modo pueda determinar un tamaño de muestra que se ajuste más a sus exigencias, sin embargo tanto para un número de 3 voluntarios (como el presente estudio) o de 24 voluntarios que es lo que se emplea normalmente la prueba de hipótesis binomial es aplicable.

4.3. Comparación de los resultados obtenidos versus estudios reportados

A pesar de que el principal objetivo de este proyecto era desarrollar el protocolo de la metodología para una prueba del parche en humanos con aplicación repetida para probar la seguridad de matrices cosméticas, resulta de interés comparar los resultados con estudios en los cuales se haya aplicado metodologías similares, esto con el fin de verificar que el protocolo diseñado pueda ser empleado en futuras evaluaciones.

Un meta-análisis de 64 estudios de HRIPT de bloqueadores solares desde 1992 hasta 2006 evaluó en total 19570 voluntarios y 89 productos diferentes. Vale la pena aclarar que esta revisión se consideró útil debido a que es específico para el tipo de matriz cosmética que se empleó en el presente proyecto. Los estudios que se tuvieron en cuenta en el meta-análisis cumplen con las principales características metodológicas que el protocolo desarrollado comprende, que son las tres etapas necesarias para evaluar la respuesta de hipersensibilidad cutánea (sensibilización, reposo y desafío) (Agin, Ruble, Hermansky, & McCarthy, 2008).

Los participantes de todos los estudios eran mayores de 18 años; antes de las pruebas, firmaron un consentimiento informado, fueron entrevistados para determinar si tenían historia de algún tipo de sensibilidad y se les evaluó el estado de la piel. En todos los casos la irritación en la piel fue evaluada por criterio clínico (Agin, Ruble, Hermansky, & McCarthy, 2008). Todos los aspectos mencionados se abordaron de igual manera por el protocolo, lo que significa que la metodología estandarizada tiene en cuenta asuntos imprescindibles que todos los estudios del mismo tipo incluyen.

Luego de realizar un análisis estadístico de todos los datos, los investigadores encontraron que las respuestas positivas se debieron principalmente a componentes diferentes de la matriz, como en el caso de este proyecto con el adhesivo del parche, o a alergias previas. En conclusión determinaron que solo el 0,07% de las respuestas positivas de dermatitis por contacto podían ser atribuidas a los bloqueadores solares y por tanto concluyen que este tipo de matriz cosmética (similar a la empleada en el presente proyecto) no posee un potencial de sensibilización significativo en la población general (Agin, Ruble, Hermansky, & McCarthy, 2008).

Los resultados descritos son esperanzadores, puesto que los datos obtenidos en la prueba preliminar del protocolo fueron similares a los analizados en el meta-análisis mencionado, ya que todos resultaron negativos a sensibilidad cutánea y la metodología y demás aspectos fueron similares.

Adicionalmente, se realizó una visita a la empresa fabricante del producto que se empleó en este estudio, Belleza Express[®], con el fin de revisar los informes de los estudios de sensibilidad cutánea que se le había realizado a mencionado producto por Allergisa, una organización brasilera especializada en la realización de este tipo de evaluaciones. Lo que se pudo extraer de dichos informes fue alentador, ya que los resultados obtenidos fueron iguales, es decir, ninguno de los voluntarios presentó algún tipo de evento adverso al producto.

Sin embargo, es importante recordar que el objetivo del presente proyecto no eran los resultados, puesto que sólo se trató de un ensayo preliminar, sino el estandarizar la metodología. Bajo este contexto, comparando lo realizado en este estudio versus lo realizado por la empresa mencionada fue muy similar, ya que se hizo una previa evaluación dermatológica para elegir los voluntarios de estudio y se realizó una prueba de tipo HRIPT con sus respectivas etapas (inducción, reposo y desafío). La manera de evaluar la respuesta cutánea es igual, es decir con la ayuda de un médico dermatólogo y empleado la escala empleada en este proyecto.

