

DIRETTIVA 2000/33/CE DELLA COMMISSIONE**del 25 aprile 2000****recante ventisettesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio
concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative
relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose(*)****(Testo rilevante ai fini del SEE)**

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

Articolo 1

vista la direttiva 67/548/CEE del Consiglio, del 27 giugno 1967, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose⁽¹⁾, modificata da ultimo dalla direttiva 1999/33/CE⁽²⁾ del Parlamento europeo e del Consiglio, in particolare l'articolo 28,

I testi degli allegati I e II della presente direttiva sono aggiunti all'allegato V, parte B, della direttiva 67/548/CEE.

Articolo 2

considerando quanto segue:

1. Gli Stati membri attuano le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva entro il 1° ottobre 2001. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

(1) L'allegato V della direttiva 67/548/CEE definisce i metodi di determinazione delle proprietà fisico-chimiche, della tossicità ed ecotossicità di sostanze e preparati. È necessario adeguare al progresso tecnico tale allegato.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate di un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità del riferimento sono decise dagli Stati membri.

(2) L'articolo 7, paragrafo 2, della direttiva 86/609/CEE⁽³⁾ concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici stabilisce che si eviterà di eseguire un esperimento qualora per ottenere il risultato ricercato sia ragionevolmente e praticamente applicabile un altro metodo, scientificamente valido, che non implichi l'impiego di animali.

2. Gli Stati membri informano la Commissione delle principali disposizioni nazionali che essi adottano nel settore disciplinato dalla presente direttiva e trasmettono una tabella che indichi le correlazioni tra la presente direttiva e tali disposizioni.

Articolo 3

La presente direttiva entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

(3) La Commissione intende introdurre all'allegato V della direttiva 67/548/CEE metodi di prova alternativi che non comportino l'impiego di animali per la sperimentazione di sostanze chimiche ai sensi dell'articolo 3, paragrafo 1, della direttiva 67/548/CEE.

Articolo 4

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

(4) Il disposto della presente direttiva è conforme al parere del comitato per l'adeguamento al progresso tecnico delle direttive volte all'eliminazione degli ostacoli tecnici agli scambi nel settore delle sostanze e dei preparati pericolosi,

Fatto a Bruxelles, il 25 aprile 2000.

Per la Commissione
Margot WALLSTRÖM
Membro della Commissione

(*) Adottata prima del ventiseiesimo adeguamento.

⁽¹⁾ GU 196 del 16.8.1967, pag. 1.

⁽²⁾ GU L 199 del 30.7.1999, pag. 57.

⁽³⁾ GU L 358 del 18.12.1986, pag. 1.

ALLEGATO I

«B.40. CORROSIONE CUTANEA

1. **METODO**1.1. **Introduzione**

Il Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (CECMA) del Centro comune di ricerca della Commissione europea ha confermato la validità scientifica di due saggi in vitro per determinare la corrosività cutanea di determinate sostanze. Trattasi del saggio di resistenza elettrica transcutanea della pelle di ratto (TER, transcutaneous electrical resistance) e di un saggio che utilizza un modello di cute umana (1) (2) (3). Lo studio di convalida del CECMA ha dimostrato che entrambi i metodi consentono di distinguere adeguatamente le sostanze che notoriamente sono corrosive per la pelle da quelle non corrosive. Inoltre, il protocollo del saggio che utilizza un modello di cute umana consente di distinguere i diversi gradi degli effetti corrosivi (agenti noti per essere estremamente corrosivi, R35 e altri agenti corrosivi, R34) (2). Di entrambi i saggi sono fornite la descrizione e le procedure. La scelta del saggio da utilizzare è dettata dai requisiti specifici e dalle preferenze dell'utilizzatore.

Cfr. anche la parte B nell'introduzione generale.

1.2. **Definizioni**

corrosione cutanea: produzione di danni irreversibili al tessuto cutaneo a seguito dell'applicazione di un materiale da saggiare.

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna specifica, ma cfr. i punti 1.5.3.4 e 1.7.2.3.

1.4. **Principio del metodo di saggio — Saggio di resistenza elettrica transcutanea della pelle di ratto**

Il materiale di saggio è applicato per un massimo di 24 ore alle superfici epidermiche di lembi di cute di forma circolare (dischi) ottenuti dal mantello di giovani ratti sacrificati in maniera non cruenta. I materiali corrosivi sono identificati in base alla loro capacità di intaccare la normale integrità dello strato corneo e della sua funzione protettiva in termini di riduzione della normale resistenza elettrica transcutanea (TER) al di sotto di un determinato livello soglia (5 kΩ) (4) (5). I materiali irritanti e non irritanti non riducono la TER al di sotto del livello soglia. Il saggio può comprendere anche una valutazione della capacità di legame con colorante per saggiare i surfattanti e le sostanze organiche neutre [per una definizione cfr. la voce bibliografica (6)] allo scopo di ridurre il numero dei risultati di falso positivo ottenuti specificatamente con questi tipi di sostanze chimiche (2) (7).

1.5. **Descrizione del metodo di saggio — Saggio di resistenza elettrica transcutanea della pelle di ratto**1.5.1. *Animali*

Per la preparazione dei dischi cutanei vengono utilizzati giovani ratti (ratti Wistar o un ceppo equivalente di 20-23 giorni). Con un'apposita tosatrice viene rimosso il pelo della parte dorsale e laterale dell'animale. L'animale viene quindi accuratamente strofinato e lavato lungo il dorso e i fianchi tenendo la parte tosata immersa in una soluzione antibiotica (contenente per esempio streptomycina, penicillina, cloramfenicolo e anfotericina in concentrazioni tali da inibire la proliferazione dei batteri). Dopo 3-4 giorni si procede ad un ulteriore lavaggio con antibiotici. Gli animali così trattati devono essere utilizzati entro tre giorni al massimo (per la produzione dei preparati cutanei gli animali non devono aver superato il 31° giorno di vita).

1.5.2. *Preparazione dei lembi cutanei*

Gli animali vengono sacrificati con un metodo non cruento. Si procede quindi alla rimozione della parte dorsale della cute e all'accurata eliminazione di tutto il grasso in eccesso. Il lembo cutaneo così ottenuto viene posizionato sull'estremità di una provetta in PTFE (politetrafluoroetilene) in modo che la superficie epidermica sia a contatto con la provetta, viene quindi fissato all'estremità della provetta mediante una ghiera inserita a pressione ed infine vengono eliminati gli orli di pelle debordante. La figura 1 indica le dimensioni della provetta e della ghiera. Infine la ghiera viene accuratamente saldata all'estremità della provetta mediante gelatina di petrolio. La provetta viene fissata mediante una pinza a molla e quindi introdotta in un recipiente contenente una soluzione di magnesio solfato (154mM) (figura 2).

1.5.3. *Procedura*1.5.3.1. *Applicazione del materiale di saggio*

Le sostanze da saggiare in forma liquida (150µl) vengono applicate alla superficie epidermica all'interno della provetta (figura 2). Per il saggio di materiali solidi la sostanza è applicata in quantità sufficiente al disco cutaneo in modo da coprire l'intera superficie dell'epidermide. Si aggiunge acqua deionizzata (150µl) sulla parte superiore del materiale solido ed infine si agita lievemente la provetta. Le sostanze da saggiare dovrebbero entrare in contatto con la cute il più possibile. A tale scopo, nel caso di alcuni materiali solidi occorre procedere a fusione della sostanza da saggiare innalzando la temperatura ad un massimo di 30°C, oppure macinando la sostanza fino a produrne un granulato o una polvere.

Per ciascuna sostanza da saggiare vengono utilizzati tre dischi cutanei. L'applicazione dura 24 ore (cfr. anche 1.5.3.4). La sostanza viene quindi completamente rimossa mediante lavaggio sotto un getto di acqua corrente ad una temperatura di 30 °C al massimo. Per facilitare l'eliminazione delle sostanze da saggiare che si sono solidificate all'interno della provetta si procede a lavaggio sotto acqua corrente a 30 °C circa.

