



Foto di neelam279

La sperimentazione animale, oltre che comportare problemi etici, presenta anche limitazioni per quanto riguarda la predittività nell'uomo, da qui l'urgenza di sviluppare metodi alternativi.

Cosmetici: metodi alternativi alla sperimentazione animale

La sensibilizzazione cutanea e la genotossicità

Nel 2013 in Europa è entrato in vigore il divieto totale dell'uso della sperimentazione animale nei cosmetici. Il Testing Ban prevede il divieto di testare sugli animali non solo i prodotti finiti, già in vigore dal 2004, ma tutti gli ingredienti cosmetici.

Questo ha dato inizio a un'intensa attività scientifica nello sviluppo di metodi alternativi che fossero capaci di garantire gli stessi standard di sicurezza senza sfruttamento animale, dato che per l'immissione in commercio di un cosmetico è comunque imprescindibile verificarne la sicurezza.

***Elena Badeng**
***Anna Rita Bilia**

Per tanto tempo la sperimentazione animale è stata fondamentale nella valutazione della sicurezza e della tollerabilità nei cosmetici. Tra i test più importanti erano presenti:

1. *Draize Eye Irritation Test*: La sostanza testata viene instillata nell'occhio del coniglio con difficoltà a lacrimare, causando irritazioni, ulcerazioni all'occhio e danni alla cornea per ore o giorni.
2. *Draize Skin Irritation/Corrosion Test*: la sostanza viene applicata sulla pelle di un coniglio rasato, si vanno poi a valutare arrossamenti, infiammazioni o lesioni.
3. Tossicità acuta (LD50): somministrazione della sostanza a dosi progressive con monitoraggio degli effetti avversi fino alla morte dell'animale.
4. *Guinea Pig Maximization Test* o *Buehler Test*: si vanno a rilevare le reazioni allergiche dopo esposizioni ripetute della cavia alla sostanza.
5. Mutagenicità e Cancerogenicità: esposizione prolungate dei roditori alla sostanza con conseguenti sofferenze croniche.



Nel 2013 in Europa è entrato in vigore il divieto totale dell'uso della sperimentazione animale nei cosmetici.

Al termine della sperimentazione gli animali venivano quasi sempre uccisi per decapitazione, rottura del collo o asfissia, spesso senza anestesia o sollievo dal dolore. Non essendoci benefici medici, la sofferenza inflitta veniva considerata sproporzionata e immorale. Questi metodi oltre che comportare problemi etici, avevano anche limitazioni per quanto riguarda la predittività nell'uomo: da qui l'urgenza di sviluppare metodi alternativi alla sperimentazione animale.

Nel 2013 in Europa entra in vigore il Regolamento (CE) n. 1223/2009 [1], ovvero il divieto totale dell'uso della sperimentazione animale nei cosmetici. Questo avviene attraverso la *Testing Ban* ossia il divieto di testare sugli animali non solo i prodotti finiti, già in vigore dal 2004 [2], ma tutti gli ingredienti cosmetici e attraverso il *Marketing Ban*, ossia il divieto di immissione sul mercato europeo di prodotti cosmetici la cui formulazione, o uno qualsiasi dei suoi ingredienti, sia stato oggetto di sperimentazione animale, anche se condotta al di fuori dei confini dell'Unione Europea.

Questo ha dato inizio a un'intensa attività scientifica nello sviluppo di metodi alternativi che fossero capaci di garantire gli stessi standard di sicurezza senza sfruttamento animale, dato che per l'immissione in commercio di un cosmetico è comunque imprescindibile veri-

ficarne la sicurezza. Secondo il Regolamento (CE) n. 1223/2009 ogni cosmetico deve essere sottoposto a una valutazione del rischio in base alle proprietà tossicologiche dei suoi ingredienti, alle condizioni d'uso previste e in base al profilo di esposizione del consumatore.

Uno degli *endpoint* fondamentali da valutare è la sensibilizzazione cutanea, un processo immunologico che avviene quando una sostanza chimica reattiva, un aptene, penetra la barriera cutanea inducendo una risposta immunitaria adattiva. Questo induce l'organismo a sviluppare una memoria immunologica specifica verso la sostanza sensibilizzante e ad avere una reattività aumentata in caso di esposizioni successive.