Durante la revisión se lograron identificar algunas diferencias respecto a lo desarrollado por el proyecto, la más importante el número de muestras, ya que en el estudio realizado por Allergisa se emplearon 70 voluntarios. Vale la pena aclarar que es diferente porque en el presente proyecto se trataba solo de un ensayo piloto y no de evaluar la seguridad del producto como en el caso de la empresa. Otra diferencia encontrada fue el tiempo de la metodología, ya que emplearon un test más desafiante al realizar 3 semanas de sensibilización con 3 aplicaciones, dejar dos semanas de reposo y hacer varias lecturas de desafío.

A pesar de las diferencias en los tiempos, las dos metodologías tienen los mismos fundamentos y se puede considerar más adelante implementar una metodología más desafiante, dependiendo de la exigencia requerida por los interesados. En conclusión, las anteriores comparaciones soportan el protocolo diseñado y le confiere confiabilidad para ser empleado en el futuro en la evaluación de la seguridad de matrices cosméticas.

5. CONCLUSIONES

- ❖ Se diseñó un protocolo en el cual se establecieron parámetros importantes, incluyendo metodología y aspectos fundamentales sobre los voluntarios para la realización de pruebas epicutáneas de aplicación repetida en humanos basándose en la metodología de Shelanski.
- ❖ Se estableció que la mejor parte para realizar el ensayo era la escápula media, debido a que en este lugar era menos probable que el voluntario se retirara el parche por accidente o le incomodara en sus labores cotidianas.
- ❖ Se determinó que la metodología propuesta por el protocolo, basada en la de Shelanski, con una duración de 3 semanas fue adecuada para cumplir con todas las etapas del estudio: 10 días en etapa de sensibilización, 7 días de reposo y 3 días en etapa de desafío.
- ❖ Se evidenció que el material adhesivo de los parches causaron irritación en algunos voluntarios, tanto así que se vio la necesidad de retirar a uno de ellos, lo que muestra que la proclama de estos materiales como hipoalergénicos se deja entre dicho.
- ❖ Se pudo determinar que ninguno de los voluntarios presentó una respuesta irritativa al producto evaluado durante la etapa primaria de sensibilización, lo que permite concluir que no generó alergias de tipo inmediato y que los voluntarios no presentaron respuesta inmune diferente entre ellos.
- ❖ En la etapa de desafío (etapa determinante de la dermatitis por contacto) los voluntarios no presentaron señales de hipersensibilidad cutánea, dando negativo en todos los resultados. Lo anterior indica que ninguno de los voluntarios presentó alergia retardada o de sensibilización al producto evaluado.
- ❖ Mediante un análisis de hipótesis de distribución binomial se pudo comprobar que el producto evaluado es efectivamente hipoalergénico, tal como lo indica su proclama. Sin embargo, esta conclusión se establece bajo el supuesto de que se le denomina hipoalergénico a los productos que causen menos del 10% de alergias en la población de estudio.
- ❖ Al determinar la hipoalergenicidad del producto evaluado por medio de los resultados obtenidos, se puede inferir que la estandarización de la metodología fue exitosa al exhibir los resultados esperados.
- ❖ Los resultados obtenidos en la prueba preliminar de la implementación del protocolo diseñado fueron comparables con los obtenidos por 64 estudios

diferentes de HRIPT con matrices cosméticas del mismo tipo de la empleada en el presente proyecto y con el estudio de sensibilidad realizado por el laboratorio fabricante; con esto se puede inferir que la estandarización fue exitosa y que el protocolo puede ser utilizado en pruebas de seguridad de cosméticos.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ En caso tal que el dermatólogo no pueda asistir a todas las observaciones de las respuestas de la piel tras la exposición al producto, se puede documentar el avance con fotografías, siguiendo condiciones estandarizadas como se realizaron en este estudio.
- ✓ A quienes interese seguir desarrollando o validando el protocolo propuesto por este proyecto, se sugiere incluir una cuarta etapa de re-desafío, la cual pone la piel de los voluntarios en condiciones más retadoras, y de esta manera se aumenta la sensibilidad y confiabilidad de la prueba.

