



# Risparmiamo le cavie!

*Il Local Lymph Node Assay (LLNA), la riduzione della sofferenza animale e il cammino verso test in vitro efficaci per la predizione dell'allergenicità*

Oltre il 15% della popolazione soffre di allergie. La Comunità Europea con il programma REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals), in via di approvazione, si propone di rivedere la regolamentazione per l'autorizzazione all'immissione in commercio delle sostanze chimiche, inclusi i farmaci. Reach impone tra l'altro l'effettuazione di saggi per la tossicità cronica e test allergo-tossicologici. D'altro canto, la sensibilità dell'opinione pubblica per la sofferenza animale ha generato sollecitazioni normative per l'utilizzo di test in vivo meno invasivi, o idealmente in vitro, anche per la predizione del potenziale sensibilizzante. Il Local Lymph Node assay (LLNA) ha i requisiti per sostituire oggi i tradizionali test su cavia, sia per le minori sofferenze che comporta, sia perché affianca efficacemente lo sforzo per disegnare efficaci test in vitro, ancora non disponibili.

## Background scientifico

La dermatite allergica da contatto deriva da una risposta T-linfocitaria contro allergeni che vengono a contatto con la cute. Ci occupiamo qui in particolare del caso di sostanze chimiche di sintesi, o naturali, che possono penetrare attraverso la barriera cutanea. Se, come accade nella maggior parte dei casi, le molecole allergeniche sono di piccole dimensioni, esse non possono essere direttamente

riconosciute dal sistema immune. Tuttavia, possono comportarsi come apteni, ovvero come residui reattivi con proteine dell'ospite, dette carrier, e formare complessi aptene-carrier immunologicamente "visibili". Il complesso aptene-carrier è internalizzato (endocitato) e processato da cellule la cui funzione è detta "presentazione dell'antigene" (cellule del Langerhans dell'epidermide). Queste ultime migrano con il complesso antigene-carrier al linfonodo locoregionale per l'area cutanea di contatto e vi forniscono lo stimolo iniziale per linfociti T specifici detti "naive". Questi differenziano successivamente a linfociti T effettori della reazione allergica, detti di tipo memoria. Questi ultimi al successivo incontro con l'antigene saranno reclutati alla sede di contatto. Il Local Lymph Node Assay (LLNA) misura in un modello murino l'entità della proliferazione T linfocitaria, indotta dall'esposizione ripetuta all'allergene a livello dei padiglioni auricolari, a carico delle cellule della stazione linfatica anatomicamente relativa a tale area, ovvero i linfonodi reatroauri-

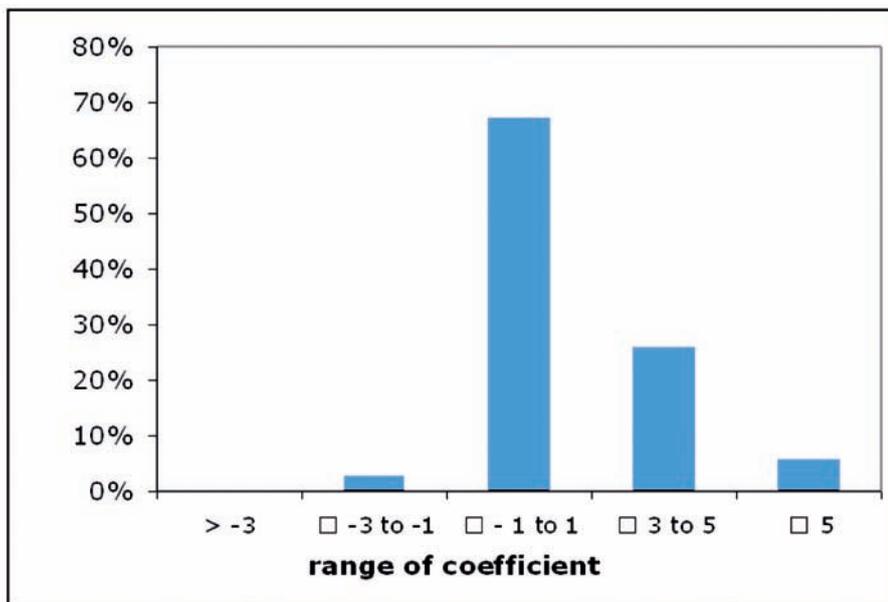
colari. Esso rappresenta un modello che ricapitola tutti i passaggi che portano nell'uomo alla reazione allergica da contatto.

