



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Facoltà di scienze mm. ff. nn.
Laurea di primo livello in Biotecnologie

Elaborato di laurea

**UTILIZZO DI TEST DI VITALITA'
CELLULARE NELLA DETERMINAZIONE DI
CITOTOSSICITA' DI DISPOSITIVI MEDICI**

Tutor	Prof. re M.D. Baroni Dip.to di Biologia "A. Vallisneri"
Co-Tutor	Dott.ssa Federica Cattapan Chelab
Laureanda	Silvia Visentin
Matricola	517915
Anno Accademico	Anno 2008/2009

INDICE

INTRODUZIONE	p 2
MATERIALI E METODI	p 4
1.1 Ocular Irritation	p 4
1.2 Programma di lavoro	p 5
2.1 Skin Irritation	p 7
2.2 Programma di lavoro	p 8
RISULTATI E CONCLUSIONI	p 10
3.1 Risultati Ocular Irritation	p 10
3.2 Risultati Skin Irritation	p 12
CONCLUSIONI	p 14
Bibliografia	p 15
Ringraziamenti	p 16

Abstract

Per motivi etici ed economici molte organizzazioni internazionali, come ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) e OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), lavorano da tempo per sviluppare normative che limitino sempre più l'utilizzo di animali in laboratorio, attraverso la convalida di test di tossicità *in vitro*.

Nella *Guideline for the testing of chemicals OECD 404 Acute dermal irritation/corrosion*, del 2002, si afferma che: « [...] speciale attenzione è stata rivolta a possibili miglioramenti del benessere degli animali ed alla valutazione di tutte le informazioni esistenti sulle sostanze da testare, per evitare l'uso non necessario di animali in laboratorio [...] - tutte le informazioni riguardanti una sostanza e il suo potenziale irritante-corrosivo devono essere valutate prima di considerare un test *in vivo* [...] - informazioni sufficienti possono già esistere per la classificazione di una sostanza come del suo potenziale irritante o corrosivo, senza il bisogno di svolgere test sugli animali».

Per tali motivi possono essere utilizzati per test di irritazione cutanea *in vitro* modelli validati, con il vantaggio di un modello riproducibile standard.

Il periodo di tirocinio svolto in Chelab S.r.l. è stato finalizzato allo studio e al successivo svolgimento di analisi di irritazione cutanea e oculare

INTRODUZIONE

Le analisi oggetto di questo elaborato sono saggi di irritazione cutanea e oculare. Per irritazione si intende un danno di entità variabile, ma di natura reversibile, che si verifica dopo l'esposizione ad una sostanza.

Ha un'insorgenza localizzata e può manifestarsi con reazioni infiammatorie e segnali clinici evidenti, come eritemi o rossori.

Nel caso di test *in vivo* si porta la sostanza a contatto diretto con la cute dell'animale, nel caso di test *in vitro* si utilizza un modello tridimensionale di pelle umana ricostituita.

La struttura deve essere creata da cheratinociti umani e devono essere presenti tutti gli strati caratterizzanti l'epitelio: lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso e lo strato corneo.

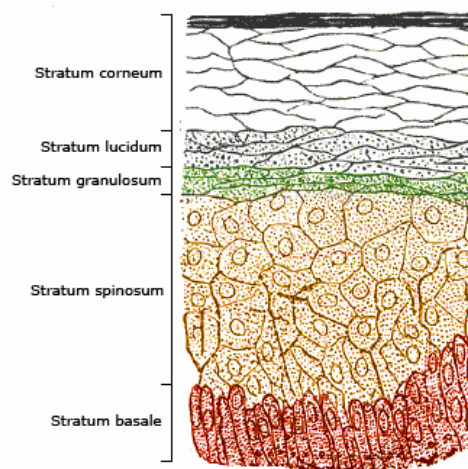


Figura 1 Schema base dell'epidermide.