L'*Adverse Outcome Pathway* (AOP) [3] descrive in maniera sequenziale e causale, cosa avviene tra l'interazione iniziale e l'effetto avverso finale. In particolare, per quanto riguarda la sensibilizzazione cutanea i *Key Events* sono:

- **KEY EVENT 1:** Interazione molecolare iniziale (*Molecular Initiating Event*, MIE), ossia il legame covalente che avviene tra aptene e proteine cutanee

- **KEY EVENT 2:** Attivazione dei cheratinociti, le cellule epidermiche rilasciano citochine pro-infiammatorie che contribuiscono alla risposta immunitaria innata

- **KEY EVENT 3:** Attivazione e maturazione delle cellule dendritiche: le APC (*Antigen-Presenting Cells*) captano i complessi aptene-proteina e migrano verso i linfonodi, esprimendo molecole co-stimolatorie e rilasciando mediatori immunitari

- **KEY EVENT 4:** Attivazione dei linfociti T nei linfonodi, le cellule dendritiche presentano l'antigene ai linfociti T naïve, inducendo proliferazione e differenziazione in cellule effettrici della me-

moria. Al successivo contatto con la sostanza sensibilizzante, l'attivazione dei linfociti T della memoria provoca una reazione infiammatoria cutanea che si presenta come dermatite allergica da contatto.

Una panoramica sulle tecniche disponibili

Tra le tecniche che abbiamo a disposizione per la valutazione della sensibilizzazione cutanea abbiamo metodi *in chemico*, *in vitro*, *in ovo*, ed *ex-vivo*.

Tra i metodi *in chemico* c'è il *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA) [4] che misura la capacità di una sostanza di formare legami covalenti con lisina e cisteina, simulando quindi il *Key Event 1*. Si preparano due soluzioni: uno contenente lisina sintetica e uno contenente cisteina sintetica. La sostanza in esame viene miscelata in ciascuna soluzione a pH, temperatura e tempo controllati. Dopo il periodo di incubazione si va a misurare il livello di deplezione, ossia quanto peptide libero è rimasto, attraverso cromatografia liquida ad alte prestazioni. Se nelle soluzioni contenenti la sostanza in esame c'è una riduzione della quantità di peptide libero significa che c'è stata una reazione ed è un segnale di una possibile reazione cutanea. Più è alta la percentuale di deplezione e più è grande la probabilità che si tratti di un sensibilizzante cutaneo. DPRA è un test riconosciuto con classificazione OECD TG 442C (*Organisation for Economic Co-operation and Development* [5], *Test Guideline 442C*) come metodo alternativo per la sensibilizzazione della pelle.

Nella stessa *Test Guideline* del DPRA (OECD - TG 442C) è presente anche il test *Aminoacid Derivative Reactivity Assay* (ADRA) [6] che a differenza del DPRA usa derivati sintetici degli aminoacidi contenenti gruppi

tiolici e aminici analoghi a quelli di cisteina e lisina, più semplici, più stabili e più facilmente analizzabili, riducendo quindi alcune delle limitazioni presenti nel DPRA quali ossidazione della cisteina, solubilità delle sostanze e interferenze analitiche. Il resto della procedura rimane uguale a DPRA.

Il *Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (K-DPRA)* [7] è il terzo e ultimo test riconosciuto e incluso nell'OECD (TG 442C), valuta sempre il *Key Event 1*. Rappresenta un'evoluzione rispetto al tradizionale DPRA [8] in quanto si concentra sulla velocità della reazione, in modo da poter discriminare tra sensibilizzanti di potenza diversa. La sostanza in esame viene incubata con un peptide contenente cisteina a cinque concentrazioni diverse (5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mM) e la reazione viene monitorata a più intervalli di tempo (30, 90, 150, 210 e 1440 minuti). La quantità di peptide che non ha reagito viene misurata attraverso HPLC-UV, generando una matrice di dati (ossia la % di deplezione del peptide in funzione di tempo e concentrazione). In questo modo dà quindi un risultato quantitativo basato sulla cinetica e non solo sulla misura nel tempo singolo, inoltre fornisce il parametro logkmax che si può usare in valutazioni di rischio quantitativo e permette di affinare i modelli SAR (relazione struttura-attività).

