

TEST ALTERNATIVI IN VITRO

	EFFICACIA	BIOCOMPATIBILITA'
METODI NON BIOLOGICI: sistemi artificiali sintetici e programmi computerizzati utilizzati per la correlare i risultati con quelli su uomo e su animale, attraverso modelli matematici.	SPF Diffey: test spettrofotometrico per la determinazione dell'SPF (fattore di protezione solare) <i>in Vitro</i> di un prodotto cosmetico in accordo alla metodica di Diffey. Il test consente di valutare la Lambda critica del prodotto e di attribuire un grado di protezione in base al rapporto UVA/UVB.	irritazione OCULARE Ocular IRRITECTION® Assay System irritazione CUTANEA Dermal IRRITECTION® Assay System corrosività cutanea CORROSITEX®
* METODI BIOLOGICI: valutazione della bio compatibilità ed efficacia di materie prime e prodotti cosmetici finiti mediante l'applicazione di metodi <i>In Vitro</i> biologici che prevedono l'impiego di diversi tipi di colture cellulari.	Tipi di studio: <ul style="list-style-type: none"> • metabolismo antiossidante, • infiammatorio/antinfiammatorio, • pigmentante/depigmentante, • stimolante la crescita cellulare (rinnovamento cellulare). • analisi morfologica dei substrati cellulari per la valutazione della vitalità e benessere cellulari: <ul style="list-style-type: none"> ○ osservazione a fresco in contrasto di fase, con colorazioni differenziali di vario tipo (ematossilina-eosina), ○ con colorazioni specifiche dei vari compartimenti cellulari che permettono l'evidenziazione di lesioni a carico del nucleo e degli acidi nucleici contenuti (arancio di acridina). • Sostegno di Claims di prodotti cosmetici, materie prime, dispositivi medici: <ul style="list-style-type: none"> ○ antiossidante, ○ antinfiammatorio ○ antiageing ○ Efficacia barriera contro antigeni di origine batterica 	test di vitalità cellulare diretti (<i>UNI/EN ISO 10993-5</i>). <i>Es:</i> MTT, Neutral Red Uptake, conta cellulare con coloranti vitali. test di vitalità cellulare indiretti . Es: dosaggio delle proteine totali, dosaggio della Lattato Deidrogenasi citoplasmatica rilasciata. Fototossicità . (2000/33/CE (2004))

1) I metodi di biocompatibilità NON biologici sono stati progettati da InVitro International (Irvine, CA), che dal Settembre 1985, studia tecnologie di test alternativi senza uso di animali, disponibili in Kit. Il test Corrositex della InVitro International è accettato e approvato da un grande numero di enti regolatori, comprendenti: DOT, EPA, EU/OECD, European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), OSHA, FDA, Consumer Product Safety Commission, Transport Canada, e IATA come sostitutivo del test di Draize.

INT.E.G.R.A. oltre ad utilizzare queste tecnologie è EUROPEAN TRAINING CENTER e distributore esclusivo dei kit.

2) test Biologici: Il nuovo LABORATORIO di BIOLOGIA CELLULARE APPLICATA è stato concepito per la valutazione della bio compatibilità ed efficacia di materie prime e prodotti cosmetici finiti mediante l'applicazione di metodi *In Vitro* biologici che prevedono l'impiego di diversi tipi di colture cellulari. Esso si avvale della tecnologia necessaria alla conservazione a medio termine di linee cellulari di origine umana e di mammifero, alla loro manipolazione in condizioni di sterilità e sicurezza, allo studio di specifici markers di sofferenza e funzionalità cellulari.

La **VALUTAZIONE DELLA BIO-COMPATIBILITA'** dei prodotti è eseguita secondo quanto descritto in **"The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 371,2"**, e nella norma *UNI EN ISO 10993-5* relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici.

* Test biologici eseguiti nel Laboratorio di Biologia Cellulare Applicata

VALUTAZIONE DELLA BIOCOMPATIBILITA'

La valutazione della biocompatibilità dei campioni, materie prime e prodotti finiti, viene eseguita mediante l'applicazione di test alternativi biologici basati sull'impiego di colture cellulari di origine umana non trasformate: prevalentemente cheratinociti e fibroblasti.

I test sono eseguiti secondo quanto descritto dalla normativa UNI EN ISO 10993-5 relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici.