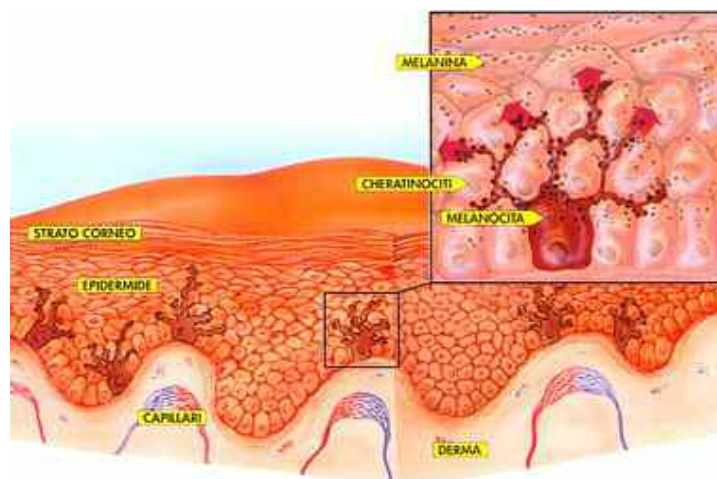


Figura 2 Particolare. Origine delle cellule dei cheratinociti.

A sua volta lo strato corneo deve mostrarsi pluristratificato e presentare il profilo lipidico essenziale, cosicché venga a costituirsi una barriera funzionale che impedisca la penetrazione immediata degli agenti chimici, potenzialmente dannosi per gli strati sottostanti.

Il modello tridimensionale di pelle umana acquistato per questa analisi ha come origine una coltura di cheratinociti umani su una base di collagene, posta in condizioni tali da poter permettere lo sviluppo, la differenziazione e la ricostruzione della struttura epiteliale.

Per quanto riguarda, invece, l'epitelio corneale è stato ottenuto dalla coltivazione di cellule epiteliali corneali umane immortalizzate in una interfaccia sospesa in un medium chimicamente definito, dove tali cellule, ricostruiscono il tessuto epiteliale della cornea, provvisto di uno strato corneo, strutturalmente e funzionalmente simile al tessuto umano *in vivo*.

Le colture cellulari hanno dato un contributo straordinario allo sviluppo della biologia e della ricerca biomedica di sistemi sperimentali semplificati. Hanno favorito l'approfondimento di meccanismi cellulari e molecolari ed ampliato le possibilità applicative delle nuove conoscenze, nonostante ciò nel campo tossicologico e farmaceutico non hanno ancora completamente sostituito il modello animale.

In ogni caso, è innegabile che le colture cellulari sono forse il modello biologico più promettente, a dispetto di caratteristiche e limiti intrinseci che vanno ben calibrati nella pianificazione di esperimenti e nell'interpretazione dei risultati.

Il limite più rilevante consiste nell'estrema semplificazione del sistema sperimentale rispetto all'organizzazione complessa di un organismo pluricellulare.

VANTAGGI

- Sistemi semplificati altamente riproducibili;
- Analisi dei meccanismi cellulari e molecolari della tossicità;
- Identificazione di danni precoci;
- Riconoscimento di effetti reversibili;
- Tecniche relativamente semplici;
- Costi contenuti e risposte rapide rispetto alla sperimentazione animale;

SVANTAGGI

- Sistemi semplificati rispetto ad un organismo pluricellulare;
- Condizioni di esposizione diverse da quelle *in vivo*;
- Possibile interferenza tra sostanza da testare e mezzi di coltura;
- Non permettono di studiare effetti citotossici complessi;
- Analisi di citotossicità acuta più che cronica;
- Difficoltà di correlare le concentrazioni *in vitro* con quelle *in vivo*.

Tabella 1 Limiti e vantaggi del modello coltura cellulare.

Nel settore dello studio dei meccanismi di citotossicità il modello cellulare risponde all'esigenza di studiare in dettaglio gli effetti organo-specifici di determinati composti o meccanismi d'azione in tipi cellulari specifici.

L'approccio è mirato e i saggi effettuati riguardano particolari funzioni o meccanismi cellulari.

L'impiego di colture cellulari nello studio di citotossicità di agenti chimici è molto diffuso, al punto che sono disponibili in commercio kit pronti all'uso.

Tramite le colture si possono ottenere indicazioni preliminari sulla tossicità di sostanze ad azione non nota e si possono risolvere nei dettagli i meccanismi d'azione di composti già noti come tossici.

E' necessario rilevare che i parametri di tossicità che si prendono in considerazione differiscono perché, nel caso di studi di screening, è importante avere dati utilizzabili in tempi brevi e con uso limitato di tempo e risorse, mentre nel caso di meccanismi metabolici o molecolari servono dati precisi, tecniche specifiche e laboriose. Nel primo caso si cercano indicatori sensibili, anche se non troppo specifici, che possano essere rilevati con metodi semplici, nel secondo invece, si cercano segnali specifici.

