

The significance of mutagenic tests in toxicological investigations on cosmetics

NICOLA LOPRIENO, Full Professor of Genetics
Istituto di Biochimica, Biofisica e Genetica University of Pisa, Italy.
53, Via S. Maria, 56100 Pisa (Italy)

Received June 15, 1983

Key Words: mutagenic potential of chemicals, mutagenicity tests, genotoxicity predicting, potential carcinogenicity, mutagenicity studies, genotoxicological potential of hair dyes.

Synopsis

The initial studies by Ames represent the scientific basis for an inventory and evaluation of those tests which are most sensitive and useful in the prediction of short-term mutagenicity.

Due to the difficulty in interpreting the experimental studies, the IARC has established specific guidelines for the use of these tests in the evaluation of potential carcinogenicity of chemical substances based upon the consideration that changes which take place during the mutagenic process lead to structural chromosome aberrations.

The author then reviews the studies conducted on 2,4-Diaminoanisole and on 2,5-Diaminotoluene, concluding that the latter of the two compounds is without a doubt neither carcinogenic nor mutagenic.

According to the author, the genotoxic potential of cosmetic ingredients can be determined with certainty using a battery of such tests.

General Introduction

In 1975, B.N. Ames et coll. published the results of their mutagenicity studies developed on ingredients present in hair dyes and on commercially available hair dyes (1). For the first time it was therefore demonstrated that several aromatic amines employed in hair dyeing procedures were mutagenic on *Salmonella* tester strains; moreover, 158 out of 169 tested hair dyes formulations were found mutagenic by this method.

Due to the high correlation existing between carcinogenic and mutagenic processes, these data were considered of high relevance for the indication of

Riassunto

I primi studi condotti da Ames hanno rappresentato la base scientifica di partenza per la messa a punto di tests più sensibili, utili per la valutazione predittiva della mutagenicità a breve termine.

Data la difficoltà interpretativa degli studi sperimentali, l'agenzia IARC ha definito precisi concetti utili nell'uso dei tests per la valutazione del potenziale carcinogenetico delle sostanze chimiche, tenuto conto che i cambiamenti che hanno luogo nei processi mutagenici portano a mutazioni cromosomiche strutturali.

Dopo questa prima fase introduttiva, l'Autore passa in rassegna gli studi condotti sul 2,4-Diaminoanisolo e sul 2,5-Diaminotoluene concludendo che dei due composti il secondo è sicuramente non cancerogeno né mutagenico.

Secondo l'Autore è sicuramente possibile definire il potere genotossico degli ingredienti cosmetici attraverso la valutazione dei risultati ottenuti con una batteria di tests.

Introduzione

Nel 1975 B.N. Ames e coll. hanno pubblicato i risultati dei loro studi condotti sui componenti presenti nei coloranti per capelli, anche nei comuni prodotti di questo tipo del commercio (1).

Per la prima volta venne così dimostrato che numerose amine aromatiche usate nei coloranti per capelli erano mutagene per il ceppo di *Salmonella* usato nel test; inoltre 158 sulle 169 tinte per capelli, analizzate con questa metodica, risultarono dotate di potere mutageno.

A causa dell'alta correlazione che esiste tra i processi carcinogenetici e mu-

the possible existence of a long-term toxic effect by hair dying procedures for both general population and hairdressers.

For the first time compounds, such as indicated in Table 1 were suspected of being also carcinogens.

On the basis of a large use of hair dyes in the general population in all countries (f.l. in U.S.A. 40% of the female population; in Italy, 40 millions of applications sold in 1981) the Italian Ministry of Health took the decision to ban nine chemical ingredients present in the hair dye in 1976 (2) and one more in 1979 (3); these acts were merely suggested by the data published on mutagenicity studies performed by B.N. Ames (1) and confirmed by T. Sugimura (4).

On Table 2 the chemicals banned in Italy are reported.

tagenici, questi dati sono stati considerati altamente significativi per l'indicazione della possibile esistenza di effetti tossici a lungo termine causati dai coloranti per capelli, sia per la popolazione che per i parrucchieri.

Per la prima volta sostanze, come quelle indicate nella tabella 1, furono considerate anche carcinogenetiche.

Visto il largo uso delle tinture per capelli in ogni paese (negli U.S.A. il 40% della popolazione femminile, in Italia 40 milioni di dosi vendute nel 1981), il Ministro della Sanità italiano ha preso la decisione di bandire, nel 1976, nove sostanze chimiche contenute nei coloranti per capelli (2) e, nel 1979, ne ha bandita un'altra. Queste azioni vennero suggerite unicamente dai dati ottenuti da B.N. Ames (1), e confermati da T. Sugimura (4), nei loro studi sulla mutagenicità.

Nella tabella 2 sono riportate le sostanze chimiche che sono state bandite in Italia.

TABLE 1
Ingredients present in hair dyes found
mutagens by B.N. Ames nel 1975

2,4-Diaminoanisole
4-Nitro-o-phenylenediamine
2-Nitro-p-phenylenediamine
2,5-Diaminoanisole
2-Amino-5-nitrophenol
m-Phenylenediamine
o-Phenylenediamine
2-Amino-4-nitrophenol
2,5-Diaminotoluene

TABLE 2
Hair dye ingredients banned in Italy by
Ministry of Health in 1976 and 1979

1976	1979
2,4-Diaminoanisole	2,4-Diaminotoluene
4-Nitro-o-phenylenediamine	
2-Nitro-p-phenylenediamine	
2,5-Diaminoanisole	
2-Amino-5-nitrophenol	
m-Phenylenediamine	
o-Phenylenediamine	
2-Amino-4-nitrophenol	
2,5-Diaminotoluene	

Since 1975 the studies on the mutagenic potential of chemical substances in use in different sections of life activities and of general use in chemical industry have been developed both at a theoretical level as at an operational one. Several other methodologies have

Dal 1975 gli studi sul potenziale mutagenico delle sostanze chimiche in uso nei differenti campi delle attività sociali e di uso generale nell'industria chimica, sono stati condotti sia a livello teorico che operativo. Numerose altre metodiche sono state sviluppate su

been developed on single cell population (*in vitro* studies) and on intact organisms (*in vivo* studies) involving germ cells as well as somatic cells.

On such a scientific knowledge the sensitivity of the predictive value of mutagenicity short-term tests for the carcinogenicity has been increased.

