

**Valutazione della citotossicità di un prodotto
mediante un saggio *in vitro* su colture cellulari di melanociti**

***In vitro evaluation of the cytotoxicity of a product
through an assay on melanocytes cell cultures***

FB DERMO SRL A SOCIO UNICO

MIX ATTIVI SCHIARENTI

Protocollo n° / *Report no.* **1702G25V**

<p>Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Eliana REGOLA, Riccardo VICINI, Alice BUZZELLA</p> <p>Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano) Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.</p> <p>Responsabile della Sperimentazione <i>People in charge for the Experimentation</i> Dr.ssa Eliana REGOLA Laurea in Scienze Biologiche (Università degli Studi di Genova); Dottorato di Ricerca in Medicina e Biologia Sperimentale - indirizzo Biochimica (Università degli Studi di Genova); Specializzata in Microbiologia e Virologia - indirizzo Tecnico (Università degli Studi di Genova) In vitro Tests Responsible BIO BASIC EUROPE S.r.l.</p> <p>Sperimentatore e Responsabile della Relazione <i>Experimenter and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia) In vitro Tests Division BIO BASIC EUROPE S.r.l.</p>	<p>INDICE INDEX</p> <p>Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3</p> <p>Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4</p> <p>Scopo <i>Aim</i> pag. 6</p> <p>Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 7</p> <p>Risultati <i>Results</i> pag. 9</p> <p>Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 13</p> <p>Bibliografia <i>References</i> pag. 14</p>
---	--

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
 Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
 In base alla nostra esperienza si consiglia di verificarne ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

*All rights are reserved, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
 No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
 Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.*

RIASSUNTO

Il saggio di citotossicità è stato eseguito su colture di melanociti B16 trattate con concentrazioni scalari (diluizioni 1:2 a partire da 5.0 mg/ml) del prodotto da testare. Come controllo positivo è stato utilizzato il sodio dodecil solfato (SDS), una sostanza dai noti effetti citotossici, mentre come riferimento negativo è stato impiegato uno standard interno con $IC_{50} > 0.5$ mg/ml (sostanza non citotossica).

I risultati ottenuti non hanno mostrato diminuzione della vitalità cellulare alle concentrazioni di prodotto testate, pertanto **$IC_{50} > 5.0$ mg/ml**. Un valore di $IC_{50} > 0.5$ mg/ml indica la **totale assenza di effetti citotossici del prodotto testato su colture di melanociti**.

ABSTRACT

The cytotoxicity assay was performed on B16 melanocytes cell cultures treated with scalar concentrations (1:2 dilutions from 5.0 mg/ml) of tested product. As positive control we used sodium dodecyl sulphate (SDS), a substance with well known cytotoxic effects, while the negative reference was an internal standard with $IC_{50} > 0.5$ mg/ml (no cytotoxic substance).

*We didn't observe any decrease in cell viability at tested concentrations, therefore **$IC_{50} > 5.0$ mg/ml**. An IC_{50} value > 0.5 mg/ml shows the **absence of cytotoxic effects of tested product on melanocytes cell culture**.*



INTRODUZIONE

Il Regolamento Europeo 1223/2009 vieta la sperimentazione su animali sia dei prodotti cosmetici finiti che degli ingredienti (o combinazioni di ingredienti) destinati ad essere contenuti nei prodotti cosmetici. Questa restrizione ha favorito lo sviluppo di metodi alternativi *in vitro* che, a differenza del modello animale, consentono di eseguire l'esperimento senza limiti numerici ed in condizioni di maggior controllo e standardizzazione, nonché di applicare sistemi di misura quantitativi e oggettivi.