Per rilevare la vitalità cellulare terminato il tempo d'esposizione, e valutare quindi i danni riportati dal tessuto, si usano diversi tipi di saggio che in linea di massima contano la capacità di espellere o trattenere coloranti.

Il saggio di esclusione di coloranti si basa sulla misura di permeabilità della membrana cellulare, partendo dal presupposto che, solo le cellule danneggiate, consentono il passaggio di molecole voluminose.

Il colorante è aggiunto direttamente al terreno di coltura e l'osservazione è fatta in tempi brevi.

Il limite più evidente è che i danni causati da un agente citotossico in genere sono interni o richiedono un certo tempo per esprimersi, quindi il danno della membrana non è subito evidente e si può avere una sottostima del danno.

Il saggio di accumulo di coloranti, invece, prevede la misurazione della perdita di coloranti vitali. Anche in questo caso si ha una aggiunta di colorante al terreno di coltura, ma l'osservazione può richiedere un tempo mediamente lungo (un paio d'ore). Terminata l'operazione viene recuperata la soluzione contenente il colorante e letta con uno spettrofotometro.

In ogni caso, i metodi che fanno uso di coloranti sono soggetti alle variazioni quantitative del colorante nelle soluzioni usate e quindi i risultati ottenuti possono non essere confrontabili con i valori assoluti.

MATERIALI E METODI

1.1 OCULAR IRRITATION

Il modello di tessuto umano ricostruito Skinethic consiste in una coltura vivente, un tessuto pluristratificato, prodotto in sospensione su inserti di policarbonato immersi in un mezzo di coltura senza siero e chimicamente definito, equivalente da un punto di vista strutturale e funzionale a tessuto umano in vivo.



Figura 3 A sinistra si vede il supporto in policarbonato nella posizione di arrivo, a destra si vede il supporto rovesciato per rendere visibile la zona dove si localizza l'epitelio oculare

Gli inserti arrivano in piastre multipozzetto contenenti una soluzione nutriente in agarosio in cui sono immersi.

Ciascun inserto presenta una superficie pari a 0.5 cm^2 costituita da una coltura di cheratinociti umani trasformati, provenienti da una linea cellulare costituita da cellule epiteliali della cornea umana immortalizzate.

Subito dopo l'arrivo del kit bisogna trasferire gli inserti di tessuto dal gel nutriente, in un'altra piastra contenente un medium di mantenimento o di crescita e incubarli a 37° C , con atmosfera al $5\% \text{ CO}_2$ e satura di umidità. Il giorno successivo si può iniziare il saggio.

La procedura per il saggio di irritazione oculare (fornita con il kit) prevede che, dopo aver cambiato il medium di mantenimento con dell'altro fresco, si depositi una quantità pari a 30 mg o $30 \mu\text{l}$ di campione (a seconda della sua natura) sulla superficie dei pozzetti contenenti il tessuto della cornea ricostruito e che si lasci incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Parallelamente le stesse operazioni vengono effettuate per i pozzetti contenenti il controllo positivo, costituito da SDS 1% , e per i pozzetti del controllo negativo, costituito da soluzione fisiologica NaCl 0.9% .

Per il controllo positivo si sceglie SDS perché per la sua natura chimica, di tensioattivo anionico, provoca irritazioni cutanee ed oculari.

Terminato il tempo di incubazione si provvede a rimuovere con attenzione il campione testato ed i controlli positivo e negativo utilizzati con un medium adeguato o con una soluzione fisiologica e si procede con il test di vitalità cellulare (MTT Test).

La procedura del test di vitalità cellulare prevede che in ogni pozzetto siano depositati $300 \mu\text{l}$ di una soluzione di MTT 0.5 mg/ml e il tutto venga incubato per 3 ore a 37° C con un'atmosfera di CO_2 al 5% e satura di umidità.

Il test MTT (3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide) è un saggio di laboratorio colorimetrico standard per misurare l'attività di enzimi

mitocondriali che riducono l'MTT a formazano, facendo virare il composto da un colore giallo ad un colore blu-violetto intenso.