1.5.3.2. Misurazione della TER

La TER viene misurata utilizzando un ponte dati a corrente alternata a basso voltaggio (ad esempio AIM 401 oppure 6401 o equivalente). Prima di misurare la resistenza elettrica viene ridotta la tensione di superficie della cute aggiungendo etanolo al 70% in quantità tale da coprire l'intera epidermide. Dopo alcuni secondi si procede alla rimozione dell'etanolo mediante inversione della provetta e in seguito all'idratazione del tessuto per mezzo di una soluzione di 3ml di magnesio solfato (154mM). Per misurare la resistenza in kΩ/disco si posizionano gli elettrodi del ponte dati su entrambi i lati del disco (figura 2). La figura 1 mostra le dimensioni degli elettrodi e la lunghezza della parte dell'elettrodo che rimane al di sotto delle pinze a coccodrillo. Nel corso della misurazione la molletta di fissaggio dell'elettrodo interno (il più spesso) viene collocata sull'estremità superiore della provetta affinché una buona parte dell'elettrodo rimanga immersa nella soluzione di magnesio solfato. L'elettrodo esterno (più sottile) è collocato all'interno del recipiente in modo tale che rimanga sul fondo. La distanza tra il lato inferiore della molletta di fissaggio e il fondo della provetta deve essere mantenuta costante (figura 1) poiché influisce sui valori della resistenza elettrica.

Va osservato che qualora il valore di resistenza superi i 20 kΩ, ciò potrebbe dipendere dal fatto che la sostanza ha formato un manto di rivestimento sulla superficie epidermica del disco cutaneo. Il rivestimento può essere rimosso ad esempio sigillando la provetta col pollice rivestito da un guanto e scuotendola per circa 10 secondi. Si procede dunque all'eliminazione della soluzione di magnesio solfato e si ripete la misurazione della resistenza con una nuova soluzione.

La media dei risultati dei valori riferiti alla TER viene accettata a condizione che i valori concomitanti positivi e negativi rientrino nel margine (range) accettabile per il metodo. Le sostanze di controllo da saggiare e i relativi valori minimi e massimi di resistenza accettabili per il metodo e le apparecchiature descritte sono i seguenti:

Controllo	Sostanza	Range delle resistenze (kΩ)
Positivo	10 M acido cloridrico (36%)	0,5-1,0
Negativo	Acqua distillata	10-25

1.5.3.3. Procedura specifica per tensioattivi e sostanze organiche neutre

Se i valori della TER di sostanze di saggio che rientrano nelle categorie dei tensioattivi o delle sostanze organiche neutre sono inferiori o pari a 5 kΩ, si può procedere ad una valutazione della penetrazione del colorante nel tessuto. Tale procedura consente di stabilire se si tratta di risultati falso positivi (2).

1.5.3.3.1. Applicazione e rimozione del colorante solforodamina B

Dopo il trattamento iniziale con la sostanza di saggio viene applicata alla superficie dell'epidermide di ciascun disco cutaneo una soluzione di 150 µl al 10% (p/v) di solforodamina B diluita in acqua distillata per un periodo di 2 ore. I dischi cutanei vengono quindi lavati sotto un getto di acqua corrente a temperatura ambiente per circa 10 secondi al fine di eliminare completamente il colorante. Ogni disco cutaneo viene quindi rimosso cautamente dalla provetta e collocato in una fiala (ad esempio una fiala di scintillazione in vetro da 20 ml) contenente acqua deionizzata (8 ml). Le fiale vengono poi agitate leggermente per 5 minuti per eliminare completamente il colorante. Questa procedura di risciacquo viene ripetuta per procedere quindi alla rimozione dei dischi cutanei che vengono successivamente collocati in fiale contenenti 5 ml di una sostanza al 30% (p/v) di sodio dodecil solfato (SDS) diluita in acqua distillata. Le fiale vengono quindi incubate per tutta la notte ad una temperatura di 60 °C. Dopo il periodo di incubazione ogni singolo disco cutaneo viene rimosso ed eliminato e la soluzione rimanente viene quindi centrifugata per 8 minuti ad una temperatura di 21 °C (forza centrifuga relativa ~ 175). Si preleva quindi un campione di 1 ml del supernatante che viene diluito in parte 1 a 5 (p/v) [ovvero 1 ml + 4 ml] in una soluzione di SDS al 30% (p/v) in acqua distillata. La densità ottica (DO) della soluzione viene misurata a circa 565 nm.

1.5.3.3.2. Calcolo del tenore del colorante

Per ogni disco cutaneo si calcola il tenore del colorante solforodamina B in base ai valori della DO (coefficiente di estinzione molare della solforodamina B a 565 nm = $8,7 \times 10^4$; peso molecolare = 580). Per ciascun disco cutaneo si stabilisce il tenore del colorante e si calcola la media del tenore per i replicati. I valori medi della colorazione sono accettati a condizione che i valori di controllo concomitanti rientrino nel range accettabile per il metodo. Il range del tenore del colorante ritenuto accettabile per le sostanze di controllo in base alla metodologia e alle apparecchiature descritte sono:

Controllo	Sostanza	Range del colorante (µg/disco)
Positivo	10 M Acido cloridrico (36 %)	40-100
Negativo	Acqua distillata	15-35

1.5.3.4. Ulteriori dati

Le sostanze da saggiare possono essere applicate ai dischi cutanei anche per periodi più brevi (ad esempio 2 ore) per identificare i materiali che sono estremamente corrosivi. Tuttavia nello studio di convalida è emerso che il saggio TER stimava in eccesso il potenziale corrosivo di una serie di sostanze chimiche da saggiare applicate ai dischi cutanei per 2 ore (2), sebbene consentisse di identificare correttamente le sostanze corrosive e quelle non corrosive dopo un'applicazione di 24 ore.

Le proprietà e le dimensioni delle apparecchiature e della procedura sperimentale utilizzata possono influire sui valori TER. La soglia di corrosività di 5 kΩ è stata stabilita sulla base di dati ottenuti con le apparecchiature specifiche e le procedure descritte nel presente metodo. Se le condizioni di saggio vengono modificate in maniera significativa è probabile che si debbano applicare soglie e valori di controllo diversi. Di conseguenza si raccomanda di calibrare la metodologia e i valori soglia di resistenza saggiando una serie di sostanze standard di riferimento scelte tra quelle utilizzate nel primo studio di convalida (3).

1.6. Principio del metodo di saggio — Saggio del modello di cute umana

Il materiale da saggiare viene applicato localmente ad un modello tridimensionale di cute umana per un massimo di 4 ore; tale modello comprende uno strato epidermico ricostruito in cui è presente anche uno strato corneo funzionale. I materiali corrosivi vengono identificati in base alla loro capacità di ridurre la vitalità delle cellule (ad esempio come nel caso del saggio di riduzione MTT) al di sotto di determinati livelli soglia per periodi di esposizione specifici. Il principio del saggio è basato sull'ipotesi che le sostanze chimiche corrosive sono in grado di penetrare lo strato corneo (per diffusione o erosione) e che la loro citotossicità è tale da provocare la necrosi degli strati cellulari sottostanti.

1.7. Descrizione del metodo di saggio — Saggio del modello di cute umana

1.7.1. Modelli di cute umana

I modelli di cute umana possono provenire da varie fonti, ma devono comunque soddisfare determinati criteri. Il modello di cute deve avere uno strato corneo funzionale e uno strato sottostante di cellule viventi. Lo strato corneo deve essere in grado di svolgere la sua funzione di barriera in modo adeguato. La sua funzionalità può essere appurata dimostrando la capacità di resistenza del modello di cute alla citotossicità mediante applicazione di sostanze notoriamente citotossiche per le cellule ma normalmente non in grado di attraversare la barriera dello strato corneo. Il modello deve poter fornire risultati riproducibili in condizioni sperimentali ben definite.