7. REFERENCIAS

- Agin, P. P., Ruble, K., Hermansky, S. J., & McCarthy, T. J. (2008). Rates of allergic sensitization and irritation to oxybenzone-containing sunscreen products: a quantitative meta-analysis of 64 exaggerated use studies. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 24, 211 - 217.
- Alba Science. (2014). *Safety- HRIPT (Marzulli and Maibach)*. Recuperado el 25 de Abril de 2014, de Alba Science. Effective Research: <http://www.albascience.com/services/safety/patch-tests/hript-marzulli-maibach>
- Álvarez Cáceres, R. (2007). Prueba Binomial. En R. Álvarez Cáceres, *Estadística aplicada a las ciencias de la salud* (págs. 764 - 767). España: Diaz de Santos.
- An, S. M., Ham, H., Choi, E. J., Shin, M. K., An, S. S., Kim, H. O., y otros. (2014). Primary irritation index and safety zone of cosmetics: retrospective analysis of skin patch tests in 7440 Korean women during 12 years. *International Journal of Cosmetic Science*, 36, 62-67.
- Bagatin, E., & Miot, H. (2013). How to design and write a clinical research protocol in Cosmetic Dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(1), 69-77.
- Basketter, D., Casati, S., Gerberick, G., Griem, P., Philips, B., & Worth, A. (13 de Mayo de 2004). *Skin Sensitisation*. Recuperado el 19 de Abril de 2014, de European Union : [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/\(5\)_chapter_3/4._skin_sensitisation_\(final\)_1_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/(5)_chapter_3/4._skin_sensitisation_(final)_1_en.pdf)
- Belleza Express S.A. (2012). *Sun Pro: Bloqueadores*. Recuperado el 9 de Mayo de 2014, de Belleza Express S.A.: <http://www.bellezaexpress.com.co/sunpro>
- Caffareli, C., Baldi, F., & Bendani, B. (2010). Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Italian Journal of Pediatrics*, 36, 5-7.
- Campbell, J. L., Habif, T. P., Chapman, M. S., Dinulos, J. G., & Zug, K. A. (2006). Dermatitis Irritativa. En J. L. Campbell, T. P. Habif, M. S. Chapman, J. G. Dinulos, & K. A. Zug, *Enfermedades de la piel: diagnóstico y tratamiento* (Segunda ed., págs. 40-43). Madrid, España: An Elsevier .
- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). (2002). *PAUTAS ÉTICAS INTERNACIONALES PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN SERES HUMANOS*. Ginebra: En colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS).

- De Benedetto, A., Kubo, A., & Beck, L. (2012). Skin Barrier Disruption - A Requirement for Allergen Sensitization? *J Invest Dermatol*, 132(3), 949–963.
- Duarte, I., Silva, M., Malvestit, i. A., Machado, B., & R., L. (2012). Evaluation of the permanence of skin sensitization to allergens in patients with allergic contact dermatitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 87(6), 833-837.
- Duarte, I., Tanaka, G., Suzuki, N., Lazzarini, R., Lopes, A., Volpini, B., y otros. (2013). Standard patch test series recommended by the Brazilian Contact Dermatitis Study Group during the 2006-2011 period. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(6), 1015-8.
- FDA. (23 de Marzo de 2014). "*Hypoallergenic*" Cosmetics. Recuperado el 27 de Noviembre de 2014, de U.S. Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/Cosmetics/Labeling/Claims/ucm2005203.htm>
- Jackson, E. (1990). Irritation and Sensitization. En W. Waggoner, *Clinical Safety and Efficacy Testing of Cosmetics* (págs. 26-29). New York: Marcer Dekker, INC.
- Lachapelle, J. (2009). Patch testing: Historical aspects. *ANNALES DE DERMATOLOGIE ET DE VENEREOLOGIE*, 136(8-9), 575-577.
- Lazzarini, R., Duarte, I., & Ferreira, A. (2013). Patch tests. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(6), 879-888.
- McNamee, P. M., Api, A. M., Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Gilpin, D. A., Hall, B. M., y otros. (2008). A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 52, 24-34.
- Nelson, J., & Mowad, C. (2010). Allergic Contact Dermatitis. Patch Testing Beyond the TRUE Test. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 3(10), 36-41.
- Proexport Colombia. (2011). *Sector Cosméticos*. Bogotá D.C: Fideicomiso Proexport Colombia.
- Rajan, T. (2003). The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *TRENDS in Immunology*, 24(7), 376-379.
- Sánchez Melo, B. C. (2013). *ANÁLISIS DE MERCADO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS ANALÍTICOS OFRECIDO A EMPRESAS COSMÉTICAS DEL VALLE: PRUEBA PILOTO*. Proyecto de Grado para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad Icesi. Facultad de Ciencias Naturales.

