

B.60 Sensibilizzazione cutanea in vitro: metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 442D (2015). Per sensibilizzante cutaneo s'intende una sostanza che provoca una reazione allergica a contatto con la pelle, secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 dell'Unione europea relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (¹). Il presente metodo di prova riguarda una procedura in vitro (il saggio della luciferasi ARE-Nrf2) da utilizzare per distinguere tra sostanze sensibilizzanti della pelle e sostanze non sensibilizzanti, secondo la definizione del sistema UN GHS (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008.

Vi è consenso generale circa le principali fasi del processo biologico di sensibilizzazione cutanea. Le attuali conoscenze relative ai meccanismi chimici e biologici associati alla sensibilizzazione cutanea sono state riassunte nel concetto del meccanismo d'azione degli eventi avversi (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) (2), dall'evento molecolare scatenante fino agli effetti avversi per la salute (dermatite allergica da contatto negli esseri umani o ipersensibilità da contatto nei roditori) (2) (3), passando attraverso le fasi intermedie. L'evento molecolare scatenante è la costituzione di un legame covalente tra le sostanze elettrofile e i centri nucleofili delle proteine della pelle. Il secondo evento chiave dell'AOP avviene a livello di cheratinociti e comprende risposte infiammatorie e fenomeni di espressione genica, associati a vie di segnalazione intercellulare come le vie dipendenti dall'elemento di risposta antiossidante/elettrofilo (ARE, *Antioxidant Response Element*). Il terzo evento chiave è l'attivazione di cellule dendritiche, generalmente valutate attraverso l'espressione di specifici marcatori di superficie cellulare, chemochine e citochine. Il quarto evento chiave è la proliferazione dei linfociti T, valutati indirettamente con il saggio LLNA (*Local Lymph Node Assay*) su topi (4).

Tipicamente, la valutazione della sensibilizzazione cutanea è effettuata su cavie. I metodi classici che prevedono l'impiego di cavie — prova GMPT (*Guinea Pig Maximisation Test*) di Magnusson e Kligman e prova di Buehler (metodo di prova B.6 (5)) — studiano sia la fase di induzione sia la fase di elicitazione della sensibilizzazione cutanea. Anche un saggio su topi, l'LLNA (*Local Lymph Node Assay*) (metodo di prova B.42 (4)) e le sue due varianti che non utilizzano isotopi radioattivi, LLNA: DA (TM B.50 (6)) e LLNA: BrdU-ELISA (metodo di prova B.51 (7)), che valutano esclusivamente la risposta all'induzione, hanno ottenuto riconoscimento grazie al fatto che rispetto alle prove su cavie presentano il vantaggio di preservare maggiormente il benessere animale e di fornire una misurazione oggettiva della fase di induzione della sensibilizzazione cutanea.

Più di recente, i metodi di prova *in chemico* e in vitro di tipo meccanicistico sono stati considerati scientificamente validi per la valutazione del pericolo di sensibilizzazione cutanea correlato alle sostanze chimiche. Tuttavia saranno necessarie combinazioni di metodi che non utilizzano la sperimentazione sugli animali (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), nel quadro degli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), per poter sostituire completamente le prove sugli animali attualmente in uso, tenuto conto della limitata copertura meccanicistica dell'AOP di ciascuno dei metodi di prova senza ricorso agli animali (2) (3).

Il presente metodo di prova (saggio della luciferasi ARE-Nrf2) è proposto per lo studio del secondo evento chiave descritto al paragrafo 2. È stato segnalato che i sensibilizzanti cutanei provocano l'induzione dei geni che sono regolati dall'elemento di risposta antiossidante (ARE) (8) (9). Piccole sostanze elettrofile come i sensibilizzanti cutanei possono agire sulla proteina sensore Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), ad esempio attraverso una modifica covalente del suo residuo di cisteina, provocando la sua dissociazione dal fattore di trascrizione Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Il fattore Nrf2 dissociato può quindi attivare i geni che dipendono dall'ARE, come quelli che rappresentano il codice genetico degli enzimi detossificanti della fase II (8) (10) (11).

Attualmente l'unico saggio della luciferasi ARE-Nrf2 in vitro contemplato dal presente metodo di prova è il saggio KeratinoSens™, per il quale sono stati completati studi di valutazione (9) (12) (13) seguiti da una valutazione inter pares indipendente condotta dal laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (EURL ECVAM) (14). Il saggio KeratinoSens™ è stato ritenuto scientificamente valido, nel quadro di un approccio integrato di tipo IATA, per poter distinguere tra sostanze sensibilizzanti della pelle e sostanze non sensibilizzanti ai fini della classificazione e dell'etichettatura dei pericoli (14). I laboratori che intendono applicare questo metodo di prova possono ottenere la linea cellulare ricombinante utilizzata nel saggio KeratinoSens™ sottoscrivendo un accordo di licenza con lo sviluppatore del metodo di prova (15).