La vitalità delle cellule viventi nel modello cutaneo deve essere tale da consentire un'adeguata discriminazione tra le sostanze di controllo positive e negative. La vitalità cellulare (ad esempio misurata mediante la quantità di riduzione MTT, ovvero un valore della DO) dopo esposizione ad una sostanza di controllo negativa deve rientrare in limiti accettabili per il modello specificatamente utilizzato. Analogamente i valori della vitalità cellulare in riferimento alla sostanza di controllo positiva (correlati a quelli della sostanza di controllo negativa) devono rientrare in limiti specifici. È essenziale che il modello predittivo utilizzato rispetti gli standard di convalida internazionali (2).

1.7.2. Procedura

1.7.2.1. Applicazione del materiale di saggio

Nei saggi di materiali liquidi occorre applicare la sostanza da saggiare in quantità tale da coprire la superficie cutanea (almeno 25 µl/cm²). Nei saggi di materiali solidi si applica la sostanza da saggiare in quantità sufficiente da coprire la cute, quindi la si inumidisce per garantire un contatto ottimale con la cute. Eventualmente le sostanze solide devono essere polverizzate prima dell'applicazione. Il metodo di applicazione deve risultare adeguato per un'ampia gamma di tipi di sostanze chimiche (2). Al termine del periodo di esposizione il materiale da saggiare deve essere accuratamente rimosso dalla superficie cutanea mediante una soluzione salina.

1.7.2.2. Misurazione della vitalità cellulare

Per misurare la vitalità cellulare è possibile utilizzare qualsiasi metodo quantitativo convalidato. Il saggio generalmente più utilizzato è la riduzione MTT che in numerosi laboratori ha fornito risultati accurati e riproducibili (2). Il disco di cute viene collocato in una soluzione MTT di 0,3 mg/ml ad una temperatura di 20-28°C per 3 ore. Viene quindi estratto il prodotto precipitato blu formazan (estrazione per solvente) e misurata la concentrazione del formazan determinando la DO ad una lunghezza d'onda compresa fra 545 e 595 nm.

1.7.2.3. Ulteriori dati

Il modello cutaneo utilizzato e il protocollo preciso dei tempi di esposizione e delle procedure di lavaggio, ecc. incidono notevolmente sui dati della vitalità cellulare. Si raccomanda pertanto di calibrare la metodologia e il modello predittivo mediante analisi di una serie di standard scelti tra una gamma di sostanze chimiche utilizzate nello studio di convalida del CECMA (3). Il metodo utilizzato deve risultare riproducibile sia all'interno di un laboratorio che tra laboratori per numerose sostanze chimiche in base a standard internazionali. Come minimo il metodo dovrebbe soddisfare il criterio della validità scientifica definito in precedenza (2) e i risultati dello studio di convalida devono essere stati pubblicati in una rivista scientifica dotata di comitato di revisione.

2. DATI

2.1. Elaborazione dei risultati

2.1.1. Saggio TER della pelle di ratto

I valori della resistenza ($k\Omega$) del materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e tutte le sostanze chimiche standard di riferimento dovrebbero essere riportati in una tabella contenente i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione, i valori medi e le classificazioni ottenute.

2.1.2. Saggio del modello di cute umana

I valori della DO e i dati sulla vitalità cellulare calcolati in percentuale e relativi al materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e tutte le sostanze chimiche standard di riferimento dovrebbero essere riportati in una tabella contenente i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione, i valori medi e le classificazioni ottenute.

2.2. Valutazione e interpretazione dei risultati

2.2.1. Saggio TER della pelle di ratto

Se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza di saggio supera i 5 $k\Omega$, la sostanza non è corrosiva. Se tale valore è inferiore o pari a 5 $k\Omega$ e la sostanza da saggiare non è un surfactante o un organico neutro allora è corrosiva.

Per i surfactanti o le sostanze organiche neutre i cui valori TER sono inferiori o pari a 5 $k\Omega$ è possibile procedere ad una valutazione della penetrazione del colorante. Se il tenore medio del colorante sul disco cutaneo è superiore o pari al valore medio del tenore del colorante riferito alla sostanza di controllo positiva al 36 % di HCl ottenuto in concomitanza, allora la sostanza di saggio è un vero positivo ed è dunque corrosiva. Se il tenore medio è inferiore al tenore medio della sostanza di controllo positiva al 36 % di HCl ottenuta in concomitanza, allora la sostanza di saggio è un falso positivo e non è corrosiva.

2.2.2. Saggio del modello di cute umana

Il valore della DO del controllo negativo rappresenta il 100 % della vitalità cellulare, di conseguenza i valori DO ottenuti per ciascun campione da saggiare possono essere utilizzati per calcolare una percentuale di vitalità del controllo negativo. La percentuale critica della vitalità cellulare che differenzia i materiali di saggio corrosivi da quelli non corrosivi (o che distingue tra diverse classi di corrosività) deve essere chiaramente definita nel modello predittivo prima della convalida del metodo e il successivo studio di convalida deve dimostrare che tale valore critico è adeguato (cfr. riferimento bibliografico 2).

3. RELAZIONE

Relazione sul saggio

La relazione concernente l'intero saggio deve contenere almeno le seguenti informazioni:

Sostanza di saggio:

- dati inerenti l'identificazione, la natura fisica ed eventualmente le proprietà fisico-chimiche. Questi dati dovrebbero essere forniti anche per le sostanze di riferimento, se utilizzate.

Condizioni di saggio:

- descrizione dettagliata della procedura utilizzata;
- descrizione e motivazione di eventuali modifiche.

Risultati:

- presentazione in forma tabulare dei valori della resistenza (saggio TER) o dei valori della vitalità cellulare (saggio del modello di cute umana) espressi in percentuale per il materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e qualsiasi altra sostanza chimica standard di riferimento, inclusi i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione e le medie;
- descrizione di qualunque altro effetto osservato.

*Discussione dei risultati**Conclusioni***4. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, pagg. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, pagg. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, pagg. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, pagg. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, pagg. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, pagg. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, pagg. 219-255.