La citotossicità (cioè la proprietà di essere tossici per le cellule) è il risultato di una interferenza di una sostanza con strutture e/o proprietà essenziali per la sopravvivenza, la proliferazione e/o le funzioni delle cellule stesse. Questi effetti possono coinvolgere per esempio l'integrità delle membrane e del citoscheletro, il metabolismo, la sintesi, la degradazione o il rilascio di costituenti cellulari, la regolazione ionica e la divisione cellulare. Si possono distinguere tre diversi tipi di citotossicità: (1) citotossicità basale (o generale) che coinvolge una o più delle strutture o processi sopramenzionati e colpisce indistintamente tutte le cellule; (2) citotossicità selettiva (o cellulo-specifica) che si ha quando alcune cellule differenziate sono più sensibili rispetto ad altre all'effetto di una specifica sostanza tossica; (3) tossicità che colpisce alcune funzioni cellulari specifiche e che potrebbe non essere critica per la sopravvivenza della singola cellula ma danneggiare tessuti ed organismo (per esempio questo tipo di tossicità potrebbe colpire la comunicazione tra cellule).

Sono stati sviluppati fino ad oggi numerosi test di citotossicità *in vitro* che utilizzano diverse linee cellulari e che misurano differenti endpoint. Il test MTT qui proposto è un saggio di riduzione utilizzato per determinare il livello di attività metabolica nelle cellule eucariotiche. Si tratta di uno dei test di citotossicità più diffusi grazie alla sua semplicità, accuratezza e riproducibilità. La base chimica del saggio è la riduzione dell'MTT, un composto tetrazolico [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. MTT è una sostanza gialla che forma in seguito a riduzione un sale di formazano color viola. Il processo avviene principalmente nel citoplasma e secondariamente nei mitocondri e a livello della membrana plasmatica. L'attività delle reduttasi che catalizzano la reazione è altamente dipendente dalla concentrazione di NADH e di NADPH intracellulari, i cui livelli sono associati alla disponibilità di glucosio extracellulare. Anche la succinato deidrogenasi mitocondriale ed il citocromo C prendono parte alla riduzione di MTT. Pertanto qualsiasi sostanza o trattamento che interferisca con questi enzimi o con la glicolisi influenzerebbe la riduzione dell'MTT e di conseguenza altererebbe i risultati della conta cellulare. Come conseguenza di questi processi metabolici di riduzione si vengono quindi a formare nel giro di poche ore dei cristalli viola scuro di formazano. Tali cristalli possono essere solubilizzati in differenti solventi organici, principalmente alcoli. Un aumento o una riduzione nel numero di cellule determinerà un'analoga variazione nella quantità di formazano formatasi, dando così una indicazione del grado di citotossicità del prodotto testato.



INTRODUCTION

Cosmetic legislation in Europe prohibits the performance of animal testing for both finished products and ingredients or combinations of ingredients. This restriction has encouraged the development of alternative in vitro methods which, unlike experimentations on animals, are more controlled and standardized, and make it possible to use quantitative systems without any limit of number.

The cytotoxicity (i.e. the quality of being toxic to cells) is the result of an interference of a substance with structures and/or properties essential for cell survival, proliferation and/or function. These effects can involve, for example, the integrity of membranes and the cytoskeleton, metabolism, the synthesis and degradation or release of cellular constituents or products, ion regulation and cell division. It is useful to distinguish between three types of cytotoxicity: (1) basal (or general) cytotoxicity involves one or more of the above-mentioned structures or processes, when all of the cell types studied show similar sensitivities; (2) selective (or cell-specific) cytotoxicity occurs when some types of differentiated cells are more sensitive to the effects of a particular toxicant than others; (3) cell-specific function toxicity occurs when the toxicant affects structures or processes that may not be critical for the affected cells themselves, but which are critical for the organism as a whole (for example, such toxicity can involve effects on cell-to-cell communication).

