

SVILUPPO DI UN METODO ALTERNATIVO PER LA VALUTAZIONE IN VITRO DEL POTENZIALE SENSIBILIZZANTE

A. Buzzella^{1,2}, R. Vicini², G. Mazzini^{1,3}, C. Angelinetta², O. Pastoris¹.

¹ *Dipartimento di Biologia e Biotecnologie 'L. Spallanzani', Università degli Studi di Pavia, Italia*

² *Bio Basic Europe S.r.l., Milano (Italia)*

³ *Istituto di Genetica Molecolare (IGM-CNR), Pavia (Italia)*

La dermatite allergica da contatto (DAC) è una reazione infiammatoria indotta dalla ripetuta esposizione della pelle a determinate sostanze chimiche. Ad oggi rappresenta un problema piuttosto comune per la salute umana, soprattutto all'interno di professioni in cui i lavoratori sono regolarmente esposti a prodotti chimici o nei cosiddetti wet works (ad esempio parrucchieri). Tuttavia, anche i cosmetici e i prodotti per la casa possono contenere numerose sostanze ad azione pro-sensibilizzante. Questi, essendo prodotti destinati ai consumatori, devono rispettare precise disposizioni legislative che garantiscono la sicurezza del prodotto stesso e tutelano la salute dei consumatori. In Italia i cosmetici sono disciplinati dal Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo, entrato in vigore a partire dal Luglio 2013, secondo il quale è proibito il testing su animali da laboratorio per cosmetici e relativi ingredienti.

Per soddisfare i requisiti della legislazione europea relativa alla valutazione dei pericoli di potenziali sensibilizzanti cutanei sono stati compiuti notevoli progressi nello sviluppo di metodi di prova alternativi in chimico/in vitro, fra cui lo human cell line activation test (h-CLAT). Il test h-CLAT ha come target il terzo degli eventi chiave di un adverse outcome pathway (AOP), corrispondente all'attivazione delle cellule dendritiche. Tale metodica richiede l'utilizzo di una linea cellulare di monociti umani (THP-1) e si basa sulla valutazione dell'espressione degli antigeni di membrana CD54 e CD86 mediante analisi citofluorimetrica. Gli antigeni vengono rilevati grazie ad anticorpi monoclonali coniugati con FITC. Basandoci su questo metodo, sono stati analizzati una serie di prodotti chimici con potenziale sensibilizzante noto e non. La fluorescenza emessa, generalmente a bassa intensità, ha generato problemi nell'analisi e nell'interpretazione dei dati ottenuti poiché non è risultata tale da permettere la discriminazione fra sostanze sensibilizzanti e non-sensibilizzanti.

Per questo motivo lo scopo dello studio è stato quello di trovare un parametro citometrico alternativo, più sensibile rispetto alla fluorescenza, al fine di valutare il potenziale sensibilizzante delle diverse sostanze chimiche.

A tale scopo, le cellule sono state analizzate mediante analisi citofluorimetrica, a seguito del trattamento con differenti composti sensibilizzanti e non sensibilizzanti somministrati a concentrazioni non citotossiche. Mentre come analisi di controllo, un set di cellule non è stato esposto ad alcun prodotto chimico.

Le sostanze con potenziale sensibilizzante noto hanno indotto evidenti modifiche morfologiche nelle cellule THP-1, in particolare la morfologia cellulare viene modificata in una più condensata che permette alle cellule di essere facilmente identificate al microscopio, come sottopopolazione «sensitized». Queste modifiche inducono alterazioni simili nei parametri di «scattering» cellulare rendendo così le cellule facilmente monitorabili con la citometria a flusso. Nessun cambiamento è stato invece osservato nelle cellule trattate con sostanze non sensibilizzanti e nelle cellule di controllo (non trattate).

In conclusione, questo metodo basato sull'analisi dei parametri di forward scatter e side scatter può essere utilizzato come valido metodo alternativo in vitro per l'identificazione del potenziale sensibilizzante di composti chimici.