Figura 1

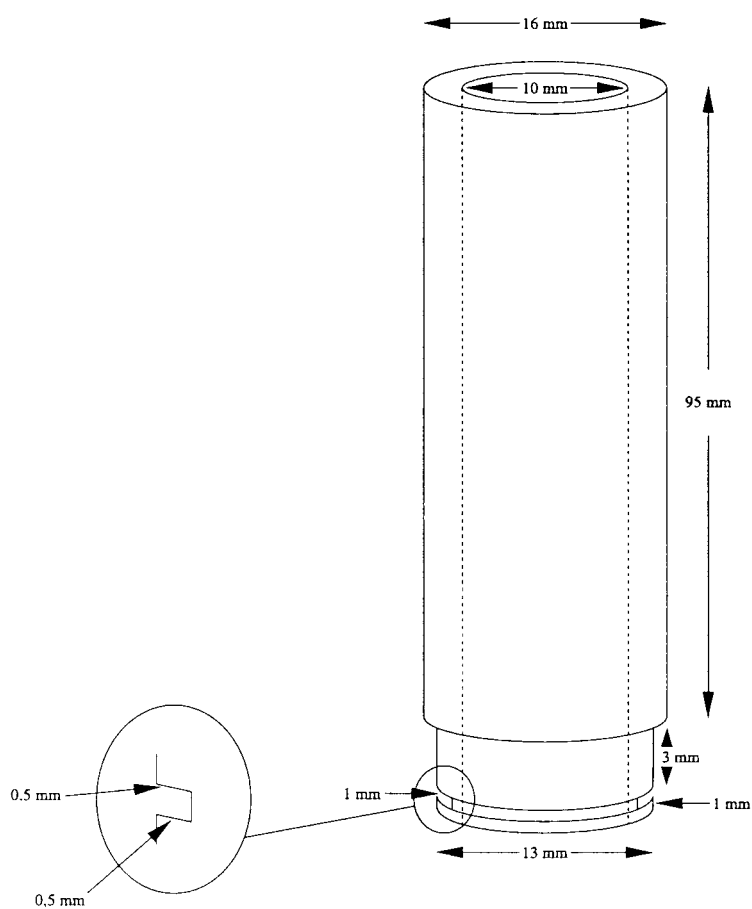
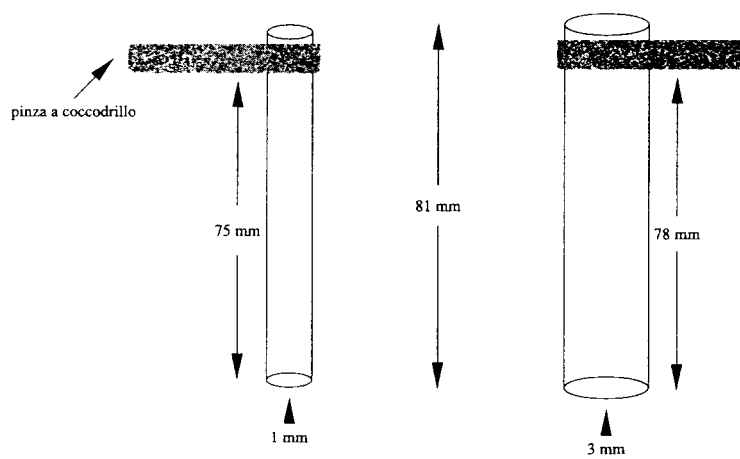
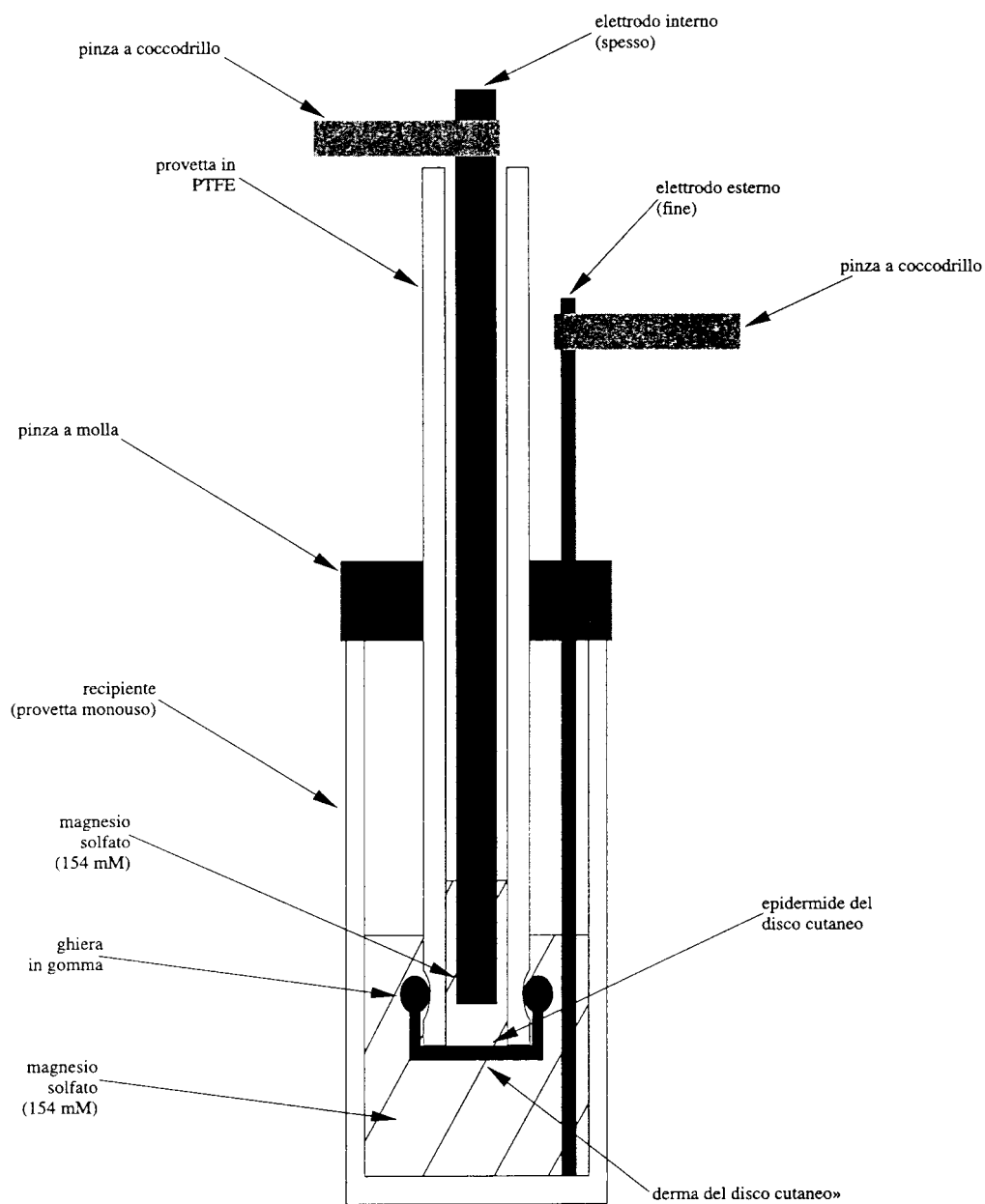
Dimensioni della provetta in PTFE**Dimensioni degli elettrodi**

Figura 2

Apparecchiatura per il saggio della TER della pelle di ratto

ALLEGATO II

«B.41. FOTOTOSSICITÀ — SAGGIO DI FOTOTOSSICITÀ IN VITRO 3T3 NRU

1. **METODO**1.1. **Introduzione**

Per fototossicità si intende la risposta tossica che si manifesta dopo esposizione primaria della cute ad alcune sostanze chimiche e successiva esposizione alla luce, o che è indotta analogamente da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

I dati ottenuti mediante il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU consentono di identificare il potenziale fototossico di una sostanza di prova, e cioè la presenza o l'assenza di eventuali rischi connessi alla sostanza di prova in associazione ad esposizione ai raggi UV e alla luce visibile.

Poiché l'«endpoint» tossicologico del saggio in vitro è la determinazione della fototossicità indotta dall'azione combinata di una sostanza chimica e della luce, il saggio permette di identificare i composti che sono fototossici in vivo dopo applicazione sistemica e distribuzione sulla cute e i composti con effetto fotoirritante dopo applicazione locale alla cute.

Il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU è stato sviluppato e validato nell'ambito di un progetto congiunto UE/COLIPA durante il periodo 1992-1997 (1) (2) (3), allo scopo di definire una valida alternativa in vitro ai vari saggi in vivo normalmente utilizzati. Nel 1996 un workshop dell'OCSE ha raccomandato l'uso di saggio sequenziali in vitro per la valutazione della fototossicità (4).

I risultati del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU sono stati confrontati con gli effetti di fototossicità acuta/fotoirritazione in vivo in animali e soggetti umani, dimostrando così l'eccellente predittività del saggio per tali effetti. Il saggio non è progettato per prevedere altri effetti indesiderati che potrebbero derivare dall'azione combinata di una sostanza chimica e della luce, come ad esempio la fotogenotossicità, la fotoallergia e la fotocarcinogenicità, sebbene molte sostanze chimiche che presentano queste specifiche proprietà reagiscano positivamente al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU. Inoltre, il saggio non è progettato per consentire una valutazione del potere fototossico.

Nell'appendice è descritto un sistema sequenziale per l'esecuzione di prove di fototossicità su sostanze chimiche.

1.2. **Definizioni**

Irradiazione: l'intensità della luce ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, misurata in W/m^2 o mW/cm^2 .

Dose di luce: la quantità (= intensità × tempo) di radiazione ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, espressa in joule (= $W \times s$) per area di superficie, ovvero J/m^2 o J/cm^2 .

Bande di frequenza d'onda della luce UV: i valori raccomandati dalla CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) sono: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). Sono in uso, inoltre, altri valori: spesso la distinzione fra UVB e UVA viene posta a 320 nm e gli UVA possono essere suddivisi in UV-A1 e UV-A2, con una distinzione posta a circa 340 nm.

Vitalità cellulare: parametro che misura l'attività totale di una popolazione di cellule (ad esempio la captazione del colorante vitale rosso neutro nei lisosomi cellulari) che, in funzione dell'«endpoint» misurato e del tipo di saggio impiegato, è correlato al numero totale e/o alla vitalità delle cellule.