An example of the evolution of the use of mutagenicity studies in the assessment of mutagenic risk and in the prediction of carcinogenic risk is offered by the studies so far developed on some hair dyes. The experience developed on the genotoxicological risk assessment of the hair dyes may also be used for a decision on the way *to evaluate the mutagenic and carcinogenic risk* of other cosmetic ingredients and final products.

Special expert committees, such as those involved in the Gene-TOX Program (5) have evaluated the data presented on scientific published papers related to the use of a specific mutagenicity short term methodology and have made possible the evaluation of several thousands chemicals (table 3) and of the different available mutagenicity tests (Table 4).

di una singola popolazione cellulare (studi *in vitro*) e su organismi intatti (studi *in vivo*) interessando sia cellule germinative che cellule somatiche.

Queste basi scientifiche hanno consentito l'incremento della sensibilità dei tests per una valutazione «predittiva» della mutagenicità a breve termine.

Un esempio dell'evoluzione degli studi sulla mutagenicità nello stabilire i rischi mutagenici e nella predizione dei rischi carcinogenetici, è offerto dagli studi sinora condotti sui coloranti per capelli. L'esperienza sviluppata nell'accertamento del rischio genotossico rappresentato dai coloranti per capelli, può essere usata anche per decidere quale strada seguire *per valutare i rischi mutagenici e carcinogenetici* di altri ingredienti cosmetici e dei prodotti finiti.

Speciali commissioni di esperti, come quelle coinvolte nel programma Gene-TOX (5), hanno valutato i dati pubblicati su articoli scientifici correlati all'uso di specifiche metodologie per lo studio della mutagenicità a breve termine e hanno reso possibile la valutazione di migliaia di prodotti chimici (tabella 3) e dei differenti tests di mutagenicità disponibili (tabella 4).

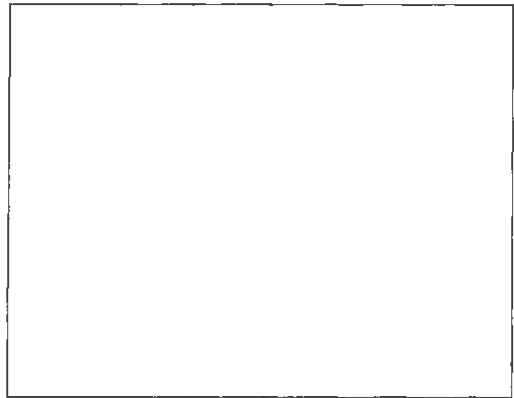
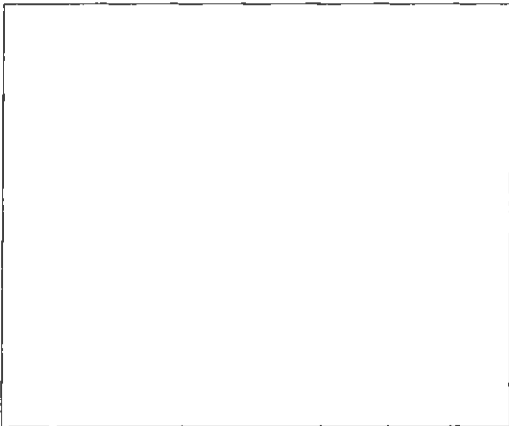


TABLE 3
Number of chemicals evaluated with different mutagenicity tests *

Test name	Rank	Number of chemicals evaluated
Reverse Mutation in <i>S. Typhimurium</i> (Ames Test)	1	900
Bacteria DNA Repair Tests (Differential Survival)	2	598
Drosophila Sex-Linked Recessive Lethal Test (SLRL)	3	420
Gene Mutation in Mammalian Cells in vitro	4	256
Yeast Mitotic Recombination Test	5	211
Reverse Mutation in <i>E. coli</i> WP ₂ WP ₂ <i>uvrA</i>	6	159
SCE Detection in Mammalian Cells	7	158
Mouse Sperm Morphology Test	8	185
Rodent Micronucleus Test	9	169
Rodent Dominant Lethal Test	10	136
Mammalian Cytogenetic Assays in vitro	11	67
Mammalian Cytogenetic Assays in vivo	12	66
Mouse Somatic Mutation (Spot Test) in vivo	13	27
Mouse Specific-Locus Test	14	24
Mouse Heritable-Translocation Test	15	17

* From ICPEMC, Committee 1 Final Report (6), 1983.