A large number of in vitro cytotoxicity tests have been developed, employing a variety of cell lines and endpoint measurements. The MTT here proposed is a reduction assay used to determine the level of metabolic activity in eukaryotic cells. It is one of the most common cytotoxicity tests because it is simple, accurate and gives reproducible results. The chemical basis of the assay is the reduction of the MTT, a type of tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. MTT is a slightly yellow substance, which forms a purple formazan upon reduction. The process primarily takes place in the cytoplasm, and to a lesser extent in the mitochondria and cell membrane. The reductase activity is highly dependent on the concentration of intracellular NADH and NADPH and the abundance of these nucleotide cofactors is associated with the availability of extracellular glucose. The mitochondrial succinate dehydrogenase and cytochrome c take part in MTT reduction as well. Therefore, any substance or treatment that interferes with these enzymes or with glycolysis, changes the rate of MTT reduction, and consequently alters the result of cell counting. As a consequence of these metabolic processes, dark purple needle-like formazan crystals appear, radiating from the cells in a few hours. Formazan crystals can be solubilized by mixing thoroughly in different organic solvents, mainly alcohols. An increase or decrease in cell number results in a concomitant change in the amount of formazan formed, indicating the degree of cytotoxicity caused by the tested material.

Valutazione della citotossicità di un prodotto mediante un saggio *in vitro*
su colture cellulari di melanociti

*In vitro evaluation of the cytotoxicity of a product through an assay
on melanocytes cell cultures*



Protocollo n° / *Record no.* 1702G25V

FB DERMO SRL A SOCIO UNICO

SCOPO

Il saggio MTT è stato condotto allo scopo di valutare il potenziale effetto citotossico di un prodotto su una linea cellulare di melanociti B16.

AIM

The MTT test was carried out in order to evaluate the potential cytotoxic effect of a product on B16 melanocytes cell line.



MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari

Il test è stato condotto su cellule di melanoma murino (B16), una linea ben conosciuta e comunemente utilizzata negli studi di melanogenesi. Le cellule sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) contenente 2 mM glutamina, 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1% di antibiotici (penicillina e streptomycina) ed incubate in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

Cell line and culture conditions

The test was performed on mouse melanoma cells (B16), a well known cell line commonly used in the studies of melanogenesis. Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Campione testato / *Tested sample*

MIX ATTIVI SCHIARENTI

Preparazione dei campioni

Il campione in esame è stato sciolto e quindi diluito in terreno di crescita fino alle concentrazioni finali desiderate comprese tra 0.0391 e 5.0 mg/ml. Il riferimento negativo (standard interno) è stato testato alle concentrazioni comprese tra 0.0391 e 5.0 mg/ml, mentre il controllo positivo (SDS) è stato testato alle concentrazioni comprese tra 0.00313 e 0.4 mg/ml.

Samples preparation

The tested sample was dissolved and then diluted in culture medium to the desired final concentrations between 0.0391 and 5.0 mg/ml. The negative reference (internal standard) was tested at concentrations between 0.0391 and 5.0 mg/ml, while the positive control (SDS) was tested at concentrations between 0.00313 and 0.4 mg/ml.

Esecuzione del test

Un adeguato numero di cellule è stato seminato in piastre da 96 pozzetti. Una volta raggiunto un monostrato semiconfluente, le cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni del campione testato e degli standard ed incubate per 24 ore a condizioni standard. Cellule non trattate e mantenute in terreno di coltura rappresentano i controlli negativi. Dopo 24 ore di contatto le piastre sono state esaminate al microscopio a contrasto di fase, il terreno è stato delicatamente rimosso da ciascun pozzetto, le cellule sono state quindi trattate con MTT (1 mg/ml) ed incubate per 3 ore a condizioni standard. Al termine di questo periodo la soluzione di MTT è stata eliminata ed in ciascuno pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di isopropanolo per sciogliere i cristalli di formazano formati. L'assorbanza (densità ottica, OD) è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Test execution

A suitable number of cells was seeded in 96 wells plates. Once a half-confluent monolayer has been reached, the cells were treated with the different dilutions of the tested sample or of the standards and incubated for 24 hours at standard culture conditions. Not treated cells maintained in culture medium are negative controls. After a 24 hours-period contact, the plates were examined under a phase contrast microscope, the culture medium was carefully removed from each well and the cells were treated with MTT (1 mg/ml) and incubated for 3 hours at standard culture conditions. After this period, the solution of MTT was discarded and 100 µl of isopropanol were added in each well in order to dissolve the formazan crystals. The absorbance (optical density, OD) was determined spectrophotometrically at 540 nm wavelength.