Vitalità cellulare relativa: vitalità cellulare espressa in relazione a controlli negativi (solventi) che sono stati sottoposti al saggio completo (+UV o -UV) senza trattamento con una sostanza chimica di prova.

Modello di predittività: algoritmo impiegato per trasformare i risultati di un saggio di tossicità in dati predittivi del potenziale tossico. In base alle linee guida per l'esecuzione del saggio è possibile utilizzare il PIF e l'MPE per la trasformazione dei risultati del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU in dati predittivi del potenziale fototossico.

PIF (Photo Irritation Factor): fattore ottenuto paragonando due concentrazioni di pari citotossicità (EC_{50}) della sostanza chimica di prova in assenza (-UV) e in presenza (+UV) di una irradiazione non citotossica con luce UVA/visibile.

MPE (Mean Photo Effect): recente misura derivata dall'analisi matematica della forma completa di due curve di concentrazione-risposta ottenuta in assenza (-UV) e in presenza (+UV) di una irradiazione non citotossica con luce UVA/visibile.

Fototossicità: risposta tossica acuta che si manifesta dopo esposizione primaria della cute ad alcune sostanze chimiche e successiva esposizione alla luce, o che è indotta analogamente da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

Fotoirritazione: sottospecie del termine "fototossicità" impiegato per descrivere solo le reazioni fototossiche prodotte sulla cute dopo esposizione a sostanze chimiche (somministrate per via topica o orale). Tali reazioni fototossiche causano sempre danni cellulari non specifici (reazioni analoghe all'eritema solare).

Fotoallergia: reattività immunologica acquisita che non si verifica al primo trattamento con una sostanza chimica e successiva esposizione alla luce, ma che necessita di un periodo di induzione di una o due settimane prima che sia possibile dimostrare la reattività cutanea.

Fotogenotossicità: risposta genotossica osservata con un "endpoint" genetico, che si manifesta dopo esposizione delle cellule a una dose di luce UV/visibile e a una sostanza chimica non genotossica.

Fotocarcinogenicità: carcinogenicità indotta dalla ripetuta applicazione di luce e di una sostanza chimica. Si utilizza il termine "foto-co-carcinogenesi" quando la cancerogenesi indotta dagli UV viene aumentata da una sostanza chimica.

1.3. Sostanze di riferimento

Oltre alla sostanza chimica di controllo positivo clorpromazina, che andrebbe saggiata simultaneamente in tutti i saggi, per effettuare il saggio di fototossicità 3T3 NRU si raccomanda di impiegare come sostanze chimiche di riferimento un sottogruppo delle sostanze utilizzate nelle analisi interlaboratorio per il presente saggio (1) (3) (13).

1.4. Considerazioni iniziali

È noto che molti tipi di sostanze chimiche inducono effetti fototossici (5) (6) (7) (8). L'unica caratteristica che hanno in comune è la capacità di assorbire l'energia luminosa nello spettro della luce solare. In base alla prima legge della fotochimica (legge di Grothaus-Draper), la fotoreazione richiede un assorbimento sufficiente di quanti di luce. Pertanto, prima di effettuare la prova biologica in base alle linee guida qui descritte, è necessario determinare uno spettro di assorbimento della luce UV/visibile per la sostanza chimica di prova (ad esempio, in base alle linee guida dell'OCSE: OECD Test Guideline 101). Se il coefficiente di estinzione/assorbimento molare è inferiore a $10 \text{ litri} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, la sostanza chimica non ha alcun potenziale fotoreattivo e non occorre sottoporla al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU, né ad altre prove biologiche atte a determinare effetti fotochimici indesiderati (appendice).

1.5. Principio del metodo utilizzato

Sono stati identificati quattro meccanismi in base ai quali l'assorbimento della luce da parte di un cromoforo (chimico) può provocare una risposta fototossica (7). Tutti e quattro i meccanismi provocano lesioni cellulari. Pertanto, il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU è basato sul confronto della citotossicità di una sostanza chimica saggiata con e senza esposizione a una dose non citotossica di luce UVA/visibile. In questo saggio, la citotossicità viene espressa come riduzione, dipendente dalla concentrazione, della captazione del colorante vitale rosso neutro [NR, (9)] 24 ore dopo il trattamento con la sostanza chimica di prova e l'irradiazione.

Dapprima si preparano cellule Balb/c 3T3 che vengono mantenute in coltura per 24 ore per permettere la formazione di monostrati. Quindi, per ogni sostanza chimica di prova, vengono preincubate due piastre a 96 pozzetti con otto diverse concentrazioni della sostanza chimica per 1 ora. Una delle due piastre viene poi esposta a una dose non citotossica di luce UVA/visibile di 5 J/cm^2 UVA (esperimento +UV), mentre l'altra piastra viene mantenuta nell'oscurità (esperimento -UV). In entrambe le piastre, il terreno di trattamento viene poi sostituito con il terreno di coltura e, dopo altre 24 ore di incubazione, si determina la vitalità cellulare tramite captazione del rosso neutro (Neutral Red Uptake, NRU) per 3 ore. Per ognuna delle otto concentrazioni di prova viene dunque calcolata la vitalità cellulare relativa, espressa come percentuale dei controlli negativi non trattati. Per prevedere il potenziale fototossico vengono confrontate le risposte di concentrazione ottenute in presenza (+UV) e in assenza (-UV) di irradiazione, generalmente al livello EC_{50} , cioè alla concentrazione che inibisce la vitalità cellulare del 50% rispetto ai controlli non trattati.

1.6. Criteri di qualità

Sensibilità delle cellule agli UVA; dati storici: Ad intervalli regolari occorre controllare la sensibilità delle cellule agli UVA. Le cellule vengono seminate alla stessa densità utilizzata nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU; il giorno successivo vengono irradiate con dosi di UVA da 1 a 9 J/cm^2 , e il giorno ancora successivo si determina la vitalità cellulare tramite saggio di NRU. Le cellule soddisfano i requisiti di qualità se la loro vitalità, dopo irradiazione con 5 J/cm^2 di UVA, non è inferiore all'80% della vitalità dei controlli mantenuti nell'oscurità. Alla dose massima di UVA (9 J/cm^2), la vitalità non deve essere inferiore al 50% rispetto a quella dei controlli mantenuti nell'oscurità. Questo controllo va ripetuto all'incirca ogni dieci passaggi di cellule.

Sensibilità agli UVA delle cellule di controllo negativo; saggio in oggetto: Il saggio soddisfa i criteri di qualità se i controlli negativi [cellule in soluzione salina isotonica di Earl (EBSS) con o senza l'1% di dimetilsolfossido (DMSO) o l'1% di etanolo (EtOH) nell'esperimento +UVA] mostrano una vitalità non inferiore all'80% di quella delle cellule non irradiate nello stesso solvente del corrispondente esperimento in oscurità (-UVA).

Vitalità dei controlli negativi: La densità ottica assoluta ($OD_{540 \text{ NRU}}$) misurata nell'estratto di rosso neutro dei controlli negativi indica se le cellule (1×10^4) seminate in ogni pozzetto siano cresciute con un tempo di raddoppiamento normale durante i due giorni della prova. Il saggio soddisfa i criteri di accettazione se la $OD_{540 \text{ NRU}}$ media dei controlli non trattati è $\geq 0,2$.

Controllo positivo: Contemporaneamente al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU, si saggia una sostanza chimica notoriamente fototossica. Si raccomanda l'uso di clorpromazina (CPZ), poiché tale sostanza è stata impiegata come controllo positivo nello studio di validazione UE/COLIPA. Per la CPZ saggiata con il protocollo standard nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU, sono stati definiti i seguenti criteri di accettazione: CPZ irradiata (+UVA): EC_{50} = da 0,1 a 2,0 $\mu\text{g/ml}$; CPZ non irradiata (-UVA): EC_{50} = da 7,0 a 90,0 $\mu\text{g/ml}$. Il PIF, cioè lo spostamento di EC_{50} , deve essere almeno pari a 6.