Tra i metodi *in vitro* per valutare la sensibilizzazione cutanea abbiamo invece KeratinoSens™ [9] [10], un saggio validato dall'OECD (TG 442D) che si basa sul monitoraggio del *Key Event 2*, ossia l'attivazione dei cheratinociti, in particolare della via di segnalazione Nrf2-Keap1-ARE [Figura 1] [11]. Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), è un fattore di trascrizione

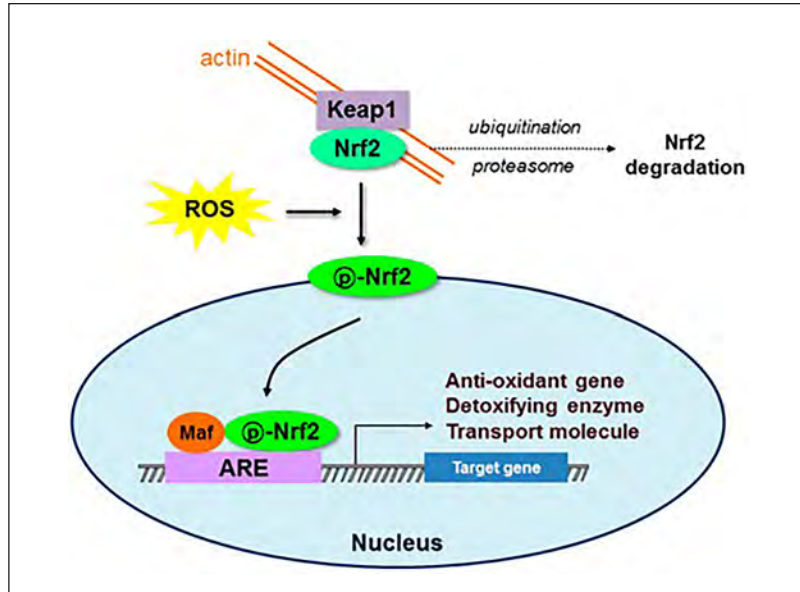


Fig. 1

La Linea del Cuciniere

Florinda
www.saponiflorinda.it
www.ladispensacosmesinaturale.it

Il Sapone del Cuciniere
NEUTRALIZZA ED ELIMINA GLI ODORI DI CUCINA DALLE MANI
CHEF'S LIQUID SOAP
Neutralizes and eliminates cooking smells from the hands.

Crema Mani del Cuciniere
EMOLLIENTE E IDRATANTE
CHEF HAND CREAM
Emollient and Moisturizing
CON OLIO ESSENZIALE DI LIMONE
With lemon essential

Detergente Saponigie Solido
SODI DISH WASHING CLEANER
SOAPSANTIZANTE E IGIENIZZANTE CON OLIO ESSENZIALE DI ROSEMARINO
Neutralizes and sanitizes with Rosemary essential oil

Made in Italy

OLIO DI OLIVA BIO
OLIO ESSENZIALE LIMONE

Instagram: @ladispensacosmesinaturale

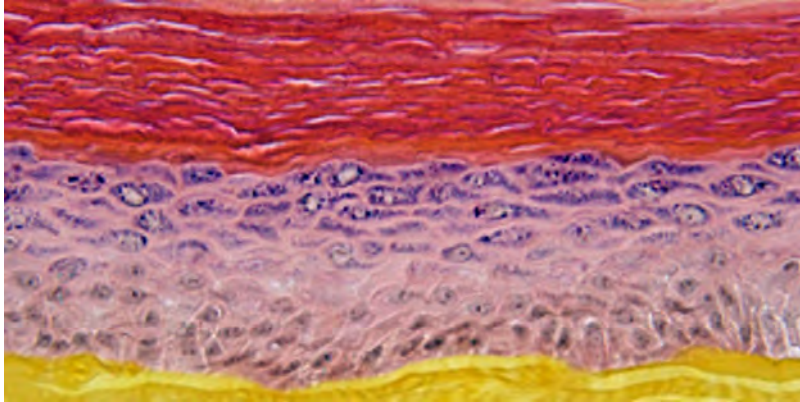


Fig. 2



Fig. 3

che regola l'espressione di geni citoprotettivi, Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) è una proteina citoplasmatica che, in condizioni fisiologiche, lega Nrf2 e ne promuove la degradazione proteasomiale, gli ARE (*Antioxidant Response Elements*) sono sequenze regolatorie presenti nel DNA che promuovono la trascrizione di geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e all'infiammazione. In presenza di sostanze elettrofile o ossidanti (tipiche di molti sensibilizzanti cutanei) Keap1 viene modificato covalentemente, Nrf2 rimane libero e trasloca nel nucleo e legandosi agli ARE, stimolando la trascrizione di geni citoprotettivi.

Le cellule utilizzate nel test KeratinoSens™ sono cheratinociti umani della linea HaCat stabilmente transfettate con una sequenza genetica contenente la sequenza ARE come promotore e il gene luciferasi come gene reporter (catalizza la trasfor-

mazione di luciferina, aggiunta dall'operatore, in fotoni), in questo modo possiamo misurare indirettamente l'attivazione di questa via biologica osservando la luce emessa, indice della presenza di un sensibilizzante cutaneo.