RISULTATI

RESULTS

Interpretazione dei risultati

L'inibizione della vitalità cellulare ad ogni concentrazione testata è stata espressa come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate) secondo la seguente formula

$$\text{Inibizione \%} = 100 - [(OD_x / OD_{NC}) \times 100]$$

OD_x Densità ottica media delle cellule trattate con il campione in esame alla concentrazione X
OD_{NC} Densità ottica media dei controlli negativi

I valori così calcolati sono stati messi in grafico contro le concentrazioni stesse. Le curve concentrazione-risposta ottenute permettono di estrapolare sia per i campioni che per gli standard il valore di IC50 teorico. **Il valore IC50 indica la concentrazione del composto testato necessaria per inibire la vitalità cellulare del 50%. IC50 è un parametro che consente di valutare la citotossicità di un composto secondo lo schema seguente:**

Interpretation of results

The inhibition of cell viability at each tested concentration is expressed as percentage of negative control (not treated cells) according to the following formula

$$\text{Inhibition \%} = 100 - [(OD_x / OD_{NC}) \times 100]$$

OD_x *Mean optical density of cells treated with test sample at X concentration*
OD_{NC} *Mean optical density of negative control*

The calculated values are plotted against the concentrations. The concentration-response curves for both standards and tested product allow to extrapolate the theoretical IC50 value (Inhibiting Concentration 50). The IC50 value is the concentration of test compound which inhibits cell growth/survival by 50%. IC50 is a parameter that allows to evaluate the cytotoxicity of a compound according to the following scheme:

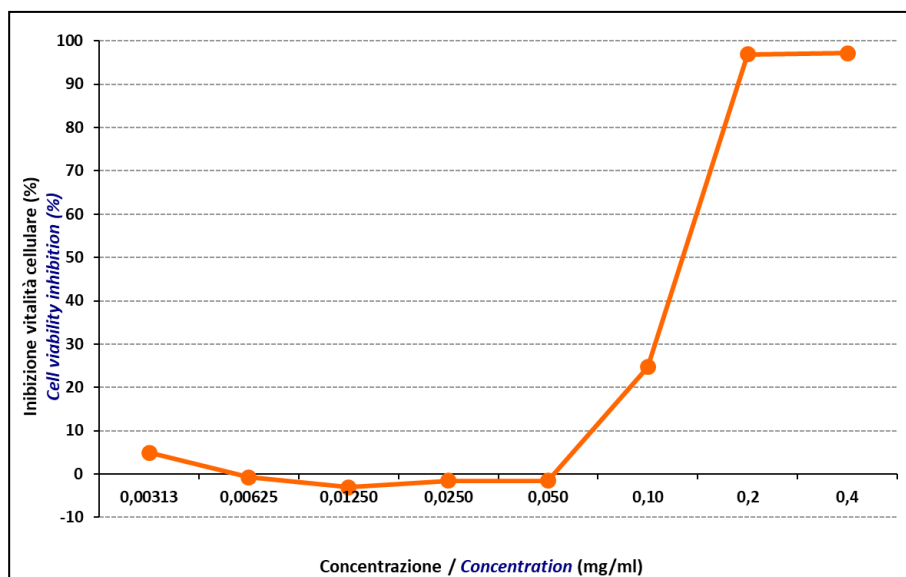
Valore di IC50 <i>IC50 value</i>	Interpretazione <i>Interpretation</i>
IC50 ≤ 0.5 mg/ml	Effetto citotossico <i>Cytotoxic effect</i>
IC50 > 0.5 mg/ml	Assenza di effetto citotossico <i>Absence of cytotoxic effect</i>

Curva concentrazione-risposta di SDS (controllo positivo)

Concentration-response curve for SDS (positive control)

Concentrazione (mg/ml) <i>Concentration (mg/ml)</i>	Inibizione della vitalità cellulare (%) <i>Inhibition of cell viability (%)</i>
0.4	97.17
0.2	96.93
0.1	24.69
0.05	Assenza di inibizione / <i>No inhibition*</i>
0.025	
0.0125	
0.00625	
0.00313	
IC50 = 0.125 mg/ml	

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / *Decrease of cells viability <10% = insignificant*



Le concentrazioni testate comprese tra 0.1 e 0.4 mg/ml hanno diminuito significativamente la vitalità cellulare. Un valore di $IC_{50} \leq 0.5$ mg/ml indica un effetto citotossico.