Il formazano rimane localizzato all'interno dei mitocondri, quindi deve essere solubilizzato ed estratto dalle cellule. A tale scopo, scaduto il tempo di incubazione, la piastra viene sciacquata dalla soluzione di MTT ed incubata per un minimo di 2 ore con isopropanolo (solvente di estrazione) a temperatura ambiente e al buio perché è un composto fotosensibile. L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare. La densità ottica (OD) è misurata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda pari a 570 nm. Il grado di vitalità cellulare e quindi il grado di tossicità del composto testato, è esprimibile con la seguente formula:

% vitalità cellulare =

[OD (570 nm) composto testato / OD (570 nm) controllo negativo] x 100

In base al risultato ottenuto il composto in esame è classificato nel seguente modo, secondo le indicazioni riportate nel protocollo fornito:

- Vitalità cellulare inferiore al 60% = Composto irritante
- Vitalità cellulare uguale o superiore al 60% = non irritante.

1.2 PROGRAMMA DI LAVORO

Il campione utilizzato per il test di ocular irritation è un collirio.

GIORNO 1

- Arrivo del kit, contenente la piastra multipozzetto con 12 unità di tessuto corneale ricostruito (HCE, Human Corneal Epithelium), immerse in gel di agarosio nutriente, un medium di mantenimento e un medium di crescita.
- Effettuato il trasferimento degli inserti (con pinze sterili) in una nuova piastra contenente 1 ml di medium di crescita per pozzetto.
- Incubazione della piastra a 37° C, con CO₂ al 5% per circa 24 ore.

GIORNO 2

- Trasferimento degli inserti in una nuova piastra, contenente 1 ml di medium di mantenimento per pozzetto.
- Incubazione della piastra overnight a 37° C, con CO₂ al 5%.

GIORNO 3

- Preparazione della soluzione fisiologica NaCl 0.9% (controllo negativo), della soluzione SDS 1% (controllo positivo), della soluzione MTT 0.5 mg/ml.

- Preparazione della piastra per l'analisi: 4 pozzetti riempiti con 100 μ l del campione in esame, 3 pozzetti riempiti con 100 μ l di controllo positivo e 2 pozzetti riempiti con 100 μ l di controllo negativo; in ogni pozzetto è stato quindi trasferito un inserto di HCE (Human Corneal Epithelium).
- La piastra è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente.

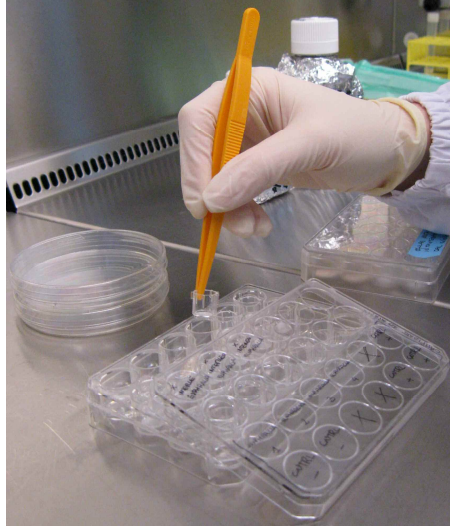


Figura 4 Trasferimento dei supporti per incubazione di 10 minuti

- Trascorso il tempo di incubazione gli inserti sono sciacquati con circa 1-2 ml di soluzione fisiologica NaCl 0.9% e posti in una nuova piastra contenente 300 μ l/pozzetto di soluzione MTT 0.5 mg/ml.
- Incubazione della piastra per 3 ore a 37° C, CO₂ 5%.

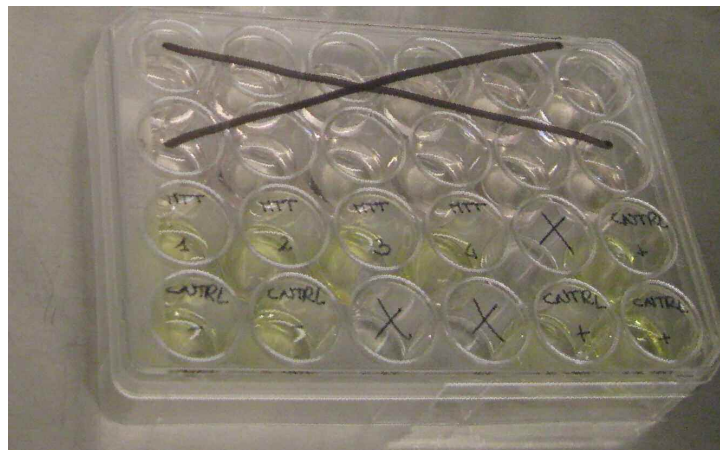


Figura 5 Piastra con soluzione MTT 0.5 mg/ml

- Al termine dell'incubazione trasferimento degli inserti in una nuova piastra contenente 1.5 ml di isopropanolo per pozzetto.
- Incubazione della piastra per 2 ore a temperatura ambiente, al buio.
- Al termine dell'estrazione allestimento di una piastra da 96 pozzetti nel seguente modo: recupero dell'estratto da ciascun pozzetto e aliquotato in 5 repliche da 200 μ l/pozzetto.
- La piastra è letta a 570 nm, attraverso un lettore di micropiastre.