Come controlli positivi concomitanti, al posto della CPZ possono essere impiegate altre sostanze chimiche notoriamente fototossiche, corrispondenti alla classe chimica o alle caratteristiche di solubilità della sostanza chimica di prova. In questo caso, sulla base dei dati storici, occorre definire adeguatamente l'intervallo di EC_{50} e del PIF o MPE come criterio di accettazione del saggio.

1.7. Descrizione del metodo utilizzato

1.7.1. Preparazioni

1.7.1.1. Cellule

Nello studio di validazione è stata usata una linea cellulare permanente di fibroblasti di topo — Balb/c 3T3, clone 31 — proveniente dall'ATCC o dall'ECACC. Se ne raccomanda pertanto l'uso in ogni saggio. Applicando lo stesso protocollo, si possono utilizzare con eguale efficacia anche altre cellule o linee cellulari se le condizioni della coltura vengono adattate alle esigenze specifiche delle cellule; tuttavia, è necessario dimostrare l'equivalenza.

È necessario verificare con regolarità che le cellule non siano contaminate da micoplasmi; le cellule vanno utilizzate solo se i risultati dei controlli sono soddisfacenti.

Poiché la sensibilità delle cellule agli UVA può aumentare con il numero di passaggi, vanno impiegate cellule Balb/c 3T3 del numero più basso ottenibile di passaggi, preferibilmente inferiore a 100. È importante che la sensibilità delle cellule Balb/c 3T3 agli UVA venga controllata regolarmente seguendo la procedura di controllo della qualità descritta in queste linee guida.

1.7.1.2. Condizioni dei mezzi e della coltura

Per il passaggio di routine delle cellule e durante il saggio è necessario utilizzare mezzi di coltura e condizioni di incubazione adeguati. Nel caso delle cellule Balb/c 3T3, occorre integrarle con DMEM al 10% di siero di vitello neonato, 4 mM di glutamina, penicillina e streptomina, nonché incubazione umidificata a 37°C /7,5% di CO_2 . È particolarmente importante che le condizioni della coltura cellulare assicurino un tempo di ciclo cellulare compreso nel normale range storico delle cellule o della linea cellulare utilizzate.

1.7.1.3. Preparazione delle colture

Le cellule ottenute da colture base congelate vengono seminate nel terreno di coltura alla densità adeguata e poste in sottocoltura almeno una volta prima di essere utilizzate per il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

Per il saggio di fototossicità occorre seminare le cellule nel terreno di coltura ad una densità tale che impedisca alle colture di raggiungere la confluenza prima della fine, cioè quando viene determinata la vitalità cellulare 48 ore dopo la semina. Per le cellule Balb/c 3T3 coltivate in piastre a 96 pozzetti la densità raccomandata è di 1×10^4 cellule per pozzetto.

Per ogni sostanza chimica di prova si seminano cellule in maniera identica in due diverse piastre a 96 pozzetti, che vengono poi sottoposte simultaneamente all'intera procedura in condizioni culturali identiche, salvo il periodo di tempo in cui una delle piastre viene irradiata (+UVA/visibile) mentre l'altra viene tenuta nell'oscurità (-UVA/visibile).

1.7.1.4. Attivazione metabolica

Mentre l'uso di sistemi metabolizzanti è un requisito generale di tutte le prove in vitro per la previsione della genotossicità e del potenziale carcinogenico, finora, nel caso della fototossicologia, non si conosce alcuna sostanza chimica che necessita della trasformazione metabolica per agire da fototossina in vivo o in vitro. Pertanto non si ritiene necessario, né scientificamente giustificato, svolgere questo saggio con un sistema di attivazione metabolica.

1.7.1.5. Sostanza chimica di prova/Preparazione

Le sostanze chimiche di prova devono essere preparate di fresco immediatamente prima dell'uso, a meno che la conservazione risulti accettabile in base ai dati relativi alla stabilità. Quando è probabile che si verifichi una rapida fotodegradazione, può essere necessaria la preparazione sotto luce rossa.

Le sostanze chimiche di prova vanno dissolte in soluzioni saline tampone, come la soluzione isotonica di Earl (EBSS) o la soluzione salina tampone fosfato (PBS) che, per evitare interferenze durante l'irradiazione, devono essere prive di componenti proteiche e colori indicatori di pH che assorbono la luce.

Le sostanze chimiche di prova scarsamente solubili in acqua devono essere dissolte in solventi adeguati, ad una concentrazione pari a 100 volte la concentrazione finale desiderata e poi diluite in 1:100 con la soluzione tampone. Eventuali solventi devono essere presenti a un volume costante dell'1% (v/v) in tutte le colture, e cioè sia nei controlli negativi che in tutte le concentrazioni della sostanza chimica di prova.

I solventi raccomandati sono il dimetilsolfossido (DMSO) e l'etanolo (EtOH). Possono essere adatti anche altri solventi a bassa citotossicità (come l'acetone), ma è necessario valutarne attentamente le proprietà specifiche, quali la reazione con la sostanza chimica di prova, l'estinzione dell'effetto fototossico, le proprietà di cattura dei radicali.

Se necessario, si può procedere a miscelazione tramite vortex e/o sonicazione e/o riscaldamento fino a 37 °C per favorire la solubilizzazione.

1.7.1.6. Irradiazione UV/Preparazione

Fonte di luce: la scelta di una fonte di luce e di un filtro adeguati è il fattore più importante ai fini di un corretto saggio della fototossicità. Gli spettri di UVA e della luce visibile si associano generalmente a fotosensibilizzazione (7) (10), mentre gli UVB sono meno rilevanti perché fortemente citotossici in via diretta, visto che la loro citotossicità aumenta di 1000 volte da 313 a 280 nm (11). Per scegliere una fonte luminosa adeguata valgono, tra l'altro, i seguenti criteri essenziali: la fonte di luce deve emettere lunghezze d'onda assorbite dalla sostanza chimica di prova e la dose di luce (ottenibile in tempi ragionevoli) deve essere sufficiente per individuare i fotosensibilizzanti noti. Inoltre, le lunghezze d'onda e le dosi utilizzate non devono essere eccessivamente nocive per il sistema, che comporta anche emissione di calore (regione dell'infrarosso).

La fonte di luce ottimale è la simulazione della luce del sole con simulatori solari. Nei simulatori solari si usano sia gli archi allo xeno che gli archi di mercurio e ad alogenuri metallici (drogati). Questi ultimi presentano il vantaggio di emettere meno calore e di essere meno costosi, ma la loro corrispondenza con la luce solare non è perfetta. Poiché tutti i simulatori solari emettono quantità significative di UVB, vanno muniti di filtri adeguati per attenuare le lunghezze d'onda UVB altamente citotossiche.

Per il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU è necessario usare uno spettro di irradiazione praticamente privo di UVB (UVA:UVB ~ 1:20). È stato pubblicato un esempio della distribuzione dell'irradiazione spettrale del simulatore solare con filtro impiegato nello studio di validazione del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU (3).

Dosimetria: Prima di effettuare il saggio di fototossicità occorre controllare regolarmente l'intensità della luce (irradiazione) mediante opportuno misuratore UV a banda larga. Il misuratore UV deve essere stato calibrato sulla fonte. È necessario controllare la funzionalità del misuratore UV e, a tale scopo, si raccomanda di impiegare un secondo misuratore UV di riferimento, dello stesso tipo e con identica calibrazione. L'ideale sarebbe che, a intervalli di tempo più lunghi, con uno spettroradiometro si misurasse l'irradiazione spettrale della fonte di luce filtrata e si controllasse la calibrazione del misuratore UV a banda larga; tali strumenti richiedono tuttavia l'intervento di personale specializzato.