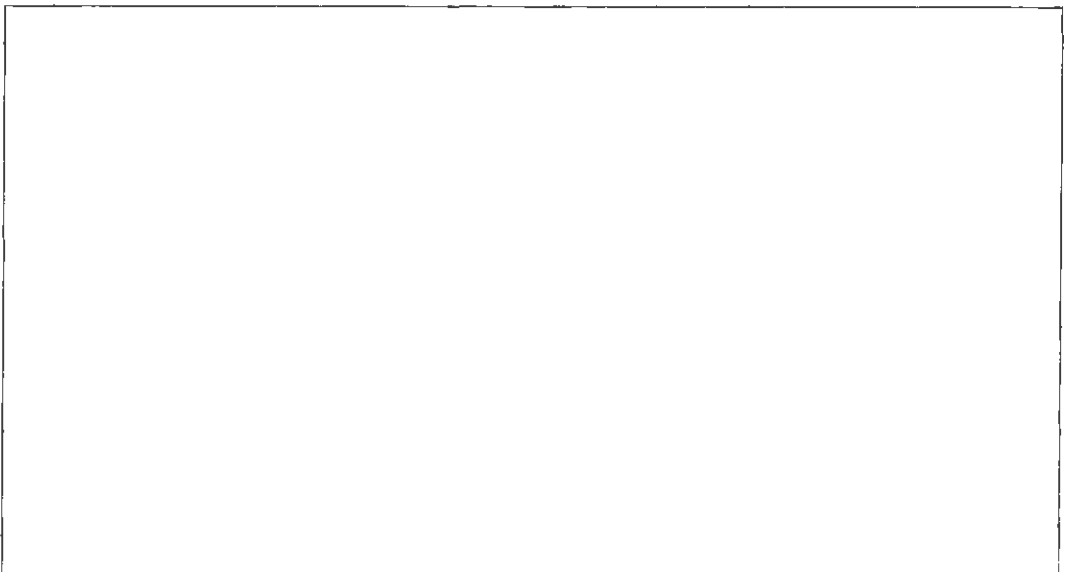


TABLE 4
Short term mutagenicity assays

Somatic cells		Germ cells	
<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Gene-Mutations			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bacterial test 2. Yeast test 3. Fungal test 4. Mammalian test 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mouse spot test 	---	<ol style="list-style-type: none"> 1. Drophila reces. lethal test 2. Mouse specific locus test (morph., skelet., domin., biochemical) 3. Sperm abnormality in F1
Chromosome Mutations			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Mammalian cells 2. Peripheral blood lymphocytes 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mouse & rat micro-nucleus test 2. Mouse & rat bone marrow cytogenetic test 	---	<ol style="list-style-type: none"> 1. Drosophila dominant lethal and chromosome loss test 2. Mouse heritable translocation test 3. Mouse & rat dominant lethal test 4. Mouse & rat germ cell cytogenetic test 5. Chromosome non-dijunction test
Indicator effects			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Mammalian cells (UDS) 2. Mammalian cells (DNA Adducts & Breaks) 3. Mammalian cells (Sce) 4. Gene-conversion & recombination in yeast 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hepatocytes & other tissues (UDS) 2. Different tissues (DNA Adducts & Breaks) 3. Hemoglobin alkylation 4. Different tissues (SCE) 	---	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mouse germ cell (UDS; DNA Adducts & Breaks (Sca)

The practical use of mutagenicity tests has been greatly influenced by the development of knowledge that changes in the process pathway leading to mutations or to structural or numerical chromosome aberrations include:

1. Alteration of DNA base sequence;
2. Alteration of DNA integrity (ad-

L'uso pratico dei tests di mutagenesi è stato molto influenzato dalla conoscenza che i cambiamenti che hanno luogo nei processi mutagenici portano a mutazione o ad aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche che comprendono:

1. Alterazioni della sequenza base del

- ducts/break/crosslinks);
3. DNA rearrangements;
 4. Alterations in chromosome segregations;
 5. Alterations in chromosome integrity.

All these changes which characterize a genotoxic substance cannot be considered as genetic end points to be assessed by all the mutagenicity short-term tests; on the contrary, the generality of these short-term tests do evaluate only a single genetic end points, and only few allow the evaluation of more than one (Table 5).

- DNA.
- 2) Alterazioni dell'integrità del DNA (addotti/rotture/crosslinks).
 - 3) Riarrangiamento del DNA.
 - 4) Alterazione della segregazione cromosomica.
 - 5) Alterazioni dell'integrità cromosomica.

Tutte queste azioni che caratterizzano una sostanza genotossica, non possono essere considerati come punti genetici finali che devono essere accertati tramite tutti i tests mutagenici a breve termine; al contrario, questi tests a breve termine, devono valutare solamente un singolo punto genetico finale, e solamente alcuni conducono alla valutazione di più di un singolo punto genetico finale (tabella 5).

TABLE 5
Short-term mutagenicity assays and their genetic end points evaluable

Assays	Alteration of DNA base sequence	Alteration of DNA integrity	Induction of DNA exchange of rearrangement	Alteration of chromosome segregation	Alteration of chromosome integrity
Dominant-Lethal Assay				2°	1°
Mouse Specific Locus Assay	1°				2°
Heritable-Translocation Assay				2°	1°
Cytogenetics, in vivo					1°
Cytogenetics, in vitro					1°
Sister-Chromatid Exchange (SCE)			2°		1°
Gene mutation:					
Mammalian Cells	1°				
Drosophila SLRL	1°				
<i>E. coli</i> WP2	1°				
Salmonella	1°				
Yeast Recombination	2°		1°		
Rodent Micronucleus				2°	1°
Bacteria DNA Repair		1°			
Mouse Spot Test	+				+
Mouse Sperm Morphology	un-defined*				

* a recent publications has reported that altered spermhead morphology can be induced by nongenetic toxicity (Komatsu H. et al., 1982. Mutation Res., 93:439-446).

On this basis has grown the concept of the need of the use of a battery of mutagenicity tests in the evaluation of the mutagenic potential of a chemical: only the use of a different methodologies does allow the evaluation of all the potential for genotoxicity of a chemical substance.

The quality of the test battery (number of assays and type of assays) is improved on taking into account some other concepts, such as:

1. The metabolic potential (activation/detoxification) of a mutagenicity assay is different (quantitatively and qualitatively) for *in vitro* or *in vivo* methods. However, *in vitro* assays present the highest sensitivity for the expression of the genotoxic potential, whereas the *in vivo* assays present the more realistic situation as in regard to the tissue distribution or to detoxification activity. Both information cannot be ignored.

2. Due to undefined problems depending on the type of the cell used, or on the species employed the specificities of a chemical mutagen has not always an absolute value. Therefore there exist chemical substances which might be mutagenic for only some mutagenicity test organisms.

3. Although the mutagenic and the carcinogenic processes have possible the same initial biological steps (at least for genotoxic carcinogens), mutagenicity tests evaluate biological end points different from those which can be evaluate by a long-term animal assay (carcinogenicity test), and these two different end points could be influenced in different way by other biological factors. Therefore it could not surprise us the existence of contrasting results obtained by means of mutagenicity tests and by means of carcinogeni-

Su queste basi è cresciuto il concetto del bisogno di usare una batteria di tests mutagenici per la valutazione del potenziale mutagenico di un prodotto chimico: solamente l'uso di differenti metodologie porta alla corretta valutazione di tutto il potenziale genotossico di una sostanza chimica.

La qualità della batteria di tests (numero di analisi e tipo di analisi) è migliorata tenendo in debito conto alcuni altri concetti come i seguenti:

1. Il potenziale metabolico (attivazione/detossificazione) di una analisi di mutagenicità è differente (qualitativamente e quantitativamente) fra metodi *in vivo* o *in vitro*.

Tuttavia le analisi *in vitro* presentano la più alta sensibilità per l'espressione del potenziale genotossico, mentre i tests *in vivo* presentano una situazione più realistica come, ad esempio, riguardo alla distribuzione nel tessuto o all'attività di detossificazione.

Ambedue queste informazioni non possono essere ignorate.

2. A causa di problemi indefiniti che dipendono dal tipo di cellula usata, o dalla specie utilizzata, le caratteristiche di un mutageno chimico non hanno sempre un valore assoluto. Inoltre esistono alcune sostanze chimiche che possono essere mutageniche solamente per gli organismi usati nei tests.

3. Spesso i processi mutagenici e carcinogenetici hanno iniziali gradini biologici uguali (almeno per i carcinogeni genotossici), i tests di mutagenesi valutano punti finali biologici differenti da quelli che possono essere valutati dalle analisi a lungo termine condotte sugli animali (tests di carcinogenicità) e questi due diversi punti finali possono essere influenzati in differenti maniere da altri fattori biologici. Non ci deve sorprendere l'esistenza di risultati con-

city tests.