## Background normativo

Fino a pochi anni fa erano disponibili per lo screening del potenziale allergizzante di una sostanza, solo test su cavia quali il Magnusson Kligman Guinea-pig Maximisation test (GMPT) e il Buheler test che, oltre ad avere alcuni limiti di specificità, comportavano un utilizzo di animali piuttosto elevato, e l'imposizione a essi di un certo livello di sofferenza. A fronte del numero notevole di sostanze da saggiare, e della sensibilità dell'opinione pubblica nei confronti dell'utilizzo di animali sperimentali, la Comunità Europea ha sponsorizzato attraverso Organismi preposti (ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods) la messa punto dell'LLNA, oggi accettato anche dalla corrispondente autorità regolatoria degli USA, che richiede minor numero di animali e minore sofferenza degli stessi, pur man-

### Abbreviazioni

DEREK	Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
GMPT	Magnusson Kligman Guinea-pig Maximisation test
LLNA	Local Lymph Node Assay
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
REACH	Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals
SI	Indice di stimolazione



**Figura 1 - Distribuzione percentuale degli allergeni secondo l'indice di ripartizione acqua/ottanolo. La figura permette di apprezzare come la maggior parte degli allergeni siano dei permeanti cutanei buoni o ottimi [10]**

tenendo, e anzi migliorando, la predittività del potenziale allergizzante. In prosecuzione di questa strategia, la Comunità è orientata oggi alla messa a punto di test in vitro, che consentano di limitare o eliminare del tutto l'utilizzo di animali. Tuttavia, non ci sono attualmente test in vitro validati per tale specifica applicazione tossicologica. Questo sforzo normativo sarà integrato nel programma REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals), la cui entrata in vigore è imminente.

### LLNA: la metodica in breve

La sostanza da valutare deve essere applicata per tre giorni consecutivi, in un volume di circa 25 microlitri, sulla superficie esterna di entrambi i padiglioni auricolari di almeno quattro topi femmine del ceppo CBA/Ca o CBA/J,

nullipare e non gravide, di età compresa tra 8 e 12 settimane, e con differenze relative di peso non eccedenti il 20% [1, 2]. L'applicazione avviene senza alcun traumatismo a concentrazioni che, sulla base delle informazioni tossicologiche già disponibili, non siano direttamente irritanti, corrosive, o dotate di tossicità sistemica. Almeno tre concentrazioni devono essere applicate, per ogni gruppo di topi. Un gruppo di uguale numerosità è trattato con un veicolo (preferibilmente una miscela acetone/olio di oliva 4/1 vol/vol) e un altro con una sostanza sensibilizzante (per esempio hexyl cinnamic aldehyde o dinitrofluorobenzene) (controlli negativo e positivo, rispettivamente). Non è necessaria una fase di richiamo e, dopo due giorni di "riposo", il giorno 5 gli animali sono inoculati con 20 µCi di timidina tritiata in un volume di 25 microlitri, in vena caudale. Cin-

que ore dopo l'infusione del radioattivo, gli animali sono sacrificati, i linfonodi retroauricolari asportati chirurgicamente, manualmente dissezionati e le cellule linfonodali disaggregate meccanicamente, lavate in un tampone isototonico. La componente proteica di tali preparazioni cellulari viene precipitata in acido tricloroacetico e la radioattività presente sul filtro di precipitazione, proporzionale alla proliferazione linfocitaria, contata con un beta counter. I risultati sono espressi come valore medio di disintegrazioni (o conte) per minuto (DPM) per ogni trattamento. Il rapporto tra le DPM del gruppo considerato e quelle del gruppo trattato con il veicolo è definito indice di stimolazione (SI). Per il controllo positivo è accettabile un SI superiore a 3, che è anche valore di cut-off per formulare un referto di positività. Le principali differenze tra LLNA e i test su cavia da una parte e nell'uomo dall'altra sono riassunte nelle tavole I e II, rispettivamente.