La biocompatibilità può essere valutata mediante l'applicazione di test e dosaggi più o meno complessi che verificano la sopravvivenza cellulare dopo esposizione al campione in esame.

TEST DI VITALITA' CELLULARE:

MTT TEST: si basa sull'uso del sale di tetrazolio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) che è ridotto a sale di formazano dalla succinato deidrogenasi mitocondriale e dalle deidrogenasi citoplasmatiche delle cellule sopravvissute al trattamento con il campione. Poiché i mitocondri sono tra gli organuli cellulari che più precocemente subiscono l'aggressione delle sostanze estranee applicate, questo test costituisce un buon metodo per la valutazione dello stato di integrità della membrana mitocondriale, dei processi metabolici ad essa associati e quindi del potenziale citotossico associato all'uso del campione in esame. (Test colorimetrico).

NEUTRAL RED UP-TAKE (NRU): si basa sull'accumulo nei lisosomi citoplasmatici del colorante rosso neutro. Il sequestro ed immagazzinamento del colorante è un processo attivo, quindi la quantità di colorante accumulato è proporzionale al numero di cellule vive presenti. Le cellule sane o meno danneggiate conterranno una maggiore quantità di colorante, quindi dall'estrazione del rosso neutro catturato dai lisosomi si ottiene un liquido di cui la densità ottica è proporzionale al numero di cellule vive presenti. Questo test, grazie anche all'opportunità di acquisire immagini, fornisce importanti informazioni e consente dunque di fare una fine valutazione dei livelli di sofferenza cellulare e del potenziale citotossico delle sostanze testate. (Test colorimetrico).

RILASCIO DELLA LATTATO DEIDROGENASI: la Lattato Deidrogenasi è un enzima citoplasmatico ubiquitario che viene liberato nel medium di coltura attraverso la membrana cellulare più o meno gravemente danneggiata dall'esposizione al campione. Poiché la membrana cellulare costituisce il primo bersaglio dell'esposizione allo xenobiotico, il suo ritrovamento viene considerato un marker di citotossicità precoce. (Test colorimetrico)

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE FOTOTOSSICO: Il saggio di fototossicità in vitro è basato sul confronto della citotossicità del campione in esame con e senza esposizione a una dose non citotossica di luce UVA/visibile e consente di ricavare il valore di fotoirritazione che costituisce il modello di predittività del test applicato. (Allegato II della direttiva 2000/33/CE della commissione europea del 25/04/2004)

ANALISI MORFOLOGICA: è possibile ottenere importanti informazioni relativamente all'entità delle lesioni cellulari subite testimoniate poi dall'acquisizione di immagini digitali. L'osservazione diretta delle cellule a fine e durante l'esposizione è eseguita a fresco, con l'impiego di un microscopio in contrasto di fase, o previa colorazione del monostrato cellulare (es: Giemsa, Ematossilina Eosina).

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA

ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA FORMAZIONE DEI RADICALI LIBERI

Il test, basato sull'uso della sonda fluorescente 2,7 diclorofluoresceina diacetato (2,7 DCFH-DA), consente di fare una valutazione aspecifica della capacità del campione in esame di inibire la formazione di radicali liberi in cellule sottoposte a stress ossidativo, rispetto quelle non trattate con il campione e stressate del controllo interno. (Test fluorimetrico)

Al termine del test di attività antiossidante, è applicato il test di vitalità cellulare Neutral Red Uptake per evidenziare il possibile effetto protettivo sulla vitalità cellulare conseguente alla ridotta produzione di radicali liberi; infine, eseguendo il test NRU a 22-24 ore dal termine del test di attività antiossidante, è possibile verificare la protezione delle cellule dalle lesioni cellulari indotte dai radicali liberi che non causano morte cellulare immediata ma dopo qualche ora.

VALUTAZIONE DELLA PROTEZIONE DEL DNA DALLO STRESS OSSIDATIVO

Il test si basa sull'evidenziazione, mediante colorazione con Arancio di Acridina (colorante specifico per il DNA e l'RNA), della frammentazione nucleare indotta dallo stress ossidativo ed eventualmente ridotta dal trattamento con il campione ad azione antiossidante in esame. L'azione del campione è valutata mediante osservazione in fluorescenza e testimoniata dall'acquisizione di immagini digitali.