Tested concentrations between 0.1 and 0.4 mg/ml have significantly decreased cells viability. An IC_{50} value ≤ 0.5 mg/ml means cytotoxic effect.

Curva concentrazione-risposta dello standard negativo *Concentration-response curve for negative standard*

Concentrazione (mg/ml) <i>Concentration (mg/ml)</i>	Inibizione della vitalità cellulare (%) <i>Inhibition of cell viability (%)</i>
5.0	Assenza di inibizione / <i>No inhibition*</i>
2.5	
1.25	
0.625	
0.313	
0.156	
0.0781	
0.0391	

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / *Decrease of cells viability <10% = insignificant*

Nessuna delle concentrazioni testate ha diminuito significativamente la vitalità cellulare. Un valore di IC50 > 0.5 mg/ml indica assenza di effetto citotossico.

None of the tested concentrations has significantly decreased cells viability. An IC50 value > 0.5 mg/ml means absence of cytotoxic effect.

Curva concentrazione-risposta di / *Concentration-response curve for* MIX ATTIVI SCHIARENTI

Concentrazione (mg/ml) <i>Concentration (mg/ml)</i>	Inibizione della vitalità cellulare (%) <i>Inhibition of cell viability (%)</i>
5.0	Assenza di inibizione / <i>No inhibition*</i>
2.5	
1.25	
0.625	
0.313	
0.156	
0.0781	
0.0391	

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / *Decrease of cells viability <10% = insignificant*

Le concentrazioni testate non hanno diminuito la vitalità cellulare. Un valore di IC50 > 0.5 mg/ml indica assenza di effetto citotossico.

Tested concentrations didn't significantly decrease cells viability. An IC50 value > 0.5 mg/ml means absence of cytotoxic effect.



CONCLUSIONI

Il campione denominato
MIX ATTIVI SCHIARENTI

Non diminuisce la vitalità cellulare alle concentrazioni testate su melanociti *in vitro*.

Il valore di **IC50** è pertanto **> 5.0 mg/ml**.

Un valore di IC50 > 0.5 mg/ml indica assenza di effetto citotossico. Di conseguenza
il prodotto risulta potenzialmente privo di effetti citotossici su melanociti *in vitro*

CONCLUSIONS

The sample called
MIX ATTIVI SCHIARENTI

*Has proved not to decrease cell viability at tested concentrations on melanocytes in vitro. As a consequence
the **IC50** value is **> 5.0 mg/ml** An IC50 value > 0.5 mg/ml means absence of cytotoxic effect.
Therefore **this product has not cytotoxic effects on melanocytes in vitro***

Controllo Qualità / *Quality Control*

Dr. Claudio ANGELINETTA



BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with tmre, jc-1, and nao mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 2002; 47(4): 236–242

Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4: 14–19

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (mtt): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in mtt reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2):474–482

Denizot F, Lang RJ. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol Methods* 1986; 89(2): 271-7

Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* 1990; 131(2): 165-72

Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94 (1-2): 57-63

Kupcsik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 13-9

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55–63

Seibert H, Balls M, Fentem JH, Bianchi V, Clothier RH, Dierickx PJ, Ekwall B, Garle MJ, Gumez-Lechun MJ, Gribaldo L, Iden M, Kiebsch M, Rasmussen E, Roguet R, Shrivastava R, Walum E. Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. The report and recommendations of ECVAM workshop 16. *ATLA* 1996; 24: 499-510.

Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. iii. points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 1963; 77: 383–393

Spinner DM. MTT growth assays in ovarian cancer. *Methods Mol Med* 2001; 39: 175-7