Incluso nella OECD *Test Guideline* 442E abbiamo U-SENS™ [12], un test *in vitro* che simula il *Key Event 3*. Utilizza una linea cellulare umana chiamata U937 che deriva dal linfoma umano. Sebbene di origine monocitara, queste cellule si comportano come cellule dendritiche quando esposte ad agenti sensibilizzanti, ossia aumentando l'espressione di CD86, un marcatore specifico dell'attivazione immunitaria. Le cellule vengono esposte alla sostanza in analisi per 45 ore e se dopo l'esposizione c'è un aumento significativo dell'espressione di CD86 rispetto al controllo, significa che la sostanza ha la capacità di attivare una risposta immunitaria, e quindi può essere potenzialmente un sensibilizzante. Per quantificare la CD86 espressa si usano anticorpi monoclonali anti-CD86 coniugati con fluorocromi (tipicamente FITC), la cui fluorescenza viene rilevata e quantificata dal citometro a flusso.

L'h-CLAT [13] è un altro metodo validato da OECD (TG 442E)

che valuta la sensibilizzazione cutanea attraverso il *Key Event 3*. È un saggio *in vitro* che usa cellule umane THP-1, una linea cellulare monocitica derivata da leucemia infantile e ampiamente impiegata come surrogato delle cellule dendritiche. A differenza del test U-SENS™, che misura esclusivamente l'*upregulation* di CD86, l'h-CLAT misura la sovraespressione di CD86 e CD54, fornendo così un quadro più ampio. Anche qui la misurazione viene fatta attraverso anti-CD54-FITC e anti-CD86-FITC e citometria a flusso.

Un altro parametro fondamentale da valutare per la sicurezza dei cosmetici è la genotossicità [14], poiché i cosmetici vengono applicati direttamente e ripetutamente su pelle, labbra o mucose è fondamentale che gli ingredienti non presentino rischi genotossici.

Queste valutazioni possono essere fatte su modelli tridimensionali di cute umana ricostruita (*Reconstructed Human Epidermis*, RHE), vengono prodotti coltivando cheratinociti umani su un supporto di collagene (di origine animale), così da ricreare la stessa struttura e funzionalità dello strato epidermico della cute [Figura 2] [Figura 3] [15]. In questo modo riesce a riprodurre la stratificazione cellulare di strato basale, spinoso, granuloso e corneo, i processi di differenziazione e cheratinizzazione e anche alcune funzioni fisiologiche come la barriera cutanea e una certa attività metabolica. Esistono vari modelli di cute umana ricostruita quali EpiSkin™ [15], EpiDerm™ [16] o EpiCS™.

Su questi modelli vengono effettuati test di genotossicità. Uno di questi è il *Micronucleus Assay* [17], un saggio che serve a rilevare micronuclei nelle cellule dopo la divisione cellulare. Si formano da frammenti

cromosomici da rottura (effetto clastogeno) o da cromosomi interi non migrati correttamente che non vengono incorporati nel nucleo (effetto aneugenico). La presenza di questi micronuclei indica un danno genotossico. La sostanza da analizzare viene applicata sulla superficie dei modelli di cute umana ricostruita, viene anche aggiunta citocalasina-B che impedisce la citodieresi (fase finale della divisione cellulare in cui abbiamo la separazione del citoplasma), in questo modo otteniamo cellule binucleate in cui possiamo controllare se c'è un aumento significativo dei micronuclei rispetto ai controlli, indice di potenziale genotossico della sostanza. Si analizzano le cellule binucleate perché sono prova del fatto che sono passate da almeno una divisione.

È possibile effettuare il *Micronucleus Assay* anche sulla membrana corioallantoidea di uova fecondate. Nell'HET-MN (*Hen's Egg Test - Micronucleus*) [18] viene utilizzato un uovo fecondato incubato per 8 giorni con tempo sufficiente per la formazione di tessuti embrionali e sistema ematopoietico, in condizioni fisiologiche simili all'organismo *in vivo* e capace di assorbimento, biotrasformazione ed eliminazione delle sostanze testate. Possiede infatti un me-

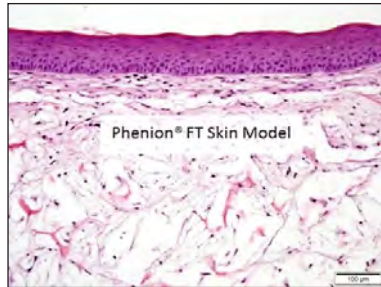


Fig. 4

tabolismo di fase I e II abbastanza sviluppato da poterci testare la genotossicità di sostanze mutagene e pro-mutagene che richiedono attivazione metabolica. Dopo aver esposto l'uovo alla sostanza in esame attraverso un'iniezione nel sacco aereo nell'ottavo giorno di incubazione, si incuba l'uovo per ulteriori 72 ore. Dopo ciò si va a prelevare il sangue embrionale e si analizzano gli eritrociti colorati al microscopio (almeno 1000 per determinare la frequenza dei micronuclei), la presenza di micronuclei indica un danno genotossico.