ATTIVITA' RIGENERANTE

VALUTAZIONE DELL'AZIONE STIMOLANTE SUL RINNOVAMENTO CELLULARE E SUL METABOLISMO PROTEICO

Il test si basa sulla valutazione indiretta dell'incremento del numero delle cellule dopo esposizione al campione per 24-48 e 72 ore mediante applicazione del test di vitalità cellulare MTT e sul dosaggio delle proteine totali agli stessi intervalli di tempo (saggio colorimetrico), rispetto il controllo non trattato. Il test può essere eseguito su fibroblasti, cheratinociti o entrambe le linee cellulari a seconda della destinazione d'uso del campione.

ATTIVITA' ANTIINFIAMMATORIA

Tra i diversi mediatori liberati da cheratinociti e fibroblasti nel corso dell'infiammazione ne sono stati selezionati due: l'Interleuchina 6 (IL6) e la 8 (IL8).

L'attività antiinfiammatoria di prodotti finiti o materie prime viene verificata mediante valutazione dell'inibizione del rilascio di IL6 e IL8 da parte di cellule sensibilizzate e poi ricoverate con il campione in esame.

VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DEL RILASCIO DI IL6

Il test si basa sulla valutazione dell'inibizione del rilascio di IL6, mediante dosaggio colorimetrico ELISA, da parte di fibroblasti umani sensibilizzati con una soluzione di NiSO₄, o esposizione a raggi UVB, e poi ricoverate over night con il campione in esame. Il risultato

Integrazione di Esperienze per la Gestione e Razionalizzazione INT.E.G.R.A. Sr.l.

Sede amministrativa: 24040 Via E. de Amicis, 18 Suisio (BG) Tel. +39 035.49.48.571 Fax +39 035.49.31.305

Sede operativa: 20056 Via G. Pastore, 3 Trezzo sull'Adda (MI) Tel. +39 02.90.92.95.69 Fax +39 02.92.09.23.82

Sede legale: 20122 Via Santa Sofia, 27 Milano – Cap. sociale: 12.000 Euro

E-mail: info@cosmeting.it amministrazione@cosmeting.it WWW.cosmeting.it

P. IVA: 13201890152 Codice Fiscale: 13201890152

ottenuto dal dosaggio dell'IL6 è completato dal risultato del test di vitalità cellulare (MTT o NRU) eseguito sulle stesse cellule a fine ricovero allo scopo di evidenziare un eventuale ruolo protettivo in termini di vitalità cellulare da parte del campione.

VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DEL RILASCIO DI IL8

Il test si basa sulla valutazione dell'inibizione del rilascio di IL8, mediante dosaggio colorimetrico ELISA, da parte di cheratinociti umani sensibilizzati con una soluzione di NiSO4 e poi ricoverate over night con il campione in esame. Il risultato ottenuto dal dosaggio dell'IL8 è completato dal risultato del test di vitalità cellulare (MTT o NRU) eseguito sulle stesse cellule a fine ricovero allo scopo di evidenziare un eventuale ruolo protettivo in termini di vitalità cellulare da parte del campione.

ATTIVITA' DEPIGMENTANTE E PIGMENTANTE

DOSAGGIO DELL'INIBIZIONE DELLA SINTESI DI MELANINA

Il test si basa sull'impiego della linea cellulare B16 (melanociti murini), che mantiene anche in coltura la capacità di produrre quantità significative di melanina. L'attività depigmentante o pigmentante del campione in esame viene valutata, mediante dosaggio spettrofotometrico della melanina prodotta ed estratta dalle cellule, ed è testimoniata dall'acquisizione di immagini digitali. I risultati così ottenuti sono ulteriormente confermati dal dosaggio delle proteine totali che seguono proporzionalmente l'andamento della melanina sintetizzata.

EFFETTO BARRIERA

Obiettivo del test è verificare la capacità di alcuni prodotti finiti e materie prime di "isolare fisicamente" le cellule -fibroblasti umani- dal contatto con l'allergene di origine batterica LPS (Lipopolisaccaride da E.Coli). L'azione barriera è dedotta dalla mancata o ridotta sensibilizzazione del monostrato cellulare che si traduce nella mancata o ridotta produzione di un mediatore infiammatorio qual'è l'IL6. (Test colorimetrico ELISA)