### LLNA e quantificazione del potenziale allergizzante attraverso EC3

Sebbene il LLNA fornisca un semplice ed efficace strumento per l'identificazione di sostanze chimiche che possono comportarsi come allergeni da contatto, va precisato che questo è insufficiente per una compiuta valutazione di rischio. Infatti, il rischio per l'uomo deve tenere conto di fattori quali la frequenza, la durata e la modalità di contatto, e la potenza dell'allergene. Mentre le prime variabili non dipendono intrinsecamente dall'allergene, ma piuttosto dalla modalità secondo la quale è usato, la potenza allergenica è in effetti una proprietà intrinseca della sostanza chimica, e può essere misurata con il LLNA. L'uso della stima della potenza allergenica ha ricevuto molti consensi, da quando è stato proposto quasi 10 anni fa. La potenza allergenica è stimata attraverso il parametro EC3 (tabella 3) che corrisponde alla concentrazione necessaria a indurre una proliferazione nei topi trattati pari a tre volte quella dei controlli [3-7]. A fini regolatori, tale opportunità di quantificare l'allergenicità consente di distinguere allergeni secondo una scala di potenza definita (tabella 4). Questo ovviamente consente di precisare per singoli allergeni una concentrazione limite, invece di

**Tabella 1. Test su cavia e LLNA a confronto**

	LLNA	TEST SU CAVIA
Sensibilità	Buona o ottima	Buona o ottima
Fase di induzione	Necessaria	Necessaria
Fase di richiamo	Non necessaria	Necessaria
Parametro di lettura	Oggettivo e strumentale	Soggettivo
Manipolazione animale richiesta	Minima	Notevole
Utilizzo di adiuvante	Non richiesto	Richiesto
Conoscenze scientifiche sulla specie utilizzata	Il topo è la specie sperimentale più utilizzata per studi immunologici	La cavia non è utilizzata per studi immunologici
Durata del test	Giorni	Settimane
Sofferenza animale	Limitata o assente	Talora notevoli
Numero di animali	Quattro per dose	Circa 20 per dose
Studi di validazione intra- e inter-laboratorio	Molti disponibili	Non disponibili



usare un valore default (per lo più 1%) ovvero criteri anche più restrittivi. Come sopra ricordato, è stata dimostrata una correlazione tra l'allergenicità nell'uomo di molte sostanze (determinata per esperienza clinica e con test a insulto ripetuto) e la potenza allergenica determinata tramite EC3 con LLNA [8]. Inoltre, la riproducibilità inter-laboratorio e intra-laboratorio del parametro EC3 è stata oggetto di studi esaustivi [3-6, 9], che ne hanno definitivamente confermato la robustezza.

### LLNA e sviluppo di test *in silico*

Il LLNA è l'unico tra i test di quantificazione dell'allergenicità, in forza della sua capacità di quantificare il parametro, a fornire le basi per lo sviluppo di metodiche innovative e alternative all'animale. A mano a mano che nuove sostanze vengono studiate con tale metodica validata, si implementano anche dati di valore orientativo, che teoricamente possono contribuire a ridurre l'utilizzo di animali (si veda a es. Gerberick) [10]. Sulla base della conoscenze esistenti, e in continua implementazione attraverso l'applicazione dell'LLNA a sostan-

ze chimiche mai valutate in precedenza [10], sono state implementate analisi sistematiche attraverso "sistemi esperto" come il DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge) [11]. Su questa base è stato evidenziato come parametri cruciali per determinare l'allergenicità risultino il peso molecolare (tabella V) e la penetrazione attraverso la cute (tabella VI), deducibili attraverso l'indice di ripartizione acqua/ottanolo o attraverso l'indice di penetrazione cutanea (figura 1).