2.1 SKIN IRRITATION

Il kit consiste in 12 unità di epidermide ricostruita, con superficie totale pari a 0.38 cm², sulle quali possono essere applicati direttamente i composti da testare e valutati gli effetti farmaco-tossicologici.

Ogni unità è costituita da una matrice di collagene, sul quale è appoggiata un'epidermide stratificata e differenziata derivante da cheratinociti umani.

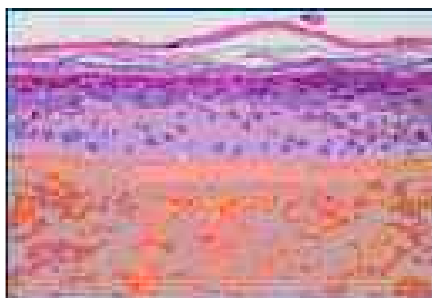


Figura 6 Istologia del modello Episkin

Gli inserti arrivano in piastre contenenti una soluzione nutriente di agarosio in cui sono immersi.

Subito dopo l'arrivo del kit se il saggio non inizia subito bisogna spostare i modelli tridimensionali dal gel nutriente, in un'altra piastra contenente un medium di mantenimento e incubarle a 37° C, con atmosfera al 5% CO₂ e saturata di umidità, in caso contrario si segue il protocollo fornito dalla casa produttrice del kit.

La procedura per il saggio di irritazione cutanea (fornita con il kit) prevede, in ogni caso, che dopo l'arrivo le unità vengano trasferite dal gel nutriente al medium di mantenimento e incubate a 37° C in condizioni di umidità e CO₂ al 5%. Esaurito questo primo tempo di incubazione si estrae la piastra dall'incubatore e si procede con la preparazione della fase successiva. Dentro una nuova piastra si preparano i pozzetti per i controlli negativi e positivi, oltre che per i campioni. Il controllo negativo è costituito da acqua microfiltrata sterile e il controllo positivo sempre da SDS 5%. Sulla base di ogni pozzetto si adagia una quantità di campione da testare, che ha come limite di soglia minima 0.25 µl. In caso di campioni di natura solida è consigliabile inumidire la pelle con acqua deionizzata o distillata per favorire l'adesione, dopo averli eventualmente polverizzati.

Elemento caratterizzante questo test è che la misura della vitalità cellulare non è rilevata immediatamente dopo il tempo di contatto con l'agente chimico, ma dopo un tempo ragionevolmente lungo, durante il quale, il tessuto viene posto in medium fresco. Questo tempo permette di rendere visibili i danni di una leggera irritazione e di far apparire chiaramente i danni di un severo effetto citotossico.

Dopo questo tempo di incubazione, di durata consigliata di 42 ore, si procede con il saggio MTT. I tessuti vengono messi a contatto con una soluzione di MTT, per un tempo di 3 ore, trascorso il quale si procede all'estrazione con isopropanolo.

Trascorse minimo 2 ore a temperatura ambiente e al buio, si estrae la piastra dalla copertura di alluminio e si allestisce la piastra a 96 pozzetti per la lettura con lo spettrofotometro. L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è

direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare. La densità ottica (OD) è misurata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda pari a 570 nm. Il grado di vitalità cellulare e quindi il grado di tossicità del composto testato, è esprimibile con la seguente formula:

$$\% \text{ vitalità cellulare} = \left[\frac{\text{OD (570 nm) composto testato}}{\text{OD (570 nm) controllo negativo}} \right] \times 100$$

In base al risultato ottenuto il composto in esame è classificato nel seguente modo, secondo le indicazioni riportate nel protocollo fornito:

- Vitalità cellulare inferiore o uguale al 50% = Composto irritante
- Vitalità cellulare superiore al 50% = non irritante.