The International Agency for Research on Cancer (7) has defined some useful concepts to be considered on the use of short-term tests in the evaluation of carcinogenic potential of chemical substances.

Validated short-term tests are useful (1) for predicting potential carcinogenicity in the absence of data on animal carcinogenicity; (2) as a contribution in deciding which chemicals should be tested in animals; (3) for identifying active ingredients present in complex commercial mixtures containing putative carcinogens; (4) as additional evidence in interpreting ambiguous data from experimental or epidemiological studies; (5) these tests should not be used by themselves to conclude whether or not an agent is carcinogenic; (6) even when positive results are obtained in one or more of these tests, it is not clear that they can be used reliably to predict the relative potency of compounds as carcinogens in intact animals; (7) since the currently available tests do not detect all classes of agents that are active in the carcinogenic pro-

trastanti ottenuti dalle medie dei tests di carcinogenicità e di mutagenicità.

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (7) ha definito alcuni utilissimi concetti da tener presenti nell'uso dei tests a breve termine per la valutazione del potenziale di carcinogenicità delle sostanze chimiche.

Convalidati tests a breve termine sono utili: (1) per prevedere il potenziale di carcinogenicità in assenza di dati sulla carcinogenicità negli animali; (2) come ausilio nel decidere quale sostanza chimica deve essere testata negli animali; (3) per identificare ingredienti attivi nelle complesse miscele commerciali che presumibilmente contengano possibili carcinogeni; (4) come ulteriore supporto per interpretare dati ambigui che derivano da studi sperimentali o epidemiologici; (5) questi tests non dovrebbero essere usati da soli per stabilire se un agente è o no carcinogenetico; (6) anche quando si ottengono risultati positivi in uno o più di questi tests, non si ha la sicurezza che questi tests possono essere usati con fiducia per prevedere la potenza relativa di composti come i carcinogeni negli ani-

TABLE 6

Assessment of evidence of Carcinogenicity from studies in Humans

I. SUFFICIENT EVIDENCE OF CARCINOGENICITY: indicates that there is a causal relationship between the agent and human cancer.

II. LIMITED EVIDENCE OF CARCINOGENICITY: indicates that a causal interpretation is credible, but that alternative explanations, such as chance, bias or confounding, could not adequately be excluded.

III. INADEQUATE EVIDENCE OF CARCINOGENICITY: indicates that one of the three conditions prevailed: (a) there were few pertinent data; (b) the available studies, while showing evidence of association, did not exclude chance, bias or confounding; (c) studies were available which do not show evidence of carcinogenicity.

TABLE 7

Assessment of evidence of Carcinogenicity from studies in experimental animals

I. **SUFFICIENT EVIDENCE FOR CARCINOGENICITY:** indicates that there is an increased incidence of malignant tumours: (a) in multiple species or strains; (b) in multiple experiments (preferably with different routes of administration or using different dose levels); (c) to an unusual degree with regard to incidence, site or type of tumour, or age of onset.

II. **LIMITED EVIDENCE OF CARCINOGENICITY:** means that the data suggest a carcinogenic effect but are limited because: (a) the studies involve a single species, strain, or experiment; (b) the experiment are restricted by inadequate dosage levels, inadequate duration of exposure to the agent, inadequate period of follow-up, poor survival, too few animals, or inadequate report; (c) the neoplasms produced often occurred spontaneously.

III. **INADEQUATE EVIDENCE OF CARCINOGENICITY:** indicates that because of major qualitative or quantitative limitations, the studies cannot be interpreted as showing either the presence or absence of a carcinogenic effect; or that within the limits of the tests used, the chemical is not carcinogenic.

IV. **NO DATA:** indicates that data were not available.

The categories sufficient evidence and limited evidence refer only to the strength of the experimental evidence that these chemicals are carcinogenic, and not to the extent of their carcinogenic activity nor to the mechanism involved.

(IARC, Mon. Suppl. 4, p. 12, 1982)

TABLE 8

Assessment of data from short-term tests

I. **SUFFICIENT EVIDENCE:** there are at least three positive results in at least two of the three test systems measuring DNA damage, mutagenicity or chromosomal effects. When two of the positive results were for the same genetic effect, they have to be derived from systems of different biological complexity.

II. **LIMITED EVIDENCE:** there are at least two positive results either for different end points or in systems representing two levels of biological complexity.

III. **INADEQUATE EVIDENCE:** there are generally negative or only one positive test results. Up to two positive test results are considered inadequate if they are accompanied by two or more negative test results.

(IARC, Mon. Suppl. 4, p. 13, 1982).

TABLE 9

Classification of the degree of evidence from mutagenicity and carcinogenicity data for the assessment of carcinogenic risks to humans from exposure to chemicals (*)

Type of data from	Sufficient evidence	Limited evidence	Inadequate evidence
Studies in humans	Causal relationship between the agent and human cancer	Causal interpretation is credible, but other explanations could not be excluded	1) Few pertinent data 2) Other explanations 3) Negative results
Studies in experimental animals	Increased incidence of malignant tumours 1) Multiple species/strains 2) Multiple experiments 3) Unusual degree	Suggested carcinogenic effect by a single species, strain or experiment	Impossible interpretation of the study or within the limit of the study the chemical produced no carcinogenic effect
Short-term tests	Three positive results in at least two of the three test systems measuring DNA damage, mutagenicity or chrom. eff.	Two positive results for different end points or in systems with a different biological complexity	Negative or only one positive result. Two positive and two negative results.

(*) From IARC (1982).

cess, one must be cautious in utilizing these tests as the only criterion for setting priorities in carcinogenesis researches. The present state of knowledge does not permit the selection of a specific test (5) as the most appropriate for identifying all classes of potential carcinogens, although certain systems are more sensitive to some classes. Before the results of a particular test can be considered to be fully acceptable for predicting potential carcinogenicity, certain criteria should be met: (a) the test should have been validated with respect to known animal carcinogens and noncarcinogens; (b) when possible, a structurally related carcinogen and noncarcinogen should have been tested simultaneously with the chemical in question; (c) the results should

mali intatti; (7) poiché i tests attualmente disponibili non identificano tutte le classi di agenti che sono attivi nei processi carcinogenetici, bisogna essere cauti nell'utilizzare questi tests come il solo criterio per stabilire delle priorità nelle ricerche sulla carcinogenesi.