### LLNA e test *in vitro*

Un'ulteriore potenzialità del LLNA risiede nella possibilità di identificare sostanze quantificate per potenzialità sensibilizzante da introdurre in test *in vitro* in fase di pre-validazione. Sebbene non via siano test in fase di avanzata validazione, è accettato che sono i modelli che utilizzano cheratinociti, cellule di Langerhans, cellule dendritiche e co-culture cellulari (per esempio linfociti e cellule presentanti l'antigene) quelli più adeguati a riprodurre i molteplici step che stanno alla base della generazione della dermatite allergica da contatto [12]. Inol-

**Tabella 4. Classificazione della potenza allergenica relativa tramite LLNA**

EC3 (%)	CLASSIFICAZIONE
≥ 10 to ≤ 100	debole
≥ 1 to < 10	moderata
≥ 0.1 to < 1	forte
< 0.1	estrema

**Tabella 5. Distribuzione delle caratteristiche fisicochimiche (peso molecolare in Dalton, MW) in 169 sostanze identificate come allergeni da contatto di varia potenza tramite LLNA [10]**

MW	N
< 100	10 (0E, 2F, 3M, 5D)
≥ 100 to 200	89 (5E, 11F, 45M, 28D)
≥ 200 to 300	45 (7E, 4F, 12M, 22D)
≥ 300 to 400	23 (1E, 3F, 8M, 11D)
≥ 400	2 (0E, 1F, 1M, 0D)
Total	169

**Le lettere indicano la potenza allergenica, secondo la classificazione riportata in tabella IV: E = estrema, F = forte, M = moderata, W = debole**  
**Tabella 6. Distribuzione delle caratteristiche fisicochimiche (permeabilità cutanea espressa come Log Ko/ww = Log dell'indice di ripartizione acqua/ottanolo) in 169 sostanze identificate come allergeni da contatto di varia potenza tramite LLNA [10]**

tre, è indubbio che un singolo test *in vitro* non potrà mai ricapitolare una tale numerosità di passaggi biologici, e che una combinazione di più test sarà necessaria per ottenere una significativa predizione di allergenicità [12]. In questa prospettiva, oltre allo sforzo organizzativo necessario a realizzare questo obiettivo, sarà necessario lavorare su sostanze o gruppi di sostanze la cui allergenicità è stata accuratamente quantificata per evidenza clinica e con LLNA. Un ulteriore aspetto di questo problema risiede nella possibilità di utilizzare *in vitro* valutazioni preliminari sistematiche di ampi pannelli di sostanze con linee cellulari monocitoidi di origine umana, che hanno comportamenti riconducibili a cellule del sistema immune coinvolte nel processo di generazione dell'allergie (per esempio THP-1) [13-15]. Tali cellule, pur con alcuni limiti, sono assai più agevoli alla manipolazione e meno costose, rispetto alle linee primarie (dendritiche, cheratinociti, linfociti) e si sono rivelate, anche nelle nostre mani [16], strumenti importanti nella predizione del potenziale sensibilizzante.

**Tabella 2. LLNA e test sull'uomo a confronto**

	LLNA	TEST SULL'UOMO
Sensibilità	Buona o ottima	Dipendente dal numero di soggetti testati
Fase di induzione	Necessaria	Necessaria
Fase di richiamo	Non necessaria	Necessaria
Parametro di lettura	Oggettivo e strumentale	Soggettivo
Omogeneità genetica della specie	Elevata	Bassa (= richiede più soggetti per un risultato statisticamente significativo)
Conseguenze permanenti sulla salute umana	Nessuna	Possibili, anche gravi
Studi di validazione intra- e inter-laboratorio	Molti disponibili	Non disponibili

**Tabella 3. Definizione della potenza allergenica per mezzo del LLNA attraverso il parametro EC3**

Il valore EC3 indica la concentrazione della sostanza saggiata in grado di indurre una proliferazione dei linfociti dei linfonodi retroauricolari tre volte superiore ai controlli (ovvero un indice di stimolazione o SI > 3).

