

UN NUOVO APPROCCIO PER LA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA DEI PRODOTTI COSMETICI MEDIANTE COMBINAZIONE DI METODI *IN VITRO* E *IN VIVO*

R. Vicini¹, A. Buzzella^{1,2}, G. Mazzini³, C. Angelinetta¹, E. Regola¹, F. Bianchi¹, O. Pastoris²

1. *Bio Basic Europe S.r.l., Milano, Italia*

2. *Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia, Italia*

3. *Istituto di Genetica Molecolare, CNR, Pavia, Italia*

Il regolamento Europeo 1223/2009 vieta l'immissione sul mercato di prodotti cosmetici la cui formulazione finale o i cui ingredienti siano stati oggetto di sperimentazione animale e nel contempo impone che tali prodotti siano sicuri per la salute umana. Da qui la necessità di impiegare metodi alternativi alla sperimentazione animale che siano convalidati e ufficialmente approvati a livello comunitario. Molti di questi metodi si basano su tecniche *in vitro* su colture cellulari, che hanno il vantaggio di essere sistemi di facile gestione, economici e rapidi, ma di contro forniscono dei modelli previsionali non sempre direttamente traslabili al sistema *in vivo*. Per questo motivo è particolarmente utile ricorrere ad una strategia combinata di test *in vitro* e *in vivo* in grado di fornire un maggior numero di informazioni utili a garantire la sicurezza per l'utilizzatore finale dei prodotti cosmetici testati. In questo contesto abbiamo messo a punto un test multi-step per valutare l'elevata tollerabilità dei prodotti cosmetici che prevede l'esecuzione sequenziale di test *in vitro* e *in vivo*.

Sono stati testati **193** prodotti cosmetici di diversa natura. Il primo step prevede l'esecuzione di un test pro-sensibilizzante *in vitro* su colture di monociti umani, che si basa sulla valutazione mediante citofluorimetria di flusso della variazione della morfologia cellulare e dell'espressione di CD86 e CD54 indotta da sostanze sensibilizzanti. Le cellule sono state mantenute in coltura per 48 ore prima di essere trattate per 24 ore con i prodotti testati alla più alta concentrazione non citotossica, determinata in base ai risultati di un test preliminare di vitalità cellulare. Cellule mantenute in terreno di coltura rappresentano il controllo negativo; come controllo positivo si è utilizzato NiSO₄. Dopo immunomarcatura con anticorpi monoclonali anti-CD86 e anti-CD54 marcati FITC i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro.

Verificata l'assenza di potenziale pro-sensibilizzante *in vitro*, i prodotti sono stati sottoposti al secondo step di analisi clinica *in vivo* su volontari. Per valutare il potenziale potere irritante e sensibilizzante è stato eseguito un patch test su 25 volontari: 20 µl/cm² di prodotto (o 20 µg/cm² per i solidi) sono stati applicati sulla schiena dei volontari. Dopo 24 ore il prodotto è stato rimosso e si è valutata la comparsa di reazioni cutanee (eritema ed edema) nell'arco delle 24 ore successive, attribuendo un punteggio da 0 (assenza di eritema/edema) a 4 (eritema/edema grave). Il test è stato eseguito a livello ambulatoriale sotto supervisione di un medico dermatologo.

Confermata l'assenza di potenziale irritante e sensibilizzante *in vivo* i prodotti oggetto dello studio sono stati sottoposti ad indagine clinica per verificare la tollerabilità cutanea a lungo termine: 20 volontari hanno utilizzato i prodotti quotidianamente per 28 giorni consecutivi durante i quali è stata registrata l'insorgenza di eventuali lievi effetti indesiderati (secchezza, arrossamento, bruciore, prurito).

182 prodotti su 193 (94.3%) non hanno mostrato attività pro-sensibilizzante *in vitro*. Questi prodotti hanno dato esito negativo anche al patch test (assenza di eritema/edema) e al test di tollerabilità cutanea (assenza di effetti indesiderati). 11 prodotti (5.7%) hanno invece mostrato un

effetto pro-sensibilizzante *in vitro*, ma sono stati comunque sottoposti ad analisi clinica *in vivo* per verificarne la tollerabilità cutanea. Tutti i prodotti hanno dato esito negativo al patch test (assenza di eritema/edema) e al test di tollerabilità cutanea (assenza di effetti indesiderati).

Possiamo concludere che i test su colture cellulari *in vitro* consentono di prevedere con buona approssimazione la sicurezza d'uso *in vivo* dei prodotti cosmetici. Tuttavia la presenza *in vitro* di un'azione indesiderata sembrerebbe non comportare la comparsa di tale azione anche *in vivo*. In questi casi è quindi opportuno approfondire l'analisi con specifici test *in vivo*.