Un modello di RHE più avanzato è quello di Phenion® *Full-Thickness Skin Model* [19], che oltre a uno strato epidermico differenziato possiede anche un derma, fatto da gel tridimensionale di collagene umano in cui sono inseriti fibroblasti dermici primari che vanno a rimodellare il

collagene, a sintetizzare nuova matrice extracellulare come collagene di tipo I, di tipo III, fibronectina, elastina e vanno anche a produrre fattori di crescita che regolano la differenziazione dei cheratinociti [Figura 4] [Figura 5] [19]. Su questo tipo di RHE è possibile fare il Comet Assay, più adatto per la valutazione del danno genotossico in quanto i danni basali che subiscono al DNA (quelli presenti anche nei controlli) sono più bassi e sono più stabili e meno soggetti a variabilità rispetto ai modelli di RHE classici.



Fig. 5

AQUAMARIS

elixir

...naturale effetto detossificante

Con Tarassaco, Betulla e Gramigna
che favoriscono il drenaggio
dei liquidi corporei
e le funzioni depurative dell'organismo.

Sarandrea,
da 100 anni
una storia
naturale.

SARANDREA
FITOTERAPIA

www.sarandrea.it

COLLEPARDO (FR)
Via D'Alatri, 3/b
Tel. 0775.47012
Fax 0775.47351

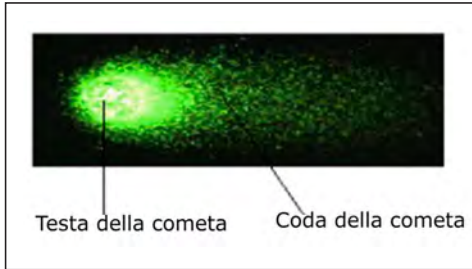


Fig. 6

Il *Comet Assay* [20] [21] chiamato anche *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) è una tecnica di laboratorio usata per rilevare e quantificare i danni al DNA di una singola cellula. Il test prende il nome dalla forma a cometa che assumono i nuclei cellulari danneggiati durante l'analisi [Figura 6] [22]. Dopo aver esposto il RHE alla sostanza in esame e ottenuto cheratinociti e fibroblasti mediante digestione enzimatica, il test parte con la preparazione

delle cellule che vengono sospese in agarosio a bassa fusione e distribuite su un vetrino da microscopio.

Poi vengono applicate soluzioni ad alto contenuto salino o soluzioni detergenti che servono a rompere le membrane cellulari (sia plasmatica che nucleare) e lasciare il nucleotide: cioè, una struttura contenente solo il DNA deproteinizzato, ancora ancorato nel gel.

Il test viene eseguito a pH fortemente basico cosicché le basi azotate si denaturino e si separino in filamenti singoli. In questo modo vengono convertiti in tratti aperti sia le rotture a singolo filamento (SSB *single-strand-breaks*) sia i siti labili alcalini derivati da depurinazioni o deaminazioni. I filamenti nel nucleo vengono poi sottoposti ad un campo elettrico che li fa migrare verso l'anodo in

base alle dimensioni: più piccoli e danneggiati sono e più lontano si spostano; quindi, il DNA integro è poco mobile nel gel e rimane concentrato nella "testa" della cometa mentre i frammenti spezzati o rilassati migrano nel gel verso l'anodo, formando la "coda". Il DNA viene colorato con un fluorocromo e osservato al microscopio a fluorescenza, se il nucleo è integro appare rotondo e compatto, se invece ci sono rotture, i frammenti migrano formando una coda allungata che ricorda appunto una cometa.

I modelli tissutali 3D

I modelli tissutali 3D rappresentano un grande passo avanti rispetto ai sistemi bidimensionali, nonostante ciò, hanno comunque la limitazione di essere sistemi statici. Per superare queste limitazioni la ricerca biotecnologica gli OoC,

I modelli di epidermide umana ricostruita sono spesso molto costosi, hanno limitata stabilità biologica e hanno problemi di importazione, mentre la pelle umana da interventi chirurgici risulta spesso più economica e facilmente reperibile in paesi come il Brasile, dove gli interventi di chirurgia estetica sono frequenti.