Il valore si può estrapolare per interpolazione a partire dalle coordinate (concentrazione e proliferazione) che hanno indotto un indice di stimolazione immediatamente superiore (a,b) e inferiore (c,d) a 3, rispettivamente, secondo la formula:

$$EC3 = c + [(3-d)/(b-d)] (a-c)$$

# CARTUCCE FILTRANTI PER LIQUIDI

*La Fluxa Filtri Spa ha una trentennale esperienza nel settore delle cartucce filtranti, e dispone con consegna pronta dal magazzino di Milano di una vasta gamma di cartucce filtranti.*

- Cartucce filtranti in polipropilene
- Cartucce in filo avvolto di cotone, cellulosa, polipropilene, fibra di vetro ecc.
- Cartucce impregnate di resina per la filtrazione di vernici resine e inchiostri
- Cartucce in rete di acciaio inossidabile
- Cartucce in acciaio inossidabile poroso sinterizzato
- Cartucce in microfibre di acciaio inox sinterizzate



*Cartucce filtranti in microfibra*



*Cartucce filtranti in filo avvolto*



*Cartucce filtranti in rete inox*



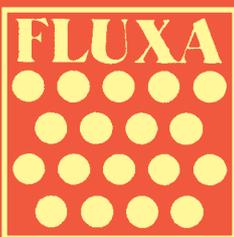
*Cartucce filtranti impregnate in resina per vernici, resine ecc.*



*Cartucce filtranti in carbone attivo*



*Cartucce filtranti in microfibre di acciaio inox sinterizzate. Per vapore e per fluidi viscosi*



# Fluxa Filtri S.p.A.

Via Alberto Mario, 19 - 20149 Milano  
Tel. 0243808.1 (15 linee) - Fax 024817227 - 0248012614  
E-mail: [liquid@fluxafiltri.com](mailto:liquid@fluxafiltri.com) - [www.fluxafiltri.com](http://www.fluxafiltri.com)

Agente per l'Italia Meridionale:  
SIRE - Via Sannio, 9 - 80146 Napoli  
Tel. 0817349254 - 0817349310 - Fax 0817349317



**Tabella 6. Distribuzione delle caratteristiche fisicochimiche (permeabilità cutanea espressa come Log Ko/w = Log dell'indice di ripartizione acqua/ottanolo) in 169 sostanze identificate come allergeni da contatto di varia potenza tramite LLNA [10]**

LOG <sub>Ko/w</sub> RANGE	SKIN PENETRATION	N
> -3	Ottimo permeante cutaneo, molto idrofobico	0
≥ -3 to -1	Modesto permeante cutaneo, idrofilico	4
≥ -1 to 1	Ottimo permeante cutaneo, amfilico	113
≥ 3 to 5	Buon permeante cutaneo, leggermente lipofilo	43
≥ 5	Modesto permeante cutaneo, a decrescere con l'aumento della logK <sub>o/w</sub>	9
totale		169

## Conclusioni

Riassumendo, il LLNA è l'unico saggio validato dalle Autorità preposte dalla Comunità Europea, dalle corrispondenti Autorità statunitensi e dall'OECD per la valutazione della allergotossicità, ovvero del potenziale di sostanze chimiche, inclusi i farmaci, di indurre sensibilizzazione allergica. Il LLNA rappresenta

un notevole miglioramento in termini di riduzione del numero degli animali necessari per ogni test e delle sofferenze imposte, rispetto ai tradizionali saggi su cavia. Inoltre, a differenza di questi ultimi, consente la quantificazione della potenza allergenica, dato estremamente importante per fini sia scientifici che normativi. Il LLNA avrà un'estesa appli-