2.2 PROGRAMMA DI LAVORO

Il campione utilizzato per il test di skin irritation è una crema gel.

GIORNO 1

- Arrivo del kit, contenete la piastra con le 12 inserti immersi in gel di agarosio nutriente, un medium di mantenimento.
- Effettuato il trasferimento degli inserti (con pinze sterili) in una nuova piastra contenente 1 ml di medium di mantenimento
- Incubate un'ora a 37° C, con CO₂ al 5%.

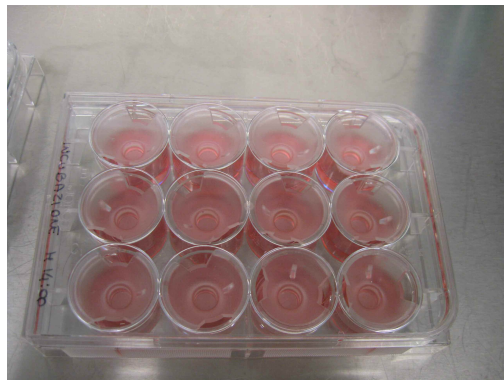


Figura 7 Piastra con le unità in Maintenance medium

Preparazione della piastra per l'analisi: 4 pozzetti riempiti con 2 g di campione in esame, 3 pozzetti riempiti con 2 ml di controllo positivo e 2 pozzetti riempiti con 2 ml di controllo negativo; in ogni pozzetto è trasferito un inserto.

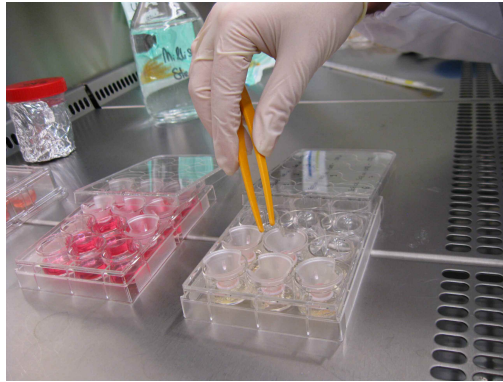


Figura 8 Trasferimento delle unità a contatto con il campione

- Incubazione per 15 minuti a 37° C, con CO₂ al 5%.
- Trasferimento delle unità in un'altra piastra, contenente 2 ml di medium di mantenimento.
- Incubazione per 42 ore a 37° C, con CO₂ al 5%.

GIORNO 2

- Incubazione per 42 ore a 37° C, con CO₂ al 5%.

GIORNO 3

- Cessato il tempo di incubazione di 42 ore, estrazione della piastra dall'incubatore e riposizionamento degli inserti (4 unità di campione, 3 controlli positivi e 2 controlli negativi), in una nuova piastra, contenente 1.5 ml/pozzetto di soluzione MTT 0.5 mg/ml.
- Incubazione della piastra per 3 ore a 37° C, con CO₂ al 5%.
Al termine dell'incubazione trasferimento degli inserti in una nuova piastra contenente 1.5 ml di isopropanolo per pozzetto
- Incubazione di 2 ore al buio a temperatura ambiente.
- Allestimento di una piastra da 96 pozzetti: recupero dell'estratto da ciascun pozzetto e aliquotato in 5 repliche da 200 µl/pozzetto. Lettura allo spettrofotometro, con $\lambda = 570$ nm.

RISULTATI E CONCLUSIONI

3.1 RISULTATI OCULAR IRRITATION

Dopo il test della vitalità cellulare (MTT test), è stata allestita una piastra da 96 pozzetti con circa 200 µl/pozzetto di ciascuna soluzione ottenuta, secondo lo schema sotto riportato.

Campione replica 1	Campione replica 2	Campione replica 3	Campione replica 4	Ctrl - replica 1	Ctrl - replica 2	Ctrl + replica 1	Ctrl + replica 2	Ctrl + replica 3
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Tabella 2 Schema della piastra a 96 pozzetti utilizzata per la lettura della OD a 570 nm

Già ad occhio nudo è stato possibile rilevare una differenza di colorazione tra i pozzetti del campione e del controllo negativo (blu-violetto) e quelli del controllo positivo (giallo pallido).



Figura 9 Piastra a 96 pozzetti dopo estrazione con isopropanolo.