Immagine di TungArt7

Organ-on-a-Chip [23], microdispositivi microfluidici che contengono colture cellulari (spesso tridimensionali) all'interno di canali che vengono attraversati da flussi controllati di liquidi simulando così più correttamente le condizioni dinamiche e le interazioni fisiologiche tipiche degli organi umani. [Figura 7] [23] Riescono a integrare più tipi cellulari, matrici extracellulari 3D e stimoli biomeccanici, in questo modo possono riprodurre perfusione, respirazione e metabolismo. L'aspetto più innovativo è la capacità di riprodurre condizioni dinamiche che mancano completamente negli altri metodi sperimentali come lo *shear stress* dovuto al flusso sanguigno, la permeabilità vascolare o la migrazione cellulare. Inoltre, con OoC è possibile tenere sotto controllo moltissimi parametri con precisione, come la portata del flusso, la concentrazione di ossigeno, la pressione meccanica, la temperatura, la composizione del mezzo di coltura e si può controllare in tempo reale le risposte che avvengono a livello cellulare usando sensori integrati o tecniche di imaging ad alta risoluzione.

OoC è composto da una piccola piattaforma di pochi centimetri quadrati, in genere in polidimetilsilossano (PDMS) o altri polimeri trasparenti in modo da poterlo osservare al microscopio. Dentro al chip ci sono dei microcanali delle dimensioni di un capillare dentro ai quali scorrono le soluzioni nutritive che servono ad alimentare le cellule e che vanno anche a rimuovere i prodotti di scarto. I vari canali possono essere separati da membrane porose o matrici extracellulari artificiali sulle quali sono coltivate cellule umane spesso come modello tissutale 3D. Le cellule specializzate possono provenire da biopsie, donatori *post-mortem*, da linee cellulari immortalizzate (tumoriali o ingegnerizzate) o da cellule sta-

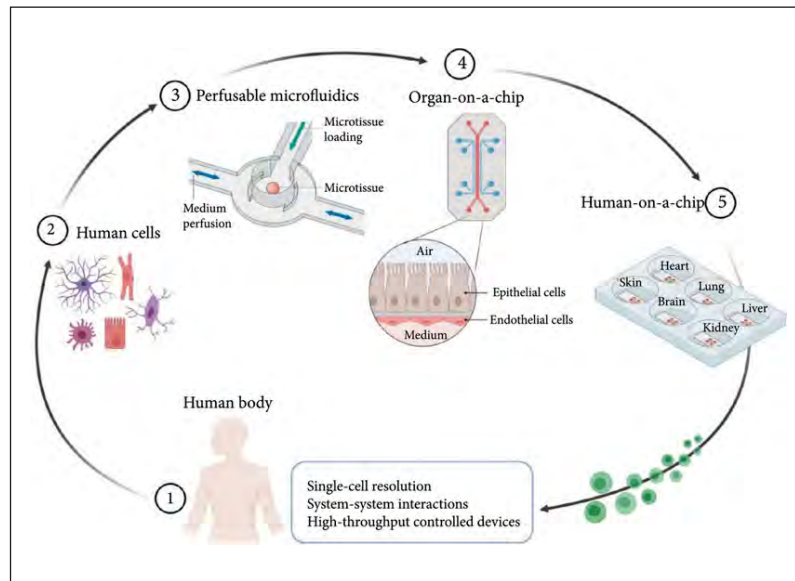


Fig. 7

TECNO-LIO
L'energia della Vita

LAVORAZIONI C/TERZI
Integratori alimentari
in capsule, liquidi e liofilizzati

Si eseguono produzioni di piccoli e medi lotti

- Integratori in capsule formato 0 in barattolo o in blister
- Integratori liquidi in monodose da 10 e 15 ml
- Integratori con contagocce
- Liquidi e soluzioni in flaconi fino a 1000 ml
- Liofilizzazione in monodose con sigillatura sottovuoto
- Integratori di nostra produzione con possibilità di personalizzazione
- Lavorazione materie prime fornite dal cliente
- Confezionamento finale
- Assistenza per formulazioni personalizzate

Tecno-lio S.r.l.
Via Riviera Berica, 260 - 36100 Vicenza
Tel.0444530465 - fax.0444532275
E-mail: info@tecno-lio.it
Website: www.tecno-lio.it

minali pluripotenti indotte.