cazione sistematica quando il sistema REACH per la registrazione delle sostanze chimiche sarà definitivamente implementato nella Comunità Europea, per produrre i dossier mancanti sulle sostanze esistenti al 1981 e mai sottoposte alle valutazioni richieste successivamente a quella data per tutte le nuove molecole prodotte dall'industria chimica. Infine, le informazioni rigorose ottenute con il LLNA costituiscono la migliore base di conoscenza per la validazione di test di allergicità in vitro a partire da adeguati pannelli, per numero e caratteristiche, di sostanze con allergicità nota rappresentative di gruppi definiti sulla base di caratteristiche chimico-fisiche omogenee.

## Afferenze degli autori

Samuele Burastero, Alltox – Science Park Raf e Istituto Scientifico San Raffaele  
Elena Bocchietto, Abich srl – Tecnoparco del Lago Maggiore

## Referenze

1. Kimber I., Hilton J. and Weisenberger C. The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. *Contact Dermatitis* 21:215-220 (1989).
2. Kimber I., Dearman R. J., Basketter D. A., Ryan C. A. and Gerberick G. F. The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* 47:315-328 (2002).
3. Basketter D. A., Lea L. J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R. J. and Kimber I. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J Appl Toxicol* 19:261-266 (1999).
4. Loveless S. E., Ladics G. S., Gerberick G. F., Ryan C. A., Basketter D. A., Scholes E. W., House R. V., Hilton J., Dearman R. J. and Kimber I. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 108:141-152 (1996).
5. Dearman R. J., Hilton J., Evans P., Harvey P., Basketter D. A. and Kimber I. Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J Appl Toxicol* 18:281-284 (1998).
6. Warbrick E. V., Dearman R. J., Lea L. J., Basketter D. A. and Kimber I. Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine: intra- and inter-laboratory evaluations. *J Appl Toxicol* 19:255-260 (1999).
7. Dearman R. J., Wright Z. M., Basketter D. A., Ryan C. A., Gerberick G. F. and Kimber I. The suitability of hexyl cinnamic aldehyde as a calibrant for the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 44:357-361 (2001).
8. Basketter D. A., Clapp C., Jefferies D., Safford B., Ryan C. A., Gerberick F., Dearman R. J. and Kimber I. Predictive identification of human skin sensitization thresholds. *Contact Dermatitis* 53:260-267 (2005).
9. Basketter D. A., Balikie L., Dearman R. J., Kimber I., Ryan C. A., Gerberick G. F., Harvey P., Evans P., White I. R. and Rycroft R. J. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42:344-348 (2000).
10. Gerberick G. F., Ryan C. A., Kern P. S., Schlatter H., Dearman R. J., Kimber I., Patlewicz G. Y. and Basketter D. A. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* 16:157-202 (2005).
11. Sanderson D. M. and Earnshaw C. G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system. *Hum Exp Toxicol* 10:261-273 (1991).
12. Basketter D., Casati S., Gerberick G. F., Griem P., Philips B. and Worth A. Skin sensitisation. *Altern Lab Anim* 33 Suppl 1:83-103 (2005).
13. Ashikaga T., Hoya M., Itagaki H., Katsumura Y. and Aiba S. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol. In Vitro* 16:711-716 (2002).
14. Mizuashi M., Ohtani T., Nakagawa S. and Aiba S. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124:579-586 (2005).
15. Yoshida Y., Sakaguchi H., Ito Y., Okuda M. and Suzuki H. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol. In Vitro* 17:221-228 (2003).
16. Bocchietto E., Paolucci C., Breda D., Sabbioni E. and Burastero S. E. Human monocytoïd THP-1 cell line versus monocyte-derived human immature dendritic cells as in vitro models for predicting the sensitising potential of chemicals. *Internat J Immunopath Pharmacol in the press* (2007).