Lo stato attuale delle conoscenze non permette (5) la selezione di uno specifico test che sia il più appropriato per l'identificazione di tutte le classi di potenziali carcinogeni, sebbene alcuni sistemi siano più sensibili per certe classi. Prima che i risultati di un particolare test per prevedere la potenzialità carcinogenetica possano essere completamente accettati, bisogna rispettare alcuni criteri: (a) il test dovrebbe es-

have been confirmed in additional test systems; (d) positive results should produce dose-response effects; (e) only chemicals of known purity should be considered for the evaluation.

Tables 6, 7, 8 and 9 summarize the present concepts on the classification of chemical carcinogens on the base of different biological data available.

Application of these concepts to hair dyes

2,4-Diaminoanisole and 2,5-Diaminotoluene (fig. 1) were classified as mutagens after the Ames's paper (1), published in 1975: since that time long-term carcinogenicity studies have been completed, and, in the mean time, several mutagenicity short-term studies been published.

The results of the animal bio-assays are the following:

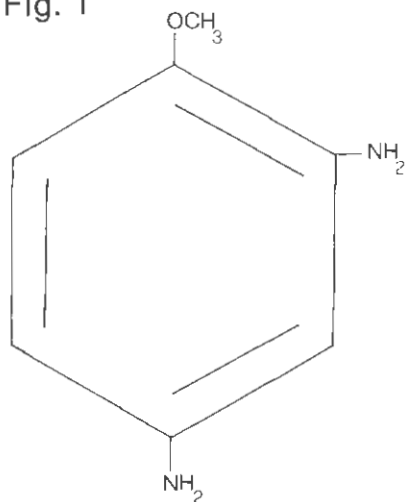
(1) According to IARC (8) 2,4-Diaminoanisole sulphate (technical-grade) was

sere stato condotto nel rispetto della carcinogenesi o non-carcinogenesi animale; (b) quando possibile, un carcinogeno e un non-carcinogeno correlati strutturalmente dovrebbero essere stati cimentati contemporaneamente con la sostanza chimica in questione; (c) i risultati dovrebbero essere stati confermati tramite tests addizionali; (d) risultati positivi dovrebbero produrre effetti dose-dipendenti; (e) solamente prodotti chimici di comprovata purezza dovrebbero essere usati per la analisi.

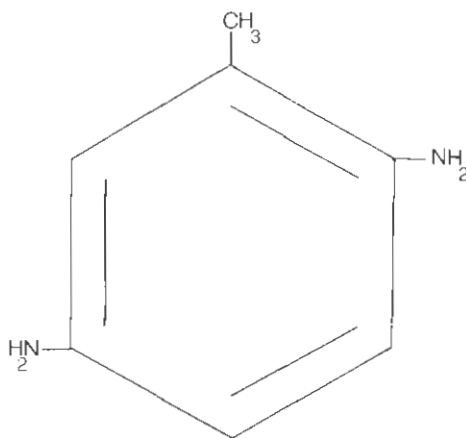
Applicazioni di questi concetti ai coloranti per capelli

Dopo l'articolo di Ames pubblicato nel 1975 (1) il 2,4-Diaminoanisole e il 2,5-Diaminotoluene (figura n. 1) sono stati classificati come mutageni: da allora gli studi di carcinogenicità a lungo termine, sono stati completati e parimenti sono stati pubblicati numerosi studi di mutagenicità a breve termine.

Fig. 1



2,4 DIAMINOANISOLE



2,5 DIAMINOTOLUENE

tested by dietary administration in one experiment in mice and two experiments in one strain of rats. Benign or malignant tumours of the thyroid gland were induced in rats and mice with the highest dose tested; tumours of the skin and of the preputial, clitoral and Zymbal glands were also tested in a hair-dye formulation by skin application in mice and rats, but the studies were considered to be inadequate for the evaluation.

According to the Report presented by National Cancer Institute (9) on the bio-assay of 2,5-Diaminotoluene sulphate, this compound was administered in the feed of both rats (0,2 and 0,06 percent in the diet) and to mice (0,1 and 0,06 percent in the diet) for 78 weeks, followed by an additional 16 to 19 weeks in mice: under the conditions of this bioassay, sufficient evidence was not obtained to demonstrate the carcinogenicity of 2,5-Diaminotoluene sulphate in rats and mice.

Other long-term studies in which the compound has been applied topically have concluded on the absence of a carcinogenic activity of the substance (10, 11, 12).

The results of the mutagenicity tests developed on 2,4-Diaminoanisole are reported on Table 10; those related to 2,5-Diaminotoluene are presented in Table 11.

I risultati di queste bioanalisi sono i seguenti:

1) In accordo con lo IARC (8) il 2,4-Diaminoanisolo solfato (grado tecnico) è stato studiato tramite somministrazione dietaria in un esperimento condotto sui topi e in due studi eseguiti su di un ceppo di ratti. Tumori maligni o benigni vennero indotti nei ratti e nei topi alla dose più alta somministrata; inoltre vennero sperimentati tumori della pelle, del prepuzio, del clitoride e delle ghiandole dello Zymbal nella formulazione di un colorante per capelli in topi e ratti, ma questi studi furono considerati inadeguati per una corretta valutazione.

In accordo con il Report presentato dal National Cancer Institute (Istituto Nazionale del Cancro) (9) sulle bio-analisi condotte sul 2,5-Diaminotoluene solfato, questa sostanza fu aggiunta al cibo sia dei ratti (0.2 e 0.06% nel cibo) che dei topi (0.1 e 0.06% nel cibo) per 78 settimane, seguite da 16 a 19 settimane addizionali nei topi: secondo questa metodica non fu ottenuta una sufficiente evidenza per dimostrare la carcinogenicità del 2,5-Diaminotoluene nei ratti e nei topi.

Altri studi a lungo termine, in cui il composto fu applicato topicamente, portarono alla conclusione dell'assenza di attività carcinogenetica della sostanza (10, 11, 12).

I risultati dei tests di mutagenicità condotti sul 2,4-Diaminoanisolo sono riportati nella tabella 10; quelli relativi al 2,5-Diaminotoluene sono presentati nella tabella 11.

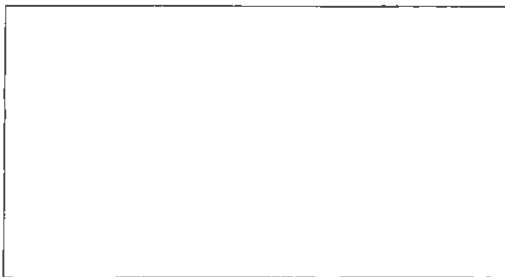


TABLE 10
Summary results obtained with 2,4-Diaminoanisole

	POSITIVE	NEGATIVE
<i>1. GENE MUTATIONS</i>		
A. <i>in vitro</i>	1. Salmonella 2. <i>S. pombe</i> 3. V-79 CH 4. Salmonella (rats:urine)	1. Mouse lymphoma L5178Y
B. <i>in vivo</i>	1. <i>Drosophila</i> (sex-linked R.L.)	1. Mouse spot test
<i>2. CHROMOSOME ABERRATIONS</i>		
A. <i>in vitro</i>	1. Chinese Hamster (CHO)	
B. <i>in vivo</i>		1. Micronucleus test (rat) 2. Bone marrow cytogenet. analys. (mouse) 3. Dominant lethals (rat)
<i>3. INDICATOR TEST SYSTEMS</i>		
A. <i>in vitro</i>	1. <i>S. cerevisiae</i> (mit. recomb. & gene-conv.) 2. HeLa 1 WI-38 human cell lines (unsched. DNA synth.) 3. DNA repair test in bacteria 4. Sister chromatid exchanges CHO cell line	
B. <i>in vivo</i>	----	----

TABLE 11
Summary results obtained with 2,5-Diaminotoluene

	POSITIVE	NEGATIVE
<i>1. GENE MUTATIONS</i>		
A. <i>in vitro</i>	1. Salmonella	<i>E. coli</i> Cellule V-79 <i>S. pombe</i>
B. <i>in vivo</i>	----	<i>Salmonella</i> , urine mice 1,5/15/150 mg/Kg <i>Drosophila</i> , XLR Mouse spot test 1,5/15/150 mg/Kg (♂); 30 mg/Kg

2. CHROMOSOME ABERRATIONS

A. <i>in vitro</i>		Chinese hamster (CHO)
B. <i>in vivo</i>	---	Dominant lethals rats p.o. mg/Kg Chromos. ab. bone marrow (mice) 5/16,6/50 mg/Kg Micronuclei, rats p.o. 120 mg/Kg \times 2

3. INDICATOR TEST SYSTEMS

A. <i>in vitro</i>	E. coli, DNA damage Transformation HEC	Transformation BALB/3T3
B. <i>in vivo</i>	---	---

The conclusions which can be drawn at the present about the two compounds are the following:

- 1) 2,4-Diaminoanisole:
 - a) It is carcinogenic on two species of both sexes;
 - b) It produces gene mutations in bacteria, yeasts, mammalian cells, *Drosophyla* (positive in more than two species);
 - c) It produces chromosome aberrations in mammalian cells *in vitro*, but not on animal tissues, such as bone marrow (micronuclei and chromosome aberrations) and germ cells (dominant lethal) (positive in one test, *in vitro*);
 - d) It produces DNA damages in bacteria, UDS in mammalian cells, mitotic recombination and gene conversion in yeasts (positive in more than one species).
- 2) 2,5-Diaminotoluene:
 - a) It is not carcinogenic on two species and of both sexes, when tested by oral and topical application (Negative).
 - b) It produces gene mutations only in bacteria; it is nonmutagenic

Le conclusioni che possono essere tratte per i due composti sono, attualmente, le seguenti:

- (1) 2,4-Diaminoanisolo
 - a) è carcinogenetico nelle due specie e in ambedue i sessi;
 - b) produce mutazioni geniche in batteri, lieviti, nelle cellule dei mammiferi, nella *Drosophila* (positivo in più di due specie);
 - c) produce alterazioni cromosomiche nelle cellule dei mammiferi *in vitro*, (ma non nei tessuti animali), come nel midollo osseo (aberrazioni cromosomiche e micronuclei) e nelle cellule germinative (letale dominante) (positivo in un test *in vitro*);
 - d) produce danni del DNA nei batteri, dell'UDS nelle cellule dei mammiferi; produce ricombinazioni mitotiche e conversioni geniche nei lieviti (positivo in più di una specie).
- (2) 2,5-Diaminotoluene:
 - a) quando è somministrato oralmente o applicato topicamente, non è carcinogenetico nelle due specie e nei due sessi (Negativo);
 - b) produce mutazioni geniche solamente nei batteri, non è mutage-

Corneometer CM 420

Uno strumento per l'esatta misurazione scientifica
del grado di umidità della pelle.



Per la dermatologia, la cosmetologia, la ricerca clinica.
L'alternativa ai metodi di test tradizionali.
Semplice, sicuro, preciso, fidato ed economico.

Il risultato di una lunga esperienza.
Indispensabile per la clinica, l'ambulatorio e la ricerca.

g.f. secchi
rappresentanze industriali
commercio prodotti chimici

via clerici, 10 - I 22036 erba (co)
telefoni: 031-644033 uff. - 642631 ab.
telex: 380090 comoexp/secchi

Via F. Bernardino 22
tel. (06) 6378788
00165 Roma

**INTERNATIONAL
EDIMME**

Liginia[®] (SODIO ACETATO IDRATO) la prima lavanda va Serono

- AGISCE MANTENENDO IL pH AMBIENTALE AL G L'EQUILIBRIO DELLA FLORA BATTERICA VAGINAI



SVOLGE AZIONE BATTERIOSTATICA MIRATA, PRESERVANDO IL LATTOBACILLO

Come è noto la mucosa della cavità vaginale della donna sana è tappezzata da lattobacilli (o bacillo di Doderlein) la cui funzione principale è di tipo protettivo e di mantenimento dell'equilibrio della flora microbica.

Liginia, nuovo preparato a pH fisiologico svolge la sua azione rispettando gli equilibri microbiologici della flora batterica vaginale contrariamente a quanto avviene con l'uso di preparati contenenti antisettici tradizionali che turbano la flora microbica.

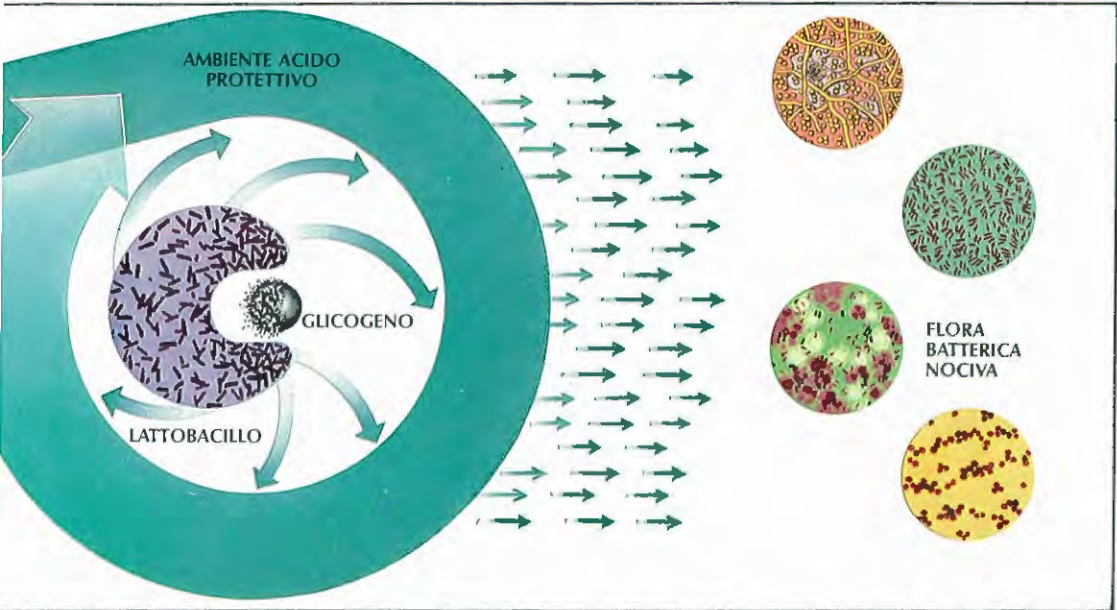
Liginia contiene infatti un deterrente batterico mirato, il sodio acetato idrato che svolge attività batteriostatica transitoria nei confronti dei batteri gram + e gram -.

ATOSSICA E SENZA CONTROINDICAZIONI



e ad azione "veramente" fisiologica

GRADO • ESALTA LE DIFESE NATURALI • RISPETTA
PREDISCE LA SELEZIONE DI BATTERI RESISTENTI •



CONSERVA L'ECOSISTEMA MICROBIOLOGICO VAGINALE

Liginia fornisce al lattobacillo elementi nutritivi essenziali consentendo l'utilizzazione del glicogeno cellulare con produzione massiva di acido lattico ed il mantenimento del pH fisiologico ambientale (4,8 - 5,5); in tal modo viene dato un ulteriore contributo al mantenimento dell'equilibrio microbico vaginale.

CONSIGLIATA ANCHE PER USO FREQUENTE

Sebumeter SM 410

Uno strumento per l'esatta determinazione scientifica
del contenuto di sebo della superficie cutanea.



Per la dermatologia, la cosmetologia, la ricerca clinica.
L'alternativa ai metodi di test tradizionali.
Semplice, sicuro, preciso, fidato ed economico.

Il risultato di una lunga esperienza.

g.f. secchi

raappresentanze industriali
commercio prodotti chimici

via clerici, 10 - I 22036 erba (co)
telefoni: 031-644033 uff. - 642631 ab.
telex: 380090 comoexp/secchi

Via F. Bernardini 22
tel. (06) 6378788
00165 Roma

**INTERNATIONAL
EDIEMME**

- in yeasts, mammalian cells, *Drosophyla*, mouse (Negative).
- c) It does not produce chromosome aberrations in bone marrow cells (micronuclei, cytogenetic) and in germ cells (Dominant lethals) (Negative).
- d) It produces DNA damages on bacteria, but it is negative in yeasts. Transformation tests produce contrasting results.

no nei lieviti, nelle cellule dei mammiferi, nella *Drosophila* e nel topo (Negativo);

- c) non produce aberrazioni cromosomiche nelle cellule del midollo osseo (micronuclei, citogenetic) e nelle cellule germinative (Letale dominante) (Negativo);
- d) produce danni del DNA nei batteri, ma è negativo nei lieviti. I tests di trasformazione hanno fornito risultati contrastanti.

On the basis of the above data we may conclude that 2,4-Diaminoanisole has resulted carcinogenic and mutagenic when tested in several systems, whereas 2,5-Diaminotoluene is neither carcinogenic nor mutagenic (Table 12), after several *in vitro* and *in vivo* studies.

Sulla base dei dati sopra riportati possiamo concludere che il 2,4-Diaminoanisolo è risultato carcinogenetico e mutagenico nei numerosi sistemi di tests utilizzati, mentre il 2,5-Diaminotoluene, dopo numerosi studi *in vivo* e *in vitro*, non è carcinogenetico e non è mutagenico (tabella 12).

TABLE 12

Summary results of biological assays

GENETIC END POINTS	2,4-DIAMINO ANISOLE	2,4-DIAMINO TOLUENE
Salmonella, reverse mutat.	+	- -
E. coli, rev. mut.	+	-
S. pombe, forward mut.	+	-
Mammalian cells, forw. mut.	+	-
<i>Drosophila</i> , xrl	+	-
Mouse, spot test	-	-
Mammalian cells, chrom. ab.	+	-
Bone marrow, chrom. ab.	-	-
Bone marrow, micronuclei	-	-
Germ cells, dominant leth.	-	-
Bacteria, DNA damage	+	+
Mammalian cells, UDS	+	
Mammalian cells, SCE	+	
Yeast cell, mitob. recomb.	+	
Yeast cell, gene recomb.	+	-
Mammalian cells, transform.		- -
Long term studies	+	-

This conclusion is more reliable to-day than in 1975, after the data published by Ames et al. (1).

Recent studies developed on a new hair dye ingredient, 2,4-Diaminophenoxyethanol by G. Kalopissis (13) have largely demonstrated that a battery of mutagenicity tests is sufficient to demonstrate the absence of a mutagenic potential in this compound (Table 13). We may therefore conclude that it is possible by means of an extensive battery of mutagenicity tests to (a) adequately define the genotoxicological potential of a chemical employed in the hair dyes (positive or negative); and (b) to better interpret the results of long-term carcinogenicity studies.

Questa conclusione è più sicura oggi che nel 1975, dopo i dati pubblicati da Ames e al. (1).