A seconda dell'organo che si va a simulare il chip varia, ad esempio nel *lung-on-a-chip* che va a simulare i polmoni abbiamo due compartimenti separati da una membrana flessibile, un compartimento contiene cellule epiteliali alveolari e l'altro cellule endoteliali che imitano i capillari polmonari. Applicando periodicamente una pressione meccanica si simulano anche espansione e contrazione che avvengono nel polmone durante la respirazione. In *liver-on-a-chip* che simula il fegato ci sono epatociti e cellule endoteliali in un ambiente che porta costantemente nutrienti che rappresenta la perfusione sanguigna del fegato.

Esistono anche *skin-on-a-chip*, *heart-on-a-chip*, *gut-on-a-chip* e anche sistemi più complessi come *multi-organ-on-a-chip* che va a ricreare le interazioni sistemiche come metabolismo o tossicità integrata tra organi. È quindi un metodo estremamente personalizzabile, in quanto è possibile incorporare le simulazioni di organi che si desidera e inoltre possono essere anche costituiti da cellule derivati da pazienti o da cellule staminali indotte permettendo quindi di fare test di tossicità individualizzati. Tra le limitazioni abbiamo però sicuramente complessità tecnica, costi elevati, poca standardizzazione, la durata limitata delle colture ed il fatto che non sono ancora riconosciuti a livello regolatorio, anche se sono oggetto di valutazione di diverse agenzie internazionali.

Un tipo di sperimentazione che si trova a metà tra quella *in vitro* e *in vivo* è la sperimentazione *ex-vivo* [24], in cui vengono utilizzati tessuti o organi che vengono prelevati da organismi vivi e mantenuti in coltura per un certo periodo di tempo limitato. A differenza delle sperimentazioni *in vitro* riescono a mantenere la struttura

tridimensionale originale, la complessità del tessuto e le interazioni cellulari presenti in origine, in questo modo otteniamo anche una migliore predittività.

In particolare, la cute umana *ex vivo* ottenuta da interventi di chirurgia plastica, originariamente destinata al normale smaltimento dei rifiuti biologici e utilizzata previo consenso informato, rappresenta un'alternativa etica e importante nello studio della risposta cutanea a formulazioni topiche.

I modelli di epidermide umana ricostruita come EpiDerm™ o EpiSkin™ sono spesso molto costosi, hanno limitata stabilità biologica e hanno problemi di importazione, mentre la pelle umana da interventi chirurgici risulta spesso più economica e facilmente reperibile in paesi come il Brasile, dove gli interventi di chirurgia estetica sono frequenti. Il tessuto umano viene standardizzato in pezzi di spessore e diametro uguali e mantenuto in coltura, in questo modo si possono ottenere risultati paragonabili e scientificamente rilevanti.

L'introduzione del divieto europeo ha stimolato lo sviluppo di metodi alternativi sempre più sofisticati e capaci di fornire risultati sempre più affidabili e predittivi. I saggi *in chemico* e *in vitro*, i modelli tridimensionali di cute umana ricostruita, le tecniche *ex-vivo* e le più recenti piattaforme *Organ-on-a-Chip* dimostrano come oggi sia possibile valutare *endpoint* fondamentali quali la sensibilizzazione cutanea senza sfruttamento animale.

In particolare, tra le tecnologie disponibili, i più promettenti sono sicuramente basati sulla sperimentazione su pelle umana ricostruita e i sistemi *Organ-on-a-chip*, i primi grazie alla loro elevata riproducibilità, rilevanza fisiologica e accettazione da parte dell'OECD già per diversi *endpoint* tossicologici, mentre gli OoC sebbene debbano fare

ulteriori passi in termini di standardizzazione e validazione, rappresentano una frontiera tecnologica in rapida evoluzione che riesce a integrare microfluidica, bioingegneria e colture cellulari umane, consentendoci di simulare sempre meglio la fisiologia umana.

In conclusione, il settore cosmetico con questa rivoluzione ha dimostrato che combinando impegno normativo, innovazione tecnologica e consapevolezza sociale, un cambiamento radicale è possibile.