E' stata effettuata la lettura spettrofotometrica a $\lambda=570$ nm della piastra così preparata; i valori di OD ottenuti sono stati mediati ed utilizzati per il calcolo della percentuale di vitalità cellulare secondo la formula proposta dal protocollo e di seguito riportata:

$$\% \text{ vitalità} = \left[\frac{(\text{OD } 570 \text{ nm}) \text{ composto testato}}{(\text{OD } 570 \text{ nm}) \text{ controllo negativo}} \right] * 100$$

Campione replica 1	Campione replica 2	Campione replica 3	Campione replica 4
1,0336	0,9059	0,955	0,9584
0,8712	0,862	0,9342	0,8292
0,7732	0,7818	0,7708	0,7838
0,6749	0,7183	0,6811	0,7262
0,6852	0,5936	0,7181	0,763

Tabella 3 Tabella che riporta dati di assorbanze a 570 nm dei campioni.

Ctrl – replica 1	Ctrl – replica 2	Ctrl + replica 1	Ctrl + replica 2	Ctrl + replica 3
0,699	0,681	0,1104	0,1121	0,0982
0,6298	0,6526	0,101	0,1077	0,0922
0,6195	0,5702	0,1034	0,1051	0,0859
0,6341	0,6362	0,1013	0,1136	0,088
0,6498	0,6783	0,1082	0,1171	0,0995

Tabella 4 Tabella che riporta dati di assorbanze a 570 nm dei controlli positivi e negativi.

REPLICA	MEDIA CAMPIONE	MEDIA CTRL -	MEDIA CTRL +
1	0.80762	0.64644	0.10486
2	0.77232	0.64366	0.11112
3	0.81184	-	0.09276
4	0.81212	-	-
		-	-
MEDIA TOTALE	0,800975	0,64505	0,102913

Tabella 5 Tabella che riporta i valori mediati delle repliche del campione, dei controlli positivi e dei controlli negativi.

Si è quindi proceduto alla comparazione dei risultati:

- tra campione e controllo negativo:

$$\% \text{ vitalità campione} = 124,1725$$

- tra controllo positivo e controllo negativo:

$$\% \text{ vitalità CTRL +} = 15,9543$$

3.2 RISULTATI SKIN IRRITATION

Anche per il test di skin irritation dopo il test della vitalità cellulare (MTT test), è stata allestita una piastra da 96 pozzetti con circa 200 µl/pozzetto di ciascuna soluzione ottenuta, secondo lo schema sotto riportato.

Campione replica 1	Campione replica 2	Campione replica 3	Campione replica 4	Ctrl - replica 1	Ctrl - replica 2	Ctrl + replica 1	Ctrl + replica 2	Ctrl + replica 3
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Tabella 6 Schema della piastra a 96 pozzetti utilizzata per la lettura della OD a 570 nm

Già ad una prima occhiata è stato possibile rilevare una differenza di colorazione tra i pozzetti del campione e del controllo negativo (blu-violetto) e quelli del controllo positivo (giallo pallido).



Figura 10 Piastra a 96 pozzetti dopo estrazione con isopropanolo.

E' stata effettuata la lettura spettrofotometrica a $\lambda=570$ nm della piastra così preparata; i valori di OD ottenuti sono stati mediati ed utilizzati per il calcolo della percentuale di vitalità cellulare secondo la formula proposta dal protocollo e di seguito riportata:

$$\% \text{ vitalità} = \left[\frac{(\text{OD } 570 \text{ nm}) \text{ composto testato}}{(\text{OD } 570 \text{ nm}) \text{ controllo negativo}} \right] * 100$$

Campione replica 1	Campione replica 2	Campione replica 3	Campione replica 4
1.0363	0.9509	0.9505	0.9845
0.7821	0.8260	0.9243	0.8922
0.7327	0.7188	0.7870	0.7883
0.7946	0.7318	0.6811	0.7622
0.6285	0.5369	0.7118	0.7306
0.2753	0.4052	0.4478	0.5226

Tabella 7 Tabella che riporta dati di assorbanze a 570 nm dei campioni.

Ctrl – replica 1	Ctrl – replica 2	Ctrl + replica 1	Ctrl + replica 2	Ctrl + replica 3
0.6909	0.6920	0.0495	0.0495	0.0495
0.6892	0.6632	0.0493	0.0474	0.0489
0.6591	0.5726	0.0520	0.0473	0.0506
0.6130	0.6263	0.0507	0.0470	0.0495
0.6582	0.6367	0.0523	0.0484	0.0481
0.4569	0.5625	0.0418	0.0382	0.0374

Tabella 8 Tabella contenente le assorbanze a 570 nm dei controlli positivi e negativi.