Lo studio di validazione ha stabilito che una dose di 5 J/cm² (UVA) non è citotossica per le cellule Balb/c 3T3 ed è sufficientemente potente per eccitare anche le sostanze chimiche a bassa fototossicità. Allo scopo di ottenere una dose di 5 J/cm² entro 50 minuti, l'irradiazione deve essere regolata a 1,666 mW/cm². Se si utilizzano un'altra linea cellulare o una diversa fonte di luce, potrebbe essere necessario adattare leggermente la dose di UVA, a condizione che non sia nociva per le cellule e che sia sufficiente per individuare le fototossine standard. Il tempo di esposizione alla luce si calcola come segue:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose di irradiazione (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiazione (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2. Condizioni di esecuzione del saggio

La concentrazione massima della sostanza chimica di prova non deve superare i 100 µg/ml, poiché la fototossicità di tutte le sostanze chimiche è stata rilevata a concentrazioni inferiori, mentre a concentrazioni maggiori aumenta l'incidenza dei falsi positivi (previsioni sovrastimate) (13). Il pH della concentrazione più alta della sostanza chimica di prova deve essere soddisfacente (range del pH: 6,5-7,8).

Gli intervalli delle concentrazioni di una sostanza chimica sottoposta a prova in presenza (+UVA) e in assenza (-UVA) di luce vanno determinati in modo adeguato in precedenti esperimenti espressamente effettuati a tale scopo. Occorre adeguare l'intervallo e l'intercetta di una serie di concentrazioni in modo che le curve concentrazione-risposta siano sufficientemente corroborate da dati sperimentali. È necessario utilizzare le serie di concentrazioni geometriche (con un fattore di diluizione costante).

1.7.3. Procedura del saggio⁽¹⁾

1.7.3.1. Primo giorno

Preparare una sospensione di cellule di 1×10^5 cellule/ml nel terreno di coltura e versare 100 µL di terreno di coltura solo nei pozzetti periferici di una piastra per microtitolazione di coltura tissutale a 96 pozzetti (= bianchi). Nei restanti pozzetti versare 100 µL di una sospensione cellulare di 1×10^5 cellule/ml (= 1×10^4 cellule/pozzetto). Per ciascuna sostanza chimica di prova preparare due piastre: una per determinare la citotossicità (-UVA) e l'altra per determinare la fotocitotossicità (+UVA).

Incubare le cellule per 24 ore (7,5% di CO₂, 37°C) finché formano un monostrato semiconfluente. Questo periodo di incubazione tiene conto del recupero e dell'aderenza delle cellule, nonché della crescita esponenziale.

1.7.3.2. Secondo giorno

Dopo l'incubazione, far decantare il terreno di coltura dalle cellule e lavare due volte con 150 µL di EBSS/PBS per pozzetto. Aggiungere 100 µL di EBSS/PBS contenente la concentrazione corretta della sostanza chimica di prova o solo solvente (controllo negativo). Utilizzare 8 diverse concentrazioni della sostanza chimica di prova. Incubare le cellule con la sostanza chimica di prova nell'oscurità per 60 minuti (7,5% di CO₂, 37°C).

Per eseguire la parte +UVA del saggio, irradiare le cellule a temperatura ambiente per 50 minuti attraverso il coperchio della piastra con 1,7 mW/cm² di UVA (= 5 J/cm²). Ventilare con una ventola per evitare la condensazione di H₂O sotto il coperchio. Mantenere le altre piastre (-UVA) a temperatura ambiente in una scatola scura per 50 minuti (= tempo di esposizione agli UVA).

Far decantare la soluzione di prova e lavare due volte con 150 µL di EBSS/PBS. Sostituire l'EBSS/PBS con terreno di coltura e incubare (7,5% di CO₂, 37°C) per una notte (18-22 ore).

1.7.3.3. Terzo giorno

Esame al microscopio

Esaminare le cellule con un microscopio a contrasto di fase. Registrare i cambiamenti morfologici delle cellule dovuti agli effetti citotossici della sostanza chimica di prova. Si raccomanda questo controllo per escludere errori sperimentali, sebbene questi dati non vengano utilizzati per la valutazione della citotossicità o della fototossicità.

Prova della captazione del rosso neutro

Lavare le cellule con 150 µL di EBSS/PBS preriscaldata. Rimuovere la soluzione di lavaggio con lievi colpi. Aggiungere 100 µL di terreno al rosso neutro e incubare a 37°C in atmosfera umidificata al 7,5% di CO₂ per 3 ore.

Dopo l'incubazione, rimuovere il terreno al rosso neutro e lavare le cellule con 150 µL di EBSS/PBS. Far decantare e asciugare totalmente l'EBSS/PBS. (Centrifugare a piastra rovesciata è opzionale).

Aggiungere esattamente 150 µL di soluzione di estinzione di rosso neutro (etanolo/acido acetico preparati di fresco).

Scuotere rapidamente la piastra di microtitolazione con un agitatore per 10 minuti fino ad estrazione del rosso neutro dalle cellule e formazione di una soluzione omogenea.

Misurare la densità ottica dell'estratto di rosso neutro a 540 nm con uno spettrofotometro, utilizzando i bianchi come riferimento. Salvare i dati nel formato di file adeguato (ad esempio ASCII) per le analisi successive.

⁽¹⁾ Per ulteriori dettagli, cfr. il riferimento bibliografico (12).

2. DATI

2.1. Qualità e quantità dei dati

I dati devono permettere un'analisi significativa della concentrazione-risposta ottenuta in presenza e in assenza di irradiazione UVA/visibile. Se si rileva citotossicità, è necessario fissare sia il range della concentrazione che l'intervallo delle singole concentrazioni in modo da adattare una curva ai dati sperimentali. Poiché una sostanza chimica di prova potrebbe non essere citotossica fino alla concentrazione limite definita di 100 µg/ml nell'esperimento in oscurità (-UVA), ma altamente citotossica in caso di irradiazione (+UVA), potrebbe essere necessario che i range della concentrazione da saggiare differiscano per ordine di grandezza per garantire un'adeguata qualità dei dati. Se non si rileva citotossicità in nessuna delle due parti dell'esperimento (-UVA e +UVA), è sufficiente effettuare il saggio con un maggiore intervallo fra dosi singole fino alla concentrazione più elevata.

Non occorre verificare i risultati chiaramente positivi ripetendo l'esperimento. Non occorre neppure verificare i risultati chiaramente negativi, purché la sostanza chimica di prova sia stata saggiata a concentrazioni sufficientemente alte. In tali casi è sufficiente un esperimento principale, sostenuto da uno o più esperimenti preliminari di definizione dei range.

I saggi che hanno dato risultati borderline vicini alla linea di demarcazione del modello di predittività vanno ripetuti per verifica.

Se si ritiene necessario ripetere il saggio, potrebbe essere importante variare le condizioni sperimentali allo scopo di ottenere un risultato chiaro. Una variabile fondamentale di questo saggio è la preparazione delle soluzioni della sostanza chimica di prova. Pertanto, la variazione di tali condizioni (co-solvente, triturazione, sonicazione) può essere di enorme importanza nel saggio di ripetizione. Alternativamente si può prendere in considerazione l'ipotesi di variare il tempo di incubazione pre-irradiazione. Un tempo più breve può essere determinante per le sostanze chimiche instabili in acqua.

2.2. Trattamento dei risultati

Ove possibile, si determina la concentrazione di una sostanza chimica di prova che riflette una inibizione del 50 % dell'NRU cellulare (EC₅₀). A tale scopo si applica una qualunque procedura di regressione non lineare (preferibilmente una funzione di Hill o la regressione logistica) ai dati concentrazione-risposta, oppure si utilizzano altre procedure di adeguamento (14). Prima di utilizzare una EC₅₀ per ulteriori calcoli occorre controllare in modo adeguato la qualità dell'adattamento alla rappresentazione grafica. Alternativamente possono essere impiegati metodi di adattamento alla rappresentazione grafica per calcolare l'EC₅₀. In questo caso si raccomanda l'uso di carte di probabilità (scala x: log, scala y: probit), poiché in molti casi la funzione concentrazione-risposta diventerà quasi lineare dopo questa trasformazione.

2.3. Valutazione dei risultati (modelli di predittività)

2.3.1. Modello di predittività versione 1: PIF

Se si ottengono curve concentrazione-risposta complete sia in presenza (+UVA) che in assenza (-UVA) di luce, il fattore di fototossicità (PIF) si calcola tramite la formula seguente:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Un PIF < 5 non predice alcun potenziale fototossico, mentre un PIF ≥ 5 predice un potenziale fototossico.