*** UNIVERSITÀ DI FIRENZE,
Dipartimento di Chimica**

Riferimenti

- [1] Parlamento Europeo e Consiglio, «Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio sui prodotti cosmetici.» 2009. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=cell-ex%3A32009R1223>.
- [2] Eur-Lex, ««2003/15/CE,» Gazzetta ufficiale dell'Unione europea,» 27 02 2023. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0015>.
- [3] OECD, «The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins,» *OECD Series on Testing and Assessment*, vol. 168, 2014.
- [4] OECD, «TG 442C: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to Proteins: DPRA,» *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, p. 11, 2025.
- [5] OECD, «The OECD: Better policies for better lives,» [Online]. Available: <https://www.oecd.org/en/about.html>.
- [6] OECD, «TG 442C: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to Proteins: ADRA,» p. 26, 2025.
- [7] OECD, «TG 442C: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to Proteins: kDPRA,» p. 47, 2025.
- [8] D. W. Roberts, «A critical review of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for skin sensitizer potency assessment - taking it forward,» *Critical Reviews in Toxicology*, pp. 805-819, 2022.
- [9] OECD, «TG 442D: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Keratinocyte activation,» p.

- 10, 2024.
- [10] A. M. A. De Rentiis, M. Pink, N. Verma e S. Schmitz-Spanke, «Assessment of the different skin sensitization potentials of irritants and allergens as single substances and in combination using the KeratinoSens assay,» *Contact Dermatitis*, pp. 317-325, 2021.
- [11] Y. S. Oh e J. Hee-Sook, «Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n. 1, p. 26, 2018.
- [12] OECD, «TG 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation: U-SENS,» p. 24, 2024.
- [13] OECD, «TG 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation: h-CLAT,» p. 7, 2024.
- [14] Eur-Lex, «Regolamento (CE) n. 1223/2009, Allegato I,» p. 22, 2009.
- [15] EpiSkin, «EpiSkin / Human Epidermis,» L'Oréal Research & Innovation, [Online]. Available: <https://www.episkin.com/Episkin>.
- [16] MatTek, «Human Tissue Models: EpiDerm,» [Online]. Available: <https://www.mattek.com/mattek-product/epiderm/>.
- [17] M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surrallés, A. Vanhauwaert e A. Wakata, «Report from the in vitro micronucleus assay working group,» *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 540, n. 2, pp. 153-163, 2003.
- [18] K. Reisinger, D. Fieblinger, A. Heppenheimer, J. Kreutz, M. Liebsch, A. Luch, K. Maul, A. Poth, P. Strauch, E. Dony, M. Schultz, T. Wolf e R. Pirow, «The hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN): validation data set,» *Mutagenesis*, vol. 37, n. 2, pp. 61-75, 2022.
- [19] Phenion, «Phenion competence in skin physiology,» [Online]. Available: <https://www.phenion.com/products/reconstructed-tissues>.
- [20] V. McKelvey-Martin, M. Green, P. Schmeizer, B. Pool-Zobel, M. De Méo e A. Collins, «The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review,» *Mutagenesis*, vol. 288, n. 1, pp. 47-63, 1993.
- [21] A. Hartmann, E. Agurell, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, V. Thybaud e R. R. Tice, «Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop,» *Mutagenesis*, vol. 18, n. 1, pp. 45-51, 2003.
- [22] N. Jiang, S. Naz, Y. Ma, Q. Ullah, M. Z. Khan, J. Wang, X. Lu, D.-Z. Luosang, S. Tabassum, A. M. M. Chatha e W.-D. Basang, «An Overview of Comet Assay Application for Detecting DNA Damage in Aquatic Animals,» *Agriculture*, vol. 13, n. 3, p. 623, 2023.
- [23] J. Li, J. Chen, H. Bai, H. Wang, S. Hao, Y. Ding, B. Peng, J. Zhang, L. Li e W. Huang, «An Overview of Organ-on-Chips Based on Deep Learning,» *Research: a science partner journal*, 2022.
- [24] S. Eberlin, G. Facchini, G. H. da Silva, S. Eberlin, A. Rodrigues Bragatto, A. L. Tabarini Alves Pinheiro e A. da Silva Pinheiro, «Ex vivo human skin: an alternative test system for skin irritation and corrosion assays,» *Alternatives to Laboratory Animals*, vol. 49(4), pp. 137-146, 2021.

DRENA&DEPURA NUOVA LINFA PER IL TUO BENESSERE.



I succhi concentrati di Ribes rosso, Mango, Dattero e gli estratti di Poria, Verga d'oro, Schisandra e Karkadè presenti in drena&depura, agendo in profondità già a livello cellulare, favoriscono il ricambio dei liquidi e il loro drenaggio, liberano dalle scorie e regalano benessere e leggerezza a tutto l'organismo. E quando il corpo è più leggero anche la vita lo diventa!

Scopri lo qui



info@fitomedical.com - www.fitomedical.com



FITOMEDICAL
star bene è naturale