

## VALUTAZIONE IN VITRO DELL'ATTIVAZIONE DELLE CELLULE DENDRITICHE INDOTTA DA ALLERGENI DA CONTATTO DI DIVERSA POTENZA

Galbiati V., Sirtori S., Iacomini G., Santonocito L., Corsini E.

*Dipartimento di Scienze Politiche e Ambientali, Università degli studi di Milano, Milano, Italia*

Nell'Unione Europea è stato calcolato che il 4% (circa 32.000/anno) degli animali utilizzati per i test di tossicità sono destinati alla valutazione della sensibilizzazione cutanea. Mentre diversi metodi *in vitro* sono a diversi stadi di sviluppo e utilizzo, attualmente non è possibile determinare il livello di induzione della sensibilizzazione, un importante aspetto per la valutazione della sicurezza. L'identificazione dei meccanismi che influenzano la forza delle risposte delle cellule T, che può spiegare la forza delle reazioni allergiche da dermatite da contatto a sensibilizzanti di diversa potenza, è una sfida ancora da risolvere. Per far ciò è necessaria una migliore comprensione degli eventi molecolari che scatenano l'attivazione delle cellule dopo l'esposizione agli allergeni da contatto. Partendo dai seguenti presupposti: i) il grado di attivazione/maturazione delle cellule dendritiche (DCs) indotto da allergeni chimici determina la qualità e l'ampiezza dell'attivazione delle cellule T; ii) l'attivazione di PKC è nota per essere necessaria a guidare la differenziazione delle DCs; iii) l'attivazione di PKC- $\beta$  è centrale nell'espressione di CD86 indotta da allergeni chimici e nella produzione di IL-8, due marcatori selettivamente up-regolati dagli allergeni; questo progetto mira a caratterizzare *in vitro* il grado di maturazione/attivazione delle DCs e la longevità indotta da allergeni chimici di diversa potenza. Nessun animale e uomo sono stati usati per questa ricerca. Lo studio è stato condotto utilizzando le cellule pro-mielocitiche THP-1 e nove allergeni da contatto di diversa potenza: benzochinone e Bandrowski's base (estremi), fluoresceina isotiocianato e acido 2,4,6-trinitrobenzensulfonico (forti), dietil maleato (moderato),  $\alpha$ -esilcinnamaldeide, idrossicitronellale e imidazolidinil urea (deboli). Per studiare il ruolo di PKC $\beta$  nell'induzione di marcatori di superficie cellulare e rilascio di citochine, le cellule THP-1 sono state pretrattate per 2 ore in presenza o in assenza di un inibitore selettivo della PKC $\beta$  e successivamente esposte per 24, 48 e 72h agli allergeni selezionati. Dopo i diversi tempi di trattamento (24, 48 e 72h) l'espressione dei marker di superficie CD86, CD80 e HLA-DR è stata valutata attraverso citofluorimetria, mentre il rilascio di citochine (IL-8, IL-18, IL-18, IL-12p40) è stato valutato con specifici kit ELISA. L'attivazione di PKC $\beta$  è stata valutata anche attraverso analisi Western blot. I risultati ottenuti suggeriscono che allergeni di diversa potenza sono in grado di attivare in modo differente le DCs. Si conferma, inoltre, il coinvolgimento di PKC $\beta$  nell'induzione di CD86, CD80 e HLA-DR.