Se una sostanza chimica è citotossica solo +UVA e non è citotossica al saggio -UVA, non è possibile calcolare il PIF, sebbene si tratti di un risultato che indica un potenziale fototossico. In tali casi è possibile calcolare un "> PIF" se il saggio di citotossicità (-UV) viene eseguito fino alla concentrazione di prova più elevata (C_{max}) e tale valore viene usato per calcolare il "> PIF":

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Se è possibile ottenere solo un "> PIF", qualunque valore > 1 predice un potenziale fototossico.

Se non è possibile calcolare né l'EC₅₀ (-UV) né l'EC₅₀ (+UV) a causa del fatto che una sostanza chimica non risulta essere citotossica fino alla più alta concentrazione di prova, questo indica l'assenza di potenziale fototossico. In tali casi per caratterizzare il risultato si utilizza un formale "PIF = *1"

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Se è possibile ottenere solo un "PIF = *1", ciò non predice alcun potenziale fototossico.

Nei casi (b) e (c), ai fini della predittività del potenziale fototossico è necessario tenere in debita considerazione le concentrazioni ottenute al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

2.3.2. *Modello di predittività versione 2: MPE*

Alternativamente è possibile applicare una nuova versione del modello per prevedere il potenziale fototossico, sviluppata in base ai dati dello studio di validazione UE/COLIPA (15) e saggiata in cieco in un successivo studio sulla fototossicità in vitro delle sostanze chimiche a filtro UV (13). Tale modello sopperisce ai limiti del modello PIF nei casi in cui è impossibile ottenere un'EC₅₀. Il modello utilizza il "Mean Photo Effect" (MPE), una misura basata sul confronto delle curve complete concentrazione-risposta. Per l'applicazione del modello MPE la Humboldt Universität di Berlino ha sviluppato un software disponibile gratuitamente.

2.4. **Interpretazione dei risultati**

Un risultato positivo al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU (PIF ≥ 5 o MPE $\geq 0,1$) indica che la sostanza di prova ha un potenziale fototossico. Se si ottiene tale risultato a concentrazioni inferiori a 10 µg/ml, è altresì probabile che la sostanza chimica di prova si comporti da fototossina in varie condizioni di esposizione in vivo. Se si ottiene un risultato positivo solo alla concentrazione di prova più elevata (100 µg/ml), possono essere necessarie ulteriori considerazioni per la valutazione del rischio o del potere fototossico, quali dati sulla penetrazione, l'assorbimento e il possibile accumulo della sostanza chimica nella cute, oppure l'analisi della sostanza in un saggio alternativo di conferma, ad esempio impiegando un modello di cute umana in vitro.

Un risultato negativo al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU (PIF < 5 o MPE $< 0,1$) indica che la sostanza di prova non è fototossica per le cellule di mammifero in coltura nelle condizioni di saggio. Nei casi in cui è stato possibile provare la sostanza chimica fino alla concentrazione più elevata (100 µg/ml) un risultato negativo indica che tale sostanza non ha potenziale fototossico e la fototossicità in vivo può essere considerata improbabile. Nei casi in cui si ottengano identiche risposte tossicità-concentrazione (EC₅₀ + UV e EC₅₀ - UV) a concentrazioni inferiori, l'interpretazione dei dati sarebbe la stessa. Diversamente, se non viene dimostrata tossicità (+UV e -UV) e se la solubilità in acqua limita le concentrazioni a valori inferiori a 100 µg/ml, allora può essere messa in dubbio la compatibilità della sostanza di prova con il saggio e va presa in considerazione l'idea di eseguire prove di conferma (ad esempio usando un modello di cute in vitro o un modello di cute ex vivo o un saggio in vivo).

3. **RELAZIONE**

Relazione sul saggio effettuato

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica di prova:

- dati di identificazione e numero CAS, se noto
- caratteristiche fisiche e purezza
- proprietà fisicochimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio
- stabilità e fotostabilità, se note

Solvente:

- motivazione della scelta del solvente
- solubilità della sostanza chimica di prova in questo solvente
- percentuale di solvente presente nel terreno di trattamento (EBSS o PBS)

Cellule:

- tipo e origine
- assenza di micoplasmi
- numero di passaggi delle cellule, se noto
- sensibilità delle cellule agli UVA, determinata con gli strumenti per irradiazione usati nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU

Condizioni di esecuzione del saggio (a) — incubazione prima e dopo il trattamento:

- tipo e composizione del terreno di coltura
- condizioni di incubazione (concentrazione di CO₂, temperatura, umidità)
- durata dell'incubazione (pre-trattamento, post-trattamento)

Condizioni di esecuzione del saggio (b) — trattamento con la sostanza chimica:

- criteri di scelta delle concentrazioni della sostanza chimica di prova usata sia in presenza che in assenza di irradiazione UV/visibile
- in caso di solubilità limitata della sostanza chimica di prova e assenza di citotossicità, motivi della scelta di una concentrazione più elevata
- tipo e composizione del terreno di trattamento (soluzione salina tampone)
- durata del trattamento chimico

Condizioni di esecuzione del saggio (c) — irradiazione:

- motivo della scelta della fonte di luce utilizzata nel saggio
- caratteristiche di irradiazione spettrale della fonte di luce
- caratteristiche di trasmissione/assorbimento del/i filtro/i usato/i
- caratteristiche del radiometro e particolari sulla sua calibrazione
- distanza della fonte di luce dal sistema di prova
- irradiazione UVA a tale distanza, espresso in mW/cm^2
- durata dell'esposizione alla luce UV/visibile
- dose UVA (irradiazione $\times$ tempo), espressa in J/cm^2
- temperatura delle colture cellulari durante l'irradiazione e delle colture cellulari mantenute in oscurità

Condizioni di esecuzione del saggio (d) — prova NRU

- composizione del terreno al rosso neutro
- durata dell'incubazione nel rosso neutro
- condizioni di incubazione (concentrazione di CO_2 , temperatura, umidità)
- condizioni di estrazione del rosso neutro (estraente, durata)
- lunghezza d'onda usata per la lettura spettrofotometrica della densità ottica del rosso neutro
- seconda lunghezza d'onda (riferimento), se utilizzata
- contenuto del bianco spettrofotometrico, se utilizzato

Risultati

- vitalità cellulare ottenuta a ciascuna concentrazione della sostanza chimica di prova, espressa in vitalità percentuale media dei controlli
- curve concentrazione-risposta (concentrazione della sostanza chimica di prova vs. vitalità cellulare relativa), ottenuta negli esperimenti simultanei +UVA e -UVA
- analisi dei dati delle curve concentrazione-risposta: se possibile, computo/calcolo dell' EC_{50} (+UVA) e dell' EC_{50} (-UVA)
- confronto delle due curve concentrazione-risposta ottenute in presenza e in assenza dell'irradiazione UVA/visibile, o tramite calcolo del PIF, o tramite calcolo dell'MPE
- classificazione del potenziale fototossico
- criteri di accettazione del saggio (a) — controllo negativo simultaneo:
 - vitalità assoluta (densità ottica dell'estratto di rosso neutro) delle cellule irradiate e non irradiate
 - dati storici del controllo negativo, deviazione media e standard
- criteri di accettazione del saggio (b) — controllo positivo simultaneo:
 - EC_{50} (+UVA) e EC_{50} (-UVA) e PIF della sostanza chimica di controllo positiva
 - dati storici riguardanti la sostanza chimica di controllo positiva: EC_{50} (+UVA) e EC_{50} (-UVA) e PIF, deviazione media e standard

*Discussione dei risultati**Conclusioni*

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, pagg. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA 26, pagg. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pagg. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pagg. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pagg. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, ATLA 22, pagg. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pagg. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, pagg. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pagg. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, pagg. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU In Vitro Phototoxicity Test, ATLA 26, pagg. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, pagg. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, ATLA 25, pagg. 445-462.

Appendice

Ruolo del saggio di fototossicità 3T3 NRU in un sistema sequenziale di saggio di fototossicità delle sostanze chimiche