- Shelanski, H., & Shelanski, W. (1953). A new technique of human patch tests. *Proc.Sci. Sect. Toilet. Goods Assoc.*, 19, 46-49.
- T.R.U.E. Test. (2014). *Interpretation of Patch Test Results*. Recuperado el 13 de Octubre de 2014, de True Test: https://www.truetest.com/global/patch_results.htm
- Tomar, J., Jain, V., Aggarwal, K., Dayal, S., & Gupta, S. (2005). Contact Allergies to Cosmetics:Testing with 52 Cosmetic Ingredients and Personal Products. *The Journal of Dermatology*, 32, 951-955.
- Vandenplas, Y., Brueton, M., & Dupont, C. (2007). Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child*, 92, 902-908.

ANEXOS

1. Matriz cosmética empleada

El producto que se empleó durante el desarrollo de este proyecto es un bloqueador solar facial, de amplio espectro y con filtros UV-B y UV-A; marca Sun Pro, fabricado por Belleza Express, laboratorio cosmético regional (Belleza Express S.A., 2012).



Imagen 10. Matriz cosmética que se empleó en las pruebas: SUN PRO BLOQUEADOR SOLAR SPF 90 FACIAL (Belleza Express S.A., 2012).

2. Tabla de Distribución binomial

Distribución binomial acumulada (*continuación*)