Tabulate le assorbanze si è passati all'elaborazione per verificare l'eventuale citotossicità del campione. Si è proceduto calcolando la media di ogni campione, poi la media dei quattro campioni e così anche per i controllo positivi e negativi.

REPLICA	MEDIA CAMPIONE	MEDIA CTRL -	MEDIA CTRL +
1	0.7948	0.6621	0.0507
2	0.7529	0.6381	0.0479
3	0.8109	-	0.0493
4	0.8316	-	-
		-	-
MEDIA TOTALE	0.7975	0.6501	0.0493

Tabella 9 Tabella che riporta i valori mediati delle repliche del campione, dei controlli positivi e dei controlli negativi.

Si è quindi proceduto alla comparazione dei risultati:

- tra campione e controllo negativo:

$$\% \text{ vitalità campione} = 122,6781$$

- tra controllo positivo e controllo negativo:

$$\% \text{ vitalità CTRL +} = 7,5882$$

CONCLUSIONI

Per il saggio di ocular irritation, il protocollo fornito, classifica:

- Vitalità cellulare inferiore al 60% = Composto irritante
- Vitalità cellulare uguale o superiore al 60% = Composto non irritante.

Poiché il campione testato presenta una vitalità cellulare superiore al 60%, il campione risulta essere non irritante.

Per il saggio di skin irritation, la OECD Draft Proposal for a new Guideline “*In Vitro* Skin Irritation: Human Skin Model Test”, classifica:

- Vitalità cellulare inferiore al 50% = Composto irritante
- Vitalità cellulare maggiore o uguale al 50% = Composto non irritante

Poiché il campione testato presenta una vitalità cellulare superiore al 50%, il campione risulta essere non irritante.

In entrambi i casi, i campioni, crema gel e collirio, come atteso sono risultati classificabili come non irritanti e si è confermata l'azione irritante e tossica del controllo positivo SDS alle concentrazioni di utilizzo.

La classificazione dei campioni come non irritanti, non assicura che l'utilizzo prolungato della crema-gel o del collirio non possa rendere ipersensibile la pelle o l'occhio, scatenando poi reazioni di tipo infiammatorio, poiché i protocolli applicati sono saggi di tossicità acuta *in vitro*.

Per avere una conferma dell'effetto sensibilizzante sarebbe necessario un tipo di test che misuri la presenza o l'assenza di secrezione di fattori della risposta infiammatoria. Anche questo test, però, si rivelerebbe limitato, perché nell'organismo vivente il tessuto è vascolarizzato, mentre gli inserti non lo sono. Si può giungere quindi alla conclusione che in linea generale i campioni testati sono risultati essere non irritanti *in vitro*, ma non si può escludere completamente che siano sensibilizzanti *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- Flavia Zucco, Vera Bianchi “Nozioni di colture cellulari”; Lombardo Editore (1994).
- Paola Defilippi, Guido Tarone “Colture cellulari: tecniche di base”; I manuali delle scuole (1999).
- OECD 404, Guideline for the testing of chemicals “Acute dermal/irritation Corrosion” (2002).
- OECD Guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for a new guideline “*In Vitro* skin irritation: human skin model test”;
- Lecture: skin model as alternatives to animal testing. Follow up validation of the modified EpiDerm Skin Irritation Test (SIT): results of a multi-centre study of twenty reference test substance (2008).
- www.skinethic.com
- www.deiitalia.it/bibliografia

RINGRAZIAMENTI

Solo poche parole per ringraziare.

Ringrazio il Prof.re Baroni, per avermi dedicato tempo, disponibilità, pazienza, per avermi aiutato ad arrivare fino alla fine di questo percorso.

Ringrazio la Dott.ssa Cattapan, per avermi dato la possibilità di poter svolgere il tirocinio anche per così poco tempo nei laboratori di microbiologia farmaceutica e biologia cellulare.

Ringrazio Daniela, Francesca e Lucia per avermi accolto con entusiasmo nel gruppo di lavoro, per aver avuto pazienza e per avermi insegnato quello che in questo breve periodo ho imparato, nonché per il tempo dedicato ai buoni consigli.

Un ultimo ringraziamento alla pazienza di parenti e amici.