

Ettore Anna

"Tecnologie e biotecnologie di possibile impiego in cosmetica"

Riassunto

Le biotecnologie hanno un elevato potenziale applicativo in cosmetica soprattutto per quel che riguarda: la messa a punto, ottimizzazione e validazione di sistemi in vitro per la valutazione della funzionalità e tossicità del cosmetico.

I prodotti cosmetici, come d'altro canto avviene anche in campo farmaceutico, vengono testati in prima istanza sugli animali, i cosiddetti test in vivo e poi sull'uomo prima di essere immessi sul mercato. Dal 30 giugno del 2002 sarà proibito l'uso degli animali per testare prodotti cosmetici. C'è quindi molto interesse in questo settore per la messa a punto, o per l'ottimizzazione di test in vitro che siano predittivi e che diano risultati correlabili con quelli ottenuti in vivo sull'animale e sull'uomo.

Quando la cellula subisce uno stimolo da parte di un agente endogeno od esogeno, può reagire: a) mettendo in atto strategie di difesa che possano in qualche modo modificare l'omeostasi cellulare per sopravvivere alla sollecitazione subita (es. ipertrofia, iperplasia); b) produrre le cosiddette chemiochine che sono poi le sostanze endogene responsabili della risposta infiammatoria; c) se il danno è irreparabile la cellula può andare incontro a necrosi; d) la cellula può anche decidere di suicidarsi.

Ci siamo proposti di valutare la risposta tossicologica o meno ad un ingrediente cosmetico attraverso l'induzione in vitro su colture cellulari della necrosi o dell'apoptosi.

L'apoptosi è senza dubbio uno degli argomenti più affascinanti scoperti sinora, non solo, ma è e può anche essere una risposta al danno cellulare.

Il nostro scopo è quello di avvalerci dello studio della morte cellulare programmata per il monitoraggio di ingredienti cosmetici e per comprendere come tali ingredienti possono influenzare l'omeostasi cellulare e con quali meccanismi fino ad arrivare ad una proposta di metodologie "in vitro" alternative, ripetibili, affidabili per valutare la potenziale tossicità sia dell'ingrediente che del prodotto cosmetico.

Abbiamo scelto come materie prime da testare alcuni conservanti usati non solo dall'industria cosmetica, ma anche dall'industria farmaceutica ed a livello industriale nei prodotti per la detergenza.

La letteratura offre una vasta panoramica di test microbiologici e articoli riguardanti indagini dermatologiche tipo patch test per evidenziare il potenziale allergenico ed irritante di tali sostanze, ma scarse sono le fonti su ricerche condotte su altri modelli sperimentali quali le colture cellulari.

I conservanti più studiati e più usati dall'industria cosmetica, ma anche quelli più facilmente solubili nel medium di coltura, scelti per questa ricerca sono l'imidazolidinilurea, il fenossietanolo, una miscela composta da metilcloroisotiazolinone e metilisotiazolinone (meglio conosciuta come Kathon).

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule di linea in sospensione di derivazione promielocitica, denominate HL60, che rappresentano il ceppo con cui molti ricercatori si sono cimentati per i vari studi condotti sui fenomeni correlati con l'apoptosi. Durante i nostri esperimenti abbiamo usato tempi di contatto brevi con concentrazioni scalari dei tre conservanti. In un primo screening abbiamo usato come test di citotossicità il trypan blue e l'MTT in un arco di tempo da 0 a 72 ore.

L'apoptosi è stata evidenziata qualitativamente attraverso la presenza del classico "ladder" del DNA frammentato su gel di agarosio.

Quantitativamente l'apoptosi è stata valutata con l'analisi del contenuto di DNA con metodiche citofluorimetriche.

Tutti i dati raccolti nel corso del primo anno confermano che questi tre conservanti esaminati IMU, Fenossietanolo e Kathon possono indurre due distinte tipologie di morte cellulare: la necrosi e l'apoptosi. In particolare, la necrosi si verifica ad alte concentrazioni mentre l'apoptosi si manifesta a basse concentrazioni.

Nel corso del secondo anno di dottorato abbiamo valutato parametri biochimici più fini che sono implicati nel suicidio cellulare quali l'esposizione della fosfatidilserina, l'espressione di Fas, la diminuzione del potenziale transmembrana sempre sulle HL60.

In contemporanea abbiamo effettuato le stesse analisi quali-quantitative anche su cellule normali, i linfomonociti di sangue periferico, su cui è possibile eventualmente anche valutare l'espressione di citochine pro-infiammatorie.

I dati in nostro possesso confermano quanto già osservato sulle HL60, ovvero che necrosi o apoptosi sono una conseguenza del danno cellulare dose-risposta dipendente.

Attualmente ci stiamo occupando di verificare se i dati ottenuti con le HL60 e i linfomonociti di sangue periferico si possono confrontare con la risposta dei cheratinociti umani e immortalizzati che rappresentano sicuramente il modello migliore per valutare la possibile risposta della pelle al cosmetico.