(¹) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

Le definizioni di questi parametri figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI, APPLICABILITÀ E LIMITI

Poiché l'attivazione della via Keap1-Nrf2-ARE riguarda solo il secondo evento chiave dell'AOP riguardante la sensibilizzazione cutanea, le informazioni ottenute grazie a metodi di prova basati sull'attivazione di questa via probabilmente non bastano da sole a trarre conclusioni sul potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche. Pertanto, i dati generati con l'utilizzo del presente metodo di prova dovrebbero essere considerati nel contesto di un approccio integrato di tipo IATA e combinati con altre informazioni complementari, ad esempio quelle ottenute con i saggi in vitro concernenti altri eventi chiave dell'AOP riguardante la sensibilizzazione cutanea, nonché con metodi che non fanno uso della sperimentazione, compresi i metodi *read-across* utilizzati con sostanze chimiche analoghe. La letteratura scientifica contiene esempi di utilizzo del metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2 in combinazione con altre informazioni (13) (16) (17) (18) (19).

Il presente metodo di prova può essere utilizzato per aiutare a distinguere tra sostanze sensibilizzanti della pelle (categoria 1 del sistema UN GHS/CLP) e non sensibilizzanti nel quadro di un approccio integrato di tipo IATA. Questo metodo di prova non può essere utilizzato da solo, né per la classificazione dei sensibilizzanti cutanei nelle sottocategorie 1A e 1B del sistema UN GHS/CLP né per prevedere la potenza di sensibilizzazione nel quadro delle valutazioni relative alla sicurezza. Tuttavia, in funzione del quadro regolamentare applicabile, un risultato positivo può essere ritenuto sufficiente per classificare una sostanza chimica nella categoria 1 del sistema UN GHS/CLP.

Sulla base della serie di dati ottenuta grazie allo studio di validazione e alle sperimentazioni interne effettuate durante la valutazione *inter pares* indipendente del metodo di prova, si può concludere che il saggio KeratinoSens™ è trasferibile ai laboratori con esperienza di coltura cellulare. Il livello di riproducibilità atteso delle predizioni è dell'ordine dell'85 % a livello intralaboratorio e a livello interlaboratorio (14). L'accuratezza (77 % — 155/201), la sensibilità (78 % — 71/91) e la specificità (76 % — 84/110) delle predizioni ottenute con il saggio KeratinoSens™ per distinguere le sostanze sensibilizzanti della pelle (categoria 1 del sistema UN GHS/CLP) dalle sostanze non sensibilizzanti, rispetto ai risultati dell'LLNA, sono state calcolate prendendo in considerazione tutti i dati trasmessi all'EURL ECVAM per la valutazione, anche *inter pares*, del metodo di prova (14). Queste cifre sono simili a quelle pubblicate di recente sulla base di sperimentazioni interne relative a circa 145 sostanze (77 % di precisione, 79 % di sensibilità, 72 % di specificità) (13). Il saggio KeratinoSens™ ha una maggiore probabilità di fornire una sottopredizione delle sostanze chimiche aventi una potenza di sensibilizzazione cutanea da debole a moderata (sottocategoria 1B del sistema UN GHS/CLP) rispetto alle sostanze chimiche aventi una potenza di sensibilizzazione cutanea elevata (sottocategoria 1A del sistema UN GHS/CLP) (13) (14). L'insieme di queste informazioni indica l'utilità del saggio KeratinoSens™ come elemento in grado di contribuire all'identificazione del pericolo di sensibilizzazione cutanea. Tuttavia i valori relativi all'accuratezza del saggio KeratinoSens™ come metodo di prova autonomo sono soltanto indicativi, poiché tale metodo dovrebbe essere considerato in combinazione con altre fonti di informazioni, nel quadro di un approccio di tipo IATA, e conformemente alle disposizioni di cui al paragrafo 9. Inoltre, nel valutare i metodi di studio della sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione sugli animali, occorre tenere presente che l'LLNA e gli altri metodi che ricorrono alla sperimentazione sugli animali potrebbero non rispecchiare interamente la situazione riscontrata presso la specie di interesse, ossia gli esseri umani.

Nel presente metodo di prova, il termine "sostanza chimica in esame" fa riferimento alla sostanza oggetto della sperimentazione e non è correlato all'applicabilità del metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2 all'esecuzione di prove sulle sostanze e/o sulle miscele. I dati attualmente disponibili dimostrano che il saggio KeratinoSens™ è applicabile all'esecuzione di prove su sostanze chimiche che coprono una varietà di gruppi funzionali organici, meccanismi di reazione, valori della potenza di sensibilizzazione cutanea (determinati con gli studi *in vivo*) e proprietà fisico-chimiche (9) (12) (13) (14). Le prove sono state eseguite soprattutto su sostanze mono-costituente, sebbene sia disponibile anche una quantità limitata di dati relativi alle prove sulle miscele (20). Il metodo di prova è in ogni caso tecnicamente applicabile alle prove sulle sostanze multiconstituente e sulle miscele. Tuttavia, prima di ricorrere a questo metodo di prova per testare una miscela per ottenere dati a fini regolamentari, è opportuno chiedersi se, e in caso affermativo perché, i dati ottenuti possono essere ritenuti idonei per i fini regolamentari previsti. Tali considerazioni non sono necessarie se l'esecuzione della prova sulla miscela risponde a un obbligo normativo. Inoltre, quando si testano sostanze multiconstituente o miscela, occorre prestare attenzione alle possibili interferenze dei costituenti citotossici con le risposte osservate. Il metodo di prova è applicabile alle sostanze chimiche solubili o che