Abstract

1° Premio Pietro Croce per l'abolizione della speri mentazione animale.

Allestimento di metodiche in vitro linee cellulari stabilizzate umane per la valutazione del potenziale tossico e irritante di materie prime e prodotti finiti ad uso topico.

A. Parodi, C. Scanarotti, R. Sanguineti, M. Catalano, A.M. Bassi, S. Penco

Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Genova

Da diversi anni la comunità scientifica mondiale cerca di ridurre e/o sostituire i test *in vivo*, con lo sviluppo e la validazione di metodi alternativi all'uso dell'animale per la valutazione del potenziale tossico, e quindi della sicurezza di composti chimici, soprattutto, di prodotti cosmetici, per i quali è sempre più evidente la scarsa affidabilità e predittività dei test di tossicità, per le numerose differenze biologiche tra uomo e animale che potrebbero compromettere la salute e la sicurezza del consumatore.

Nello studio in vitro intrapreso abbiamo cercato di sviluppare e migliorare la fattibilità e il valore predittivo dei test tossicologici in vitro, per la valutazione del rischio chimico di composti presenti negli ingredienti di preparazioni cosmetiche.

La ricerca è stata condotta su colture cellulari di origine umana, per poter avere dati di tossicità più predittivi ed uno strumento alternativo valido, per ridurre l'uso di animali nella valutazione del potenziale irritativo, oltre che per indagare l'aspetto molecolare delle risposte infiammatorie/allergeniche, che si verificano nell'apparato tegumentario dopo esposizione a sostanze irritanti presenti nelle formulazioni chimiche offerte dalle industrie e destinate ad utilizzo umano.

Il nostro impegno per l'abolizione della sperimentazione animale, è stata rivolto anche verso l'utilizzo di reagenti ANIMAL-FREE in conformità alla direttiva 86/609/CEE; fatta eccezione nel caso di impossibilità a reperire prodotti rispondenti a tale tipologia.

Si è allestito un modello *in vitro* costituito da due linee cellulari umane normali stabilizzate di origine cutanea:, cheratinociti, NCTC 2544 e fibroblasti dermici, HFFF2. Le cellule NCTC2544 sono in uno stadio poco differenziato e le HFFF2 sono di origine fetale, pertanto, entrambe le linee possono risultare più sensibili ad eventuali insulti chimico-fisici, e quindi più adatte per studiare il potenziale tossico-irritante di ingredienti di preparazioni cosmetiche, mediante l'analisi dell'espressione di due citochine infiammatorie, IL-1a e LIF.

Le cellule NCTC 2544 sono state esposte ad alcune sostanze con proprietà allergeniche, incluse nella lista dei potenziali allergeni/irritanti presenti nelle formulazioni cosmetiche (direttiva 2003/15/CEE). Le sostanze scelte sono state: Geraniolo, Limonene, Alcool Benzilico e Citronellolo. Come molecole di controllo positivo per stimoli irritativi si sono scelti il sodio dodecil solfato (SDS) e Nichel Solfato ($NiSO_4$).

Dapprima, per ogni sostanza sperimentale utilizzata, si è valutato il potenziale citotossico, tramite due test validati dall'ECVAM (NRU e MTT), in modo da trovare concentrazioni sub-tossiche, più adatte da impiegare nei trattamenti, per evitare che i processi di morte cellulare potessero influenzare la risposta cellulare allo stimolo irritativo. In seguito, si è analizzata l'espressione proteica della forma immatura e matura di IL-1α e

della LIF, per verificare se la modulazione dei loro livelli fosse correlabile alla concentrazione della sostanza in esame e del tempo di esposizione.

Per verificare, ulteriormente, l'affidabilità del nostro modello in vitro si sono analizzati gli stessi parametri nelle cellule HFFF2 dopo esposizione a Geraniolo, SDS e NiSO4.

In entrambi i modelli cellulari, esposti a sostanze irritanti e/o allergeniche, abbiamo riscontrato una modulazione delle due citochine infiammatorie.

Dai risultati ottenuti possiamo affermare che il nostro modello, costituito da cellule umane di origine cutanea, possa essere proposto per la predizione del potere citotossico-infiammatorio di molecole commerciali e di nuova sintesi, riducendo, quindi, l'uso di animali.