Recenti studi condotti da Kalopissis G. (13) su di un nuovo ingrediente dei coloranti per capelli, il 2,4-Diaminofenossietanolo, hanno ampiamente dimostrato che una batteria di tests mutagenici è sufficiente per dimostrare l'assenza del potenziale di mutagenicità in questo composto (tabella 13). Possiamo quindi concludere che è possibile, dai risultati di una vasta batteria di tests di mutagenicità, definire adeguatamente il potenziale genotossico di un prodotto chimico utilizzato nei coloranti per capelli (positivo o negativo) e possiamo meglio interpretare i risultati degli studi di carcinogenicità a lungo termine.

TABLE 13

Summary results of mutagenicity studies developed on two analogues employed in hair dyes

GENETIC END POINTS	2,4-DIAMINO ANISOLE	2,4-DIAMINO PHENOXYETHANOL
Salmonella, rev. mut.	+	-
E. coli, rev. mut.	+	-
S. pombe, forw. mut.	+	-
Drosophila, xrl	+	-
Mammalian cell, forw. mut.	+	-
Mouse, rec. mutat.	-	-
Mammalian cells, chrom. ab.	+	-
Bone marrow, cytogen.	-	-
Bone marrow, micronuclei	-	-
Germ cells, dom. lethals.	-	-
Bacteria, DNA damage	+	-
Yeast, gene convers.	+	-
Mammalian cells, UDS	+	-
Mammalian cells, SCE	+	-

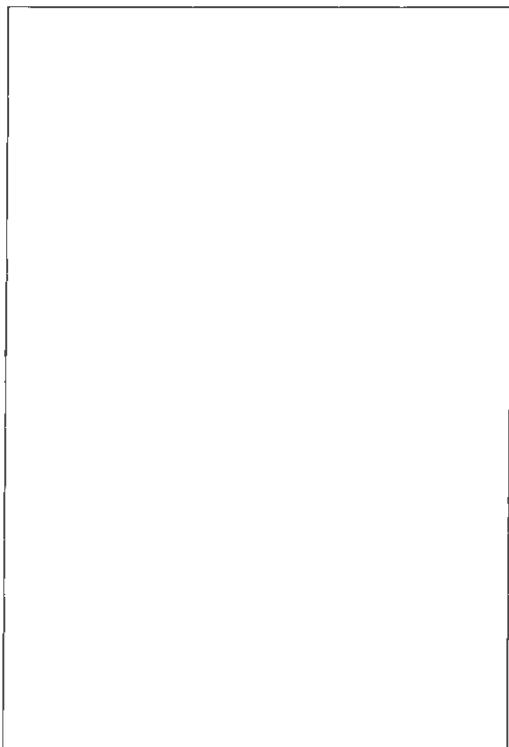
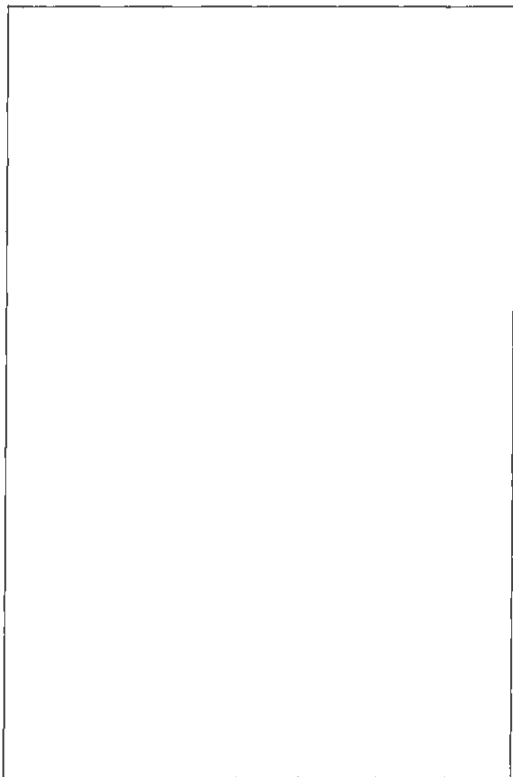
These types of study together with the results of pharmacological investigations (absorption, distribution, excretion) are a valid tool for the definition of the long term toxic risk. Mutagenicity studies developed in our laboratory on complete commercial formulations of hair dyes (14) have demonstrated that the results obtained with single ingredients can be confirmed when final complex commercial formules are evaluated by means of some mutagenicity tests, as those indicated in the present paper.

It is our conviction that the same considerations should be accepted also for other cosmetic ingredients, for all of which mutagenicity studies have been strongly recommended.

Questi tipi di studi insieme con i risultati delle analisi farmacologiche (assorbimento, distribuzione, escrezione), sono un valido mezzo per la definizione dei rischi tossici a lungo termine.

Gli studi di tossicità condotti nei nostri laboratori su formulazioni commerciali complete (14) hanno dimostrato che i risultati ottenuti con singoli ingredienti possono essere confermati quando le formule del prodotto commerciale definitivo sono valutate attraverso tests di mutagenicità, come quelli indicati in questa pubblicazione.

È nostra convinzione che le stesse considerazioni dovrebbero essere accettate anche per altri ingredienti cosmetici, per tutti quelli di cui sono stati raccomandati fortemente studi di mutagenicità.



REFERENCES

- 1 Ames, B.N. et al. (1975): *Proc. Nat. Acad. Sci. Washington USA*, **72**, 2423-2427.
- 2 *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, **106**, 5025, 25.6.1976.
- 3 *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, **85**, 2749, 27.3.1979.
- 4 Sugimura, T. (1976): *IARC Scient. Pubbl.*, **12**, 81-104.
- 5 Waters, M.D. and A. Auletta (1981): *J. Chem. Inf. and Comp. Sciences*, 35-38, Feb.
- 6 ICPEMC, Committee 1 Final Report (1983): *Mut. Res.* **114**, 117-177.
- 7 *IARC Monographs* (1982) Suppl. 4.
- 8 *IARC Monograph* (1982): **27**, 103-117.
- 9 National Cancer Institute (1978): Techn. Report, No. 126.
- 10 Kinkel, H.J. and S. Holzmann (1973): *Fd Cosmet. Toxicol.* **11**, 641-648.
- 11 Burnett, C. et al. (1975): *Fd Cosmet. Toxicol.* **13**, 353-357.
- 12 Giles, A.L. et al. (1976): *J. Toxicol. & Environ. Health*, **1**, 433-440.
- 13 G. Kalopissis (1981): *Toxicol. Eur. Research* **4**, 191-196.
- 14 Barale, R. e N. Loprieno (1983): *Conferenza Tossicologia Prodotti Cosmetici*, 63-75. ETS.