| <i>t</i> | <i>p</i> | | | | | | | | | | |
|----------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.1 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.75 | 0.8 | 0.9 |
| 11 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9998 | 0.9978 | 0.9862 | 0.9683 | 0.9313 | 0.7176 |
| 12 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 0 | 0.2542 | 0.0550 | 0.0238 | 0.0097 | 0.0013 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.6213 | 0.2336 | 0.1267 | 0.0637 | 0.0126 | 0.0017 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 2 | 0.8661 | 0.5017 | 0.3326 | 0.2025 | 0.0579 | 0.0112 | 0.0013 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.9658 | 0.7473 | 0.5843 | 0.4206 | 0.1686 | 0.0461 | 0.0078 | 0.0007 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 |
| 4 | 0.9935 | 0.9009 | 0.7940 | 0.6543 | 0.3530 | 0.1334 | 0.0321 | 0.0040 | 0.0010 | 0.0002 | 0.0000 |
| 5 | 0.9991 | 0.9700 | 0.9198 | 0.8346 | 0.5744 | 0.2905 | 0.0977 | 0.0182 | 0.0056 | 0.0012 | 0.0000 |
| 6 | 0.9999 | 0.9930 | 0.9757 | 0.9376 | 0.7712 | 0.5000 | 0.2288 | 0.0624 | 0.0243 | 0.0070 | 0.0001 |
| 7 | 1.0000 | 0.9988 | 0.9944 | 0.9818 | 0.9023 | 0.7095 | 0.4256 | 0.1654 | 0.0802 | 0.0300 | 0.0009 |
| 8 | 1.0000 | 0.9998 | 0.9990 | 0.9960 | 0.9679 | 0.8666 | 0.6470 | 0.3457 | 0.2060 | 0.0991 | 0.0065 |
| 9 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9993 | 0.9922 | 0.9539 | 0.8314 | 0.5794 | 0.4157 | 0.2527 | 0.0342 |
| 10 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9987 | 0.9888 | 0.9421 | 0.7975 | 0.6674 | 0.4983 | 0.1339 |
| 11 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9983 | 0.9874 | 0.9363 | 0.8733 | 0.7664 | 0.3787 |
| 12 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9987 | 0.9903 | 0.9762 | 0.9450 | 0.7458 |
| 13 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 0 | 0.2288 | 0.0440 | 0.0178 | 0.0068 | 0.0008 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.5846 | 0.1979 | 0.1010 | 0.0475 | 0.0081 | 0.0009 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 2 | 0.8416 | 0.4481 | 0.2811 | 0.1608 | 0.0398 | 0.0065 | 0.0006 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.9559 | 0.6982 | 0.5213 | 0.3552 | 0.1243 | 0.0287 | 0.0039 | 0.0002 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 4 | 0.9908 | 0.8702 | 0.7415 | 0.5842 | 0.2793 | 0.0898 | 0.0175 | 0.0017 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0000 |
| 5 | 0.9985 | 0.9561 | 0.8883 | 0.7805 | 0.4859 | 0.2120 | 0.0583 | 0.0083 | 0.0022 | 0.0004 | 0.0000 |
| 6 | 0.9998 | 0.9884 | 0.9617 | 0.9067 | 0.6925 | 0.3953 | 0.1501 | 0.0315 | 0.0103 | 0.0024 | 0.0000 |
| 7 | 1.0000 | 0.9976 | 0.9897 | 0.9685 | 0.8499 | 0.6047 | 0.3075 | 0.0933 | 0.0383 | 0.0116 | 0.0002 |
| 8 | 1.0000 | 0.9996 | 0.9978 | 0.9917 | 0.9417 | 0.7880 | 0.5141 | 0.2195 | 0.1117 | 0.0439 | 0.0015 |
| 9 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9997 | 0.9983 | 0.9825 | 0.9102 | 0.7207 | 0.4158 | 0.2585 | 0.1298 | 0.0092 |
| 10 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9998 | 0.9961 | 0.9713 | 0.8757 | 0.6448 | 0.4787 | 0.3018 | 0.0441 |
| 11 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9994 | 0.9935 | 0.9602 | 0.8392 | 0.7189 | 0.5519 | 0.1584 |
| 12 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9991 | 0.9919 | 0.9525 | 0.8990 | 0.8021 | 0.4154 |
| 13 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9992 | 0.9932 | 0.9822 | 0.9560 | 0.7712 |
| 14 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 0 | 0.2059 | 0.0352 | 0.0134 | 0.0047 | 0.0005 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.5490 | 0.1671 | 0.0802 | 0.0353 | 0.0052 | 0.0005 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 2 | 0.8159 | 0.3980 | 0.2361 | 0.1268 | 0.0271 | 0.0037 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.9444 | 0.6482 | 0.4613 | 0.2969 | 0.0905 | 0.0176 | 0.0019 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 4 | 0.9873 | 0.8358 | 0.6865 | 0.5155 | 0.2173 | 0.0592 | 0.0093 | 0.0007 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 |
| 5 | 0.9978 | 0.9389 | 0.8516 | 0.7216 | 0.4032 | 0.1509 | 0.0338 | 0.0037 | 0.0008 | 0.0001 | 0.0000 |
| 6 | 0.9997 | 0.9819 | 0.9434 | 0.8689 | 0.6098 | 0.3036 | 0.0950 | 0.0152 | 0.0042 | 0.0008 | 0.0000 |
| 7 | 1.0000 | 0.9958 | 0.9827 | 0.9500 | 0.7869 | 0.5000 | 0.2131 | 0.0500 | 0.0173 | 0.0042 | 0.0000 |
| 8 | 1.0000 | 0.9992 | 0.9958 | 0.9848 | 0.9050 | 0.6964 | 0.3902 | 0.1311 | 0.0566 | 0.0181 | 0.0003 |
| 9 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9992 | 0.9963 | 0.9662 | 0.8491 | 0.5968 | 0.2784 | 0.1484 | 0.0611 | 0.0022 |
| 10 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9993 | 0.9907 | 0.9408 | 0.7827 | 0.4845 | 0.3135 | 0.1642 | 0.0127 |
| 11 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9981 | 0.9824 | 0.9095 | 0.7031 | 0.5387 | 0.3518 | 0.0556 |
| 12 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9997 | 0.9963 | 0.9729 | 0.8732 | 0.7639 | 0.6020 | 0.1841 |
| 13 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9995 | 0.9948 | 0.9647 | 0.9198 | 0.8329 | 0.4510 |
| 14 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9995 | 0.9953 | 0.9866 | 0.9648 | 0.7941 |
| 15 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |