

METODI *IN VITRO* RICHIESTI PER LA CLASSIFICAZIONE H4 E H8 DEI RIFIUTI

Laura Turco

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Tutta la normativa più recente in merito alla tutela della salute umana fa riferimento ai metodi alternativi alla sperimentazione animale come metodi “da preferire” rispetto a quelli classici che prevedono l’utilizzo di animali da laboratorio ogniqualvolta sia necessario eseguire test tossicologici. Oltre al Regolamento (CE) 1223/2009 per i cosmetici, che prevede il divieto degli esperimenti sugli animali nelle prove tossicologiche per la valutazione di sicurezza di ingredienti e prodotti finiti a partire da luglio 2013, il Regolamento (CE) 1107/2009 così come il n.528/2012 relativi all’immissione sul mercato e all’utilizzo rispettivamente di prodotti fitosanitari e di biocidi, e il Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH dall’inglese *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*) costituiscono esempi rilevanti della richiesta di utilizzare ove possibile metodologie alternative anche in ambito regolatorio. Il fatto che si usi il termine “preferire” non implica discrezionalità nella scelta del metodo ma, al contrario, sono definiti metodi alternativi per specifici campi di applicazione per i quali ognuno di essi è stato caratterizzato per la valenza predittiva dell’*end-point* tossicologico che essi sono chiamati a coprire. Ciascun metodo alternativo può essere utilizzato come test tal quale (*stand-alone test*) o all’interno di una strategia integrata di più test. La pertinenza del test da eseguire e la accettazione regolatoria è data dalla disponibilità o meno della relativa linea guida pubblicata dall’*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD o in lingua italiana OCSE, Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico). Le Linee Guida OECD (*Test Guideline*, TG) sono reperibili e scaricabili gratuitamente in formato pdf dal sito web dell’OECD (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>). Nel caso dei cosmetici, a causa del divieto totale della sperimentazione animale, qualora la linea guida OECD non fosse ancora disponibile, è accettabile utilizzare protocolli approvati dallo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (EURL-ECVAM). Tutte le informazioni relative ai test *in vitro* in corso di validazione sono consultabili al sito web: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>. OECD ed ECVAM costituiscono i soli organismi ufficiali che garantiscono al contempo sia la validità scientifica dei metodi alternativi che la loro robustezza in termini di capacità predittiva dei possibili effetti avversi sull’uomo. Questi metodi vengono indicati come VRM (*Validated Reference Method*).

Spesso viene fatta confusione tra metodi alternativi (ovviamente da intendersi sempre come alternativi alla sperimentazione animale ma per semplicità spesso il termine comparativo viene omesso) e metodi *in vitro* e si ignora che questi ultimi sono compresi nei primi che rappresentano una più ampia categoria. Per metodi alternativi, infatti, si intendono non solo tutti quei metodi che sostituiscono *in toto* l’utilizzo degli animali (metodi di *Replacement* tra cui sia i metodi *in vitro* che metodi non sperimentali ed eventuali metodi *in silico*) ma anche quelli i cui protocolli sono stati affinati e ottimizzati in modo tale da prevedere un numero inferiore di animali rispetto al protocollo classico (metodi di *Reduction*) o che minimizzano la sofferenza degli animali impiegati (metodi di *Refinement*).

La classificazione di un prodotto (inclusi i rifiuti) può essere condotta anche utilizzando metodologie non sperimentali, che fanno parte quindi del concetto più ampio di ‘metodo alternativo’ tra cui i) l’applicazione di Principi Ponte (*bridging principles*) basati sulla “somiglianza” nella composizione del prodotto o della miscela (a cui è assimilabile un rifiuto) da classificare con una miscela a composizione nota già classificata in base a risultati di saggi sperimentali (applicazione del principio del *read-across*); ii) il metodo di calcolo, basato sulla composizione quali-quantitativa delle miscele, applicando le formule di calcolo per gli effetti cosiddetti “additivi” (es. irritazione, tossicità) e i limiti di concentrazione generici o specifici negli altri casi.

La mancata disponibilità, almeno per ora, di metodi *in vitro* per i vari *end-point* tossicologici è dovuta alla difficoltà nel riprodurre *in vitro*, con sistemi sperimentali estremamente semplificati rispetto alla complessità dell’organismo, funzioni e strutture in origine più complesse, che risentono delle influenze delle interconnesse comunicazioni fisiologiche del sistema cellula-tessuto-organo-organismo. I metodi *in vitro* propriamente detti ad oggi disponibili quindi sono quelli in grado di riprodurre i processi tossicologici di tipo topico proprio perché si tratta di processi che si instaurano localmente al sito di esposizione/applicazione del tossico e che sono svincolati dai processi di assorbimento, distribuzione e metabolismo da parte dell’organismo.

L’allegato III della Direttiva 2008/98/CE (nota come Direttiva sui rifiuti) attribuisce i codici di pericolo H4 e H8 rispettivamente ai rifiuti irritanti e corrosivi; per la classificazione dei rifiuti relativa a queste due caratteristiche l’Allegato si riferisce al sistema di calcolo, ma introduce la possibilità di saggiare sperimentalmente la miscela e di classificarla in base ai risultati ottenuti. È facile capire che, se si sollevano problemi etici nel saggiare su animali da laboratorio prodotti da immettere sul mercato ai fini di valutarne la sicurezza d’uso per i consumatori, gli stessi problemi siano a maggior ragione validi in ambito di classificazione dei rifiuti per il loro smaltimento.

Irritazione e corrosione sono gli effetti topici da contatto per i quali si sono sviluppati, più facilmente che per altri processi di tossicità, modelli *in vitro* con ottime capacità predittive; per tali *end-point* di tossicità sono state adottate e pubblicate le relative linee guida da parte dell’OECD con metodi di totale sostituzione dell’animale.

Quando da un generico processo si generano due categorie di rifiuti che sottendono a due codici CER speculari uno pericoloso e uno non pericoloso, il detentore del rifiuto potrà adottare il codice non pericoloso solo verificando concretamente la non pericolosità. Tale verifica si effettua analiticamente individuando le sostanze che determinano le caratteristiche di pericolo; una volta individuate le sostanze, si procede alla loro determinazione quantitativa per la verifica del rispetto o meno della loro concentrazione dei valori soglia imposti dall’articolo 2 della Decisione 2000/532/CE.

Per quanto riguarda le classi di pericolo H4 e H8, qualora un rifiuto complesso da analizzare, presenti valori molto bassi o molto alti di pH (nello specifico quando l’eluato prodotto per lisciviazione presenti valori di $\text{pH} \leq 2$ o $\geq 11,5$) si potrà concludere che il rifiuto è corrosivo per la classe H8 qualora anche la valutazione della riserva acido/alcalina porti alla stessa conclusione; se, al contrario, la riserva acido/alcalina non conferma la caratteristica di corrosività questa dovrà essere confermata con uno dei test *in vitro* validati e per i quali quindi esiste la relativa linea guida OECD. L’esclusione della caratteristica H8 non esclude la pericolosità: è infatti necessaria la verifica ulteriore della caratteristica di irritante (H4), poiché le caratteristiche di corrosivo e irritante possono caratterizzare (o meno) la stessa sostanza in dipendenza della sua concentrazione. In altre parole, sostanze corrosive possono risultare irritanti a basse concentrazioni; al contrario sostanze irritanti non necessariamente risultano corrosive ad alte concentrazioni. Il parere dell’Istituto Superiore di Sanità del 16/05/2008 richiesto in merito alla classificazione dei rifiuti pericolosi caratterizzati da pH estremo indica lo schema decisionale da adottare per la classificazione H4/H8 (Figura 1).

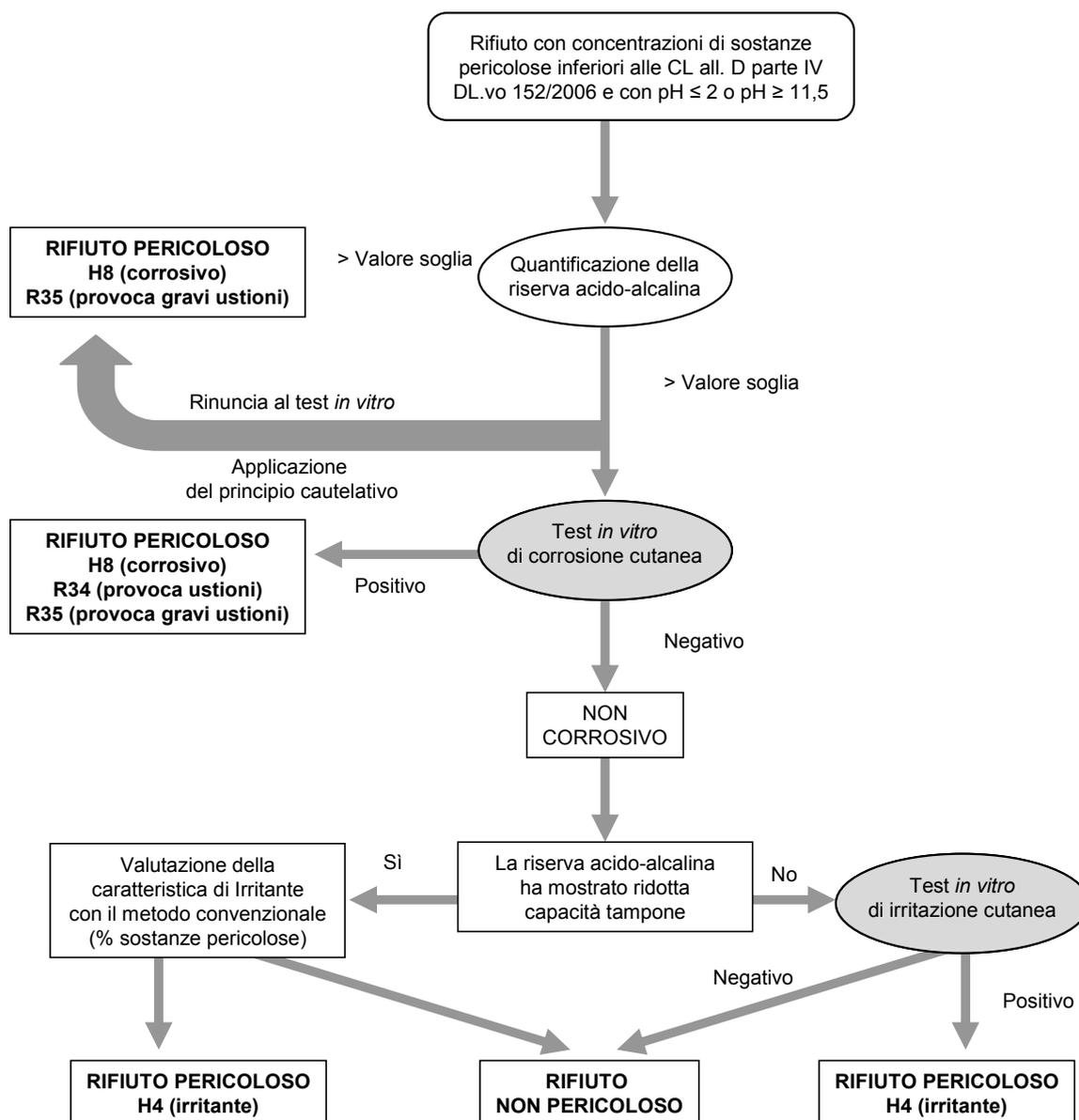


Figura 1. Schema decisionale per la classificazione H4 e H8 per i rifiuti caratterizzati da pH estremo (secondo il parere dell’ISS del 16/05/2008)

Questo processo decisionale per la classificazione H4 e H8 pone le metodologie *in vitro* per corrosione e irritazione come due sequenziali *step* decisionali che conducono alla classificazione di pericolosità del rifiuto e le relative frasi R in funzione della sensibilità del metodo stesso. L’allegato del Regolamento (CE) 440/2008 – successivamente modificato dal Regolamento (CE) 761/2009 – indica quali saggi *in vitro* è possibile utilizzare a questo scopo: B.40 (Saggio di resistenza elettrica transcutanea, corrispondente alla linea guida OECD: TG 430) e B.40bis (Saggio su modello di epidermide umana ricostituita, corrispondente alla linea guida OECD: TG 431) per la corrosione cutanea e B.46 (Saggio su modello di epidermide umana, corrispondente alla linea guida OECD: TG 439) per l’irritazione cutanea e specifica che

possono essere utilizzati solo saggi *in vitro* validati a livello internazionale da ECVAM e per i quali sia stato stabilito che la classificazione rientra tra gli scopi inerenti al campo di applicabilità di tali metodi.

Caratteristiche dei metodi *in vitro* utilizzati per la classificazione H4 e H8 dei rifiuti

OECD TG 430: saggio di resistenza elettrica transcutanea

Il saggio di resistenza elettrica transcutanea (*Transcutaneous Electrical Resistance*, TER) (OECD TG 430) è un metodo per la valutazione del potere corrosivo di sostanze e preparati non è un metodo di sostituzione del modello animale ma appartiene alle categorie *Reduction* e *Refinement* dei metodi alternativi in quanto l'impiego dell'animale non è totalmente escluso. Si tratta di un metodo *ex-vivo* poiché si utilizzano dischi di pelle di ratto come modello sperimentale. Tuttavia, essendo possibile ottenere più dischi dallo stesso ratto, il numero di animali sacrificati è notevolmente ridotto rispetto al metodo classico (*Reduction*); inoltre l'animale non subisce le possibili sofferenze causate dal trattamento poiché viene sacrificato nelle fasi preliminari all'esperimento (*Refinement*).

Per corrosione cutanea si intende un danno irreversibile della pelle che si manifesta con la necrosi dei tessuti che, dagli strati più esterni dell'epidermide, penetra fin nel derma. Il metodo TER (*Transcutaneous Electric Resistance*) si basa sul principio che il danno da corrosione si traduce nella perdita delle funzioni di barriera dello strato corneo, con conseguente caduta della resistenza elettrica che il disco di pelle, opportunamente alloggiato in un particolare apparato (Figura 2), oppone al passaggio di ioni tra due compartimenti che il disco stesso delimita come unico setto di separazione.

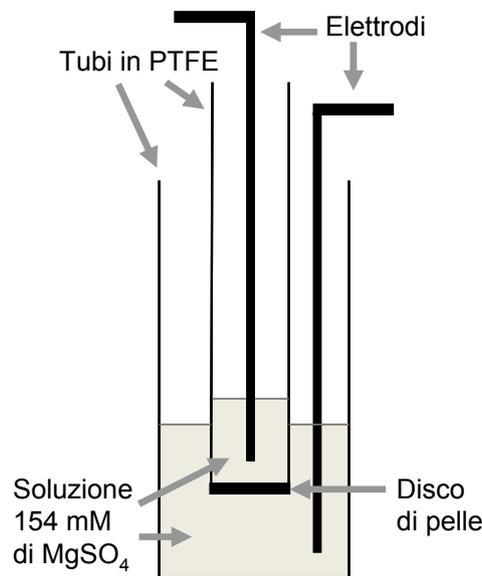


Figura 2. Apparato per l'esecuzione del saggio TER

Oltre la misurazione della resistenza elettrica tra i due comparti, il metodo prevede una successiva fase di colorazione del tessuto con sulforodamina B, come conferma dei risultati positivi, allo scopo di rendere biunivoco il legame tra la caduta della resistenza e la distruzione meccanica dello strato corneo della pelle ed escludere così la possibilità di falsi positivi. Il colorante usato, infatti, può penetrare nelle cellule degli strati cellulari sottostanti solo quando l'integrità dello strato corneo è compromessa. I falsi positivi sono possibili poiché alcune sostanze inducono un aumento della permeabilità agli ioni dello strato corneo senza comprometterne l'integrità (questo effetto si verifica ad esempio con alcuni detergenti e altri surfactanti). In presenza di un risultato positivo in termini di resistenza elettrica, la successiva fase di colorazione può essere evitata, qualora il danno tissutale sia macroscopicamente evidente.

Sulla specifica linea guida OECD sono riportate le sostanze di riferimento da utilizzare per assicurare la corretta performance del metodo (controlli positivo e negativo) e due liste di composti chiamati *Reference Chemicals* per la calibrazione del metodo, qualora vi siano deviazioni dal protocollo della Linea Guida (ad esempio un apparato con caratteristiche diverse) e *Proficiency Chemicals* per le prime prove che ogni laboratorio deve effettuare prima di utilizzare il metodo, allo scopo di dimostrare l'idoneità tecnica e strumentale necessaria. Sono anche stabiliti i 'criteri di accettabilità' sia del sistema test (valori di *cut-off* per il controllo della qualità del disco di pelle) che del metodo (valori relativi ai controlli positivo e negativo) nonché i riferimenti necessari per l'interpretazione dei risultati (valore di *cut-off* per la categorizzazione del composto).

Il test è applicabile ad un ampio spettro di classi di sostanze chimiche e di stati fisici quali liquidi, semi-solidi, solidi e cere. I liquidi possono essere sia acquosi che non acquosi e i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua; inoltre è espressamente specificato nella Linea Guida che il metodo è applicabile anche a miscele di sostanze, caratteristica questa che lo rende idoneo per la classificazione dei rifiuti. Le uniche categorie escluse dal campo di applicabilità sono le sostanze sotto forma di gas e aerosol.

Il metodo TER discrimina tra corrosivi e non corrosivi cutanei con una sensibilità del 94% (51 positivi/54 noti corrosivi) e una specificità del 71% (48 negativi/68 noti non-corrosivi). Una limitazione del metodo consiste nella impossibilità di sub-categorizzare le sostanze in corrosivi severi e moderati.

OECD TG 431: saggio di corrosione cutanea su epidermide umana ricostituita

Al contrario del precedente, questo saggio di corrosione cutanea su epidermide umana ricostituita (*Reconstructed Human Epidermis*, RHE) sostituisce completamente il modello sperimentale animale. In questo caso, infatti, il sistema biologico consiste in porzioni di pelle umana ricostituita *in vitro* a partire da cheratinociti non trasformati di origine umana.

Specifiche tecniche di coltura e l'impiego di particolari supporti per la crescita delle cellule consentono un differenziamento cellulare diversificato in più strati epiteliali ben organizzati (strati basali, spinoso e granulare) e strato corneo stratificato con lipidi lamellari intercellulari analoghi a quelli presenti *in vivo*, che nel loro insieme mimano *in vitro* le caratteristiche istologiche, morfologiche, biochimiche e fisiologiche della parte più esterna della pelle umana, l'epidermide. Le caratteristiche di questo modello sperimentale, comprovate da studi formali di validazione, lo rendono molto simile al modello umano, facendo coincidere l'*end-point* valutato con quello misurato; la corrosione cutanea, infatti, sottende alla penetrazione dell'agente corrosivo nello strato corneo per azione erosiva o per semplice diffusione e porta alla successiva azione citotossica sulle cellule degli strati inferiori. Questo è quanto avviene anche nel modello

sperimentale, e la vitalità delle cellule degli strati sottostanti, che costituiscono il target dell'azione del tossico, è il parametro che viene misurato.

Quattro modelli RHE validati sono disponibili in commercio, due dei quali (EpiSkin™-SM e EpiDerm™SCT-EPI-200) sono i modelli di riferimento che hanno superato l'intero processo di validazione (sono infatti chiamati VRM, *Validated Reference Methods*); gli altri due modelli, epiCS® e lo SkinEthic™RHE, sono invece stati sottoposti alla cosiddetta *PS-based validation*, cioè un percorso di validazione abbreviato reso possibile grazie all'impiego di una lista di sostanze di riferimento (*performance standard*) che consentono di confrontare direttamente le "performance" dei modelli già validati con quelle di nuovi modelli, molto simili ai primi ma non uguali, al fine di verificarne la rispondenza ai criteri di accettabilità del metodo.

Una serie di prove sono preliminari all'uso di questi modelli ogniqualvolta debba essere svolto uno studio di carattere regolatorio (quindi anche per ottenere risultati relativi alla classificazione di un rifiuto): rientrano nel Controllo di Qualità, che ha lo scopo di dimostrare che ogni batch di RHE utilizzato rientri in definiti criteri di accettabilità (generalmente indicati dal produttore/fornitore del modello). Questi controlli preliminari riguardano le condizioni generali e funzionali del sistema biologico, quali la robustezza dello strato corneo nella sua funzione di barriera, in termini cioè di resistenza alla eccessiva penetrazione di sostanze (mediante l'uso di marker specifici), la vitalità degli strati cellulari più interni, la morfologia (mediante un esame istologico) e la riproducibilità del metodo (valutata con l'uso dei cosiddetti *Proficiency chemicals* che appartengono a composti di riferimento sia corrosivi che non-corrosivi). Questi dati prodotti dall'utilizzatore di epidermide ricostituita vanno confrontati con i relativi valori forniti dal produttore, che accompagnano ogni batch di RHE.

Il metodo è applicabile a sostanze liquide, solide e semi-solide e a miscele di sostanze, hanno quindi un ampio spettro di applicabilità.

Il protocollo sperimentale, descritto in dettaglio nella linea guida OECD TG 431, prevede l'uniforme applicazione della sostanza da testare sulla superficie dell'epidermide con incubazioni a tempi diversi, specifici per ognuno dei quattro diversi modelli. La vitalità cellulare si misura con il test MTT, dove l'acronimo indica il composto bromuro di 3-(4,5-diMetilTiazol-2-il)-2,5-difenilTetrazolio; il test si basa sulla capacità delle cellule, di ridurre il colorante MTT (sostanza di colore giallo) attraverso l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi a formazano il quale ha colorazione blu/violacea (e diversa lunghezza d'onda di assorbimento). Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. L'enzima è attivo soltanto nelle cellule vive che abbiano mantenuto struttura e funzionalità integre; il test pertanto fornisce la quantificazione relativa della vitalità cellulare dei trattati rispetto ai controlli positivo e negativo come percentuale dei valori di Densità Ottica (*Optical Density*, OD) del colorante MTT estratto dalle cellule.

Per ogni metodo (specifico modello RHE e relativo protocollo) i risultati si confrontano con i valori specifici di *cut-off* che consentono di identificare e discriminare i corrosivi dai non-corrosivi.

La robustezza della capacità predittiva di questi modelli/metodi RHE permette la loro applicazione in ambito regolatorio ai fini di una classificazione che, ad esclusione del modello epiCS®, supera la semplice discriminazione tra corrosivi e non-corrosivi e permette una sub-categorizzazione dei corrosivi in categorie 1A, 1B e 1C così come definite dal sistema internazionale GHS (*Globally Harmonized System*) che ne indica la potenza relativa della capacità corrosiva. Poiché i diversi metodi non hanno la stessa accuratezza nella loro capacità predittiva di sub-categorizzazione, sarà l'autorità regolatoria dei diversi Paesi che deciderà la pertinenza dei test nella classificazione per ogni specifico ambito.

OECD TG 439: saggio di irritazione cutanea su epidermide umana ricostituita

In vivo il danno causato dall'irritazione si manifesta macroscopicamente sulla superficie della pelle con eritema ed edema, che rappresentano il risultato di una cascata di eventi. L'evento scatenante iniziale consiste nella penetrazione della sostanza attraverso lo strato corneo e nella successiva azione tossica sulle cellule sottostanti le quali possono rilasciare mediatori di infiammazione che agiscono sulle cellule del derma, in particolare, a livello dello stroma, sulle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Eritema ed edema sono infatti provocati dalla dilatazione e dalla aumentata permeabilità delle cellule endoteliali. Secondo il Sistema internazionale GHS l'irritazione cutanea è definita come danno reversibile della pelle provocato dal contatto con una sostanza per un tempo stabilito fino a quattro ore.

La tipologia dei modelli sperimentali sui quali si basa il saggio *in vitro* è la stessa (RHE) utilizzata per gli studi di corrosione cutanea descritti nella OECD TG 431, alla quale si applica un protocollo sperimentale diverso e specifico per l'irritazione (TG 439). Poiché i modelli RHE sono privi di vascolarizzazione, il metodo si basa sulla misura degli eventi iniziali del processo a cascata, cioè sul danno tissutale/cellulare: quindi l'*end-point* misurato è la vitalità cellulare (anche in questo caso mediante il test MTT).

Anche per l'irritazione cutanea sono quattro i modelli RHE validati e disponibili in commercio: EpiSkin™ (SM), EpiDerm™SIT (EPI-200), SkinEthic™RHE e LabCyte EPI-MODEL24 SIT.

I primi tre sono i metodi di riferimento VRM mentre l'ultimo è stato validato attraverso la lista dei *Proficiency Chemicals*. Anche con questo specifico protocollo per l'irritazione i modelli RHE possono essere utilizzati per testare sia sostanze singole che miscele e sia allo stato liquido che solido.

Il protocollo sperimentale prevede l'applicazione della sostanza da testare in modo uniforme sulla superficie dell'epidermide con tempi di incubazione che variano dai 15 ai 60 minuti e con temperatura tra 20 e 37°C. Tempi di esposizione e temperatura dipendono strettamente dal tipo di modello RHE e riflettono le specifiche caratteristiche intrinseche di ognuno di essi, soprattutto per quanto riguarda le proprietà di barriera che determinano la maggiore o minore resistenza alla penetrazione della sostanza. Successivamente al periodo di incubazione con la sostanza il test MTT fornisce la quantificazione delle cellule che hanno mantenuto le funzioni vitali. Secondo il sistema GHS il valore *cut-off* per discriminare gli irritanti dai non irritanti è 50%: una vitalità $\leq 50\%$ rileva una azione irritante da parte della sostanza test. Questo saggio *in vitro* è valido per la classificazione di sostanze irritanti per la Categoria 2 (forti irritanti) del sistema GHS. Nei Paesi che non adottano la sub-categorizzazione 3 (irritanti leggeri) può essere adottato per la classificazione dei cosiddetti *non-classified chemicals*.

Altri *end-point* di tossicità locale valutabili con metodi *in vitro* utilizzabili per la classificazione di miscele

Sotto l'aspetto della tossicità locale i modelli sviluppati consentono di riprodurre gli *end-point* di interesse con elevata robustezza in termini di rilevanza e, come descritto nei paragrafi precedenti, hanno un'ottima capacità predittiva per le valutazioni di corrosione e irritazione cutanea.

Per quanto riguarda corrosione e irritazione oculare non si dispone di modelli umani ricostituiti altrettanto validi, a causa della complessità della struttura dell'occhio. I modelli disponibili infatti prevedono l'utilizzo di occhi isolati di bovino (BCOP, *Bovine Corneal Opacity and Permeability Test*, linea guida OECD: TG 437) o di pollo (ICE, *Isolated Chicken Eye Test*, linea guida OECD: TG 438) e vengono considerati test di sostituzione poiché gli

espianti derivano da animali precedentemente destinati all'uso alimentare il cui sacrificio quindi non è legato a fini scientifici; questi metodi non possiedono una elevata sensibilità e sono applicabili soprattutto con una valenza di identificazione di corrosivi e severi irritanti, discriminandoli dai non irritanti: non sono infatti in grado di intercettare le sostanze con potenziali di irritazione debole o moderata. Inoltre per il metodo ICE si ha la limitazione aggiuntiva della impossibilità di applicazione con sostanze allo stato solido.

In fase di pre-validazione esistono modelli di cornea umana ricostituita ma si tratta di metodi altamente specifici e che non ricoprono tutti i possibili effetti di corrosione/irritazione a carico di strutture oculari diverse dalla cornea quali ad esempio congiuntiva e iride. Sono state proposte strategie integrate di test con lo stesso *end-point* basate sulla possibilità di ottenere una informazione completa dalle singole capacità predittive in termini di specificità e sensibilità dei diversi metodi.

Stesse limitazioni si incontrano anche per la sensibilizzazione cutanea, altro processo tossicologico di interesse per l'esposizione topica ma la cui evoluzione implica processi di tipo sistemico, almeno nelle fasi più avanzate. I metodi *in vitro* sviluppati finora, ancora in corso di (pre)validazione, sono metodi che, pur sfruttando reazioni precoci del processo a cascata, si limitano solo ad alcuni dei possibili *pathway* cui il processo di sensibilizzazione sottende. Si tratta cioè di metodi altamente specifici, la cui stretta specificità va a discapito della sensibilità del metodo stesso, poiché non sono in grado di rilevare sostanze sensibilizzanti che agiscono attraverso reazioni iniziali diverse da quelle sulle quali il singolo metodo si basa. Solo la completa conoscenza di tutti i possibili meccanismi che confluiscono poi nella sensibilizzazione come effetto finale potrà portare ad una batteria di test *in vitro* che sia in grado di escludere totalmente l'impiego del modello animale.

Al momento, nonostante lo sviluppo di strategie integrate di test *in vitro* abbia portato ad ampliare il campo di applicabilità di questi ultimi per una sorta di additività di informazione dovuta alla loro complementarietà d'uso, per gli altri *end-point* tossicologici di tipo sistemico è necessario ancora ricorrere al modello animale; è però possibile operare con una riduzione notevole del numero di animali proprio in virtù delle informazioni che i metodi *in vitro* consentono di ottenere in fasi preliminari. In ogni caso alla sostituzione completa si potrà arrivare solo con la conoscenza di tutto lo scenario di reazioni che sono alla base del meccanismo d'azione a livello cellulare e molecolare delle diverse reazioni tossiche e degli algoritmi che permetteranno di tradurre una concentrazione *in vitro* in una dose di esposizione *in vivo* (Adler *et al.*, 2011). Come obiettivo intermedio si pone l'applicazione delle strategie di *Reduction* e *Refinement* che sono possibili e attuabili da subito. Il percorso decisionale proposto dall'Istituto Superiore di Sanità per la classificazione H4 e H8, relativa alla nuova normativa sui rifiuti, è una testimonianza delle possibilità di applicazione pratica di questi modelli sperimentali in specifiche aree tossicologiche di competenza delle quali la tossicità locale costituisce un buon esempio.

Bibliografia

- Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou G, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfueller S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tahti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar JM. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol* 2011;85(5):367-485.

- Europa. Decisione 2000/532/CE del 3 maggio 2000, modificata dalla decisione 2001/573/CE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 203, 28.7.2001.
- Europa. Direttiva 2008/98/CE del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 313, 22 novembre 2008.
- Europa. Regolamento (CE) N. 440/2008 della Commissione del 30 maggio 2008 che istituisce i metodi di prova ai sensi del Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 142/1 del 31 maggio 2008.
- Europa. Regolamento (CE) N. 761/2009 della Commissione del 23 luglio 2009 recante modifica, ai fini dell'adeguamento al progresso tecnico, del Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 220/1 del 24 agosto 2009.
- Parere dell'Istituto Superiore di Sanità espresso in data 16/05/2008 avente per oggetto "DLvo 152/2006, parte IV – Richiesta parere sulla classificazione dei rifiuti pericolosi corrosivi e irritanti" (Protocollo n. 2423 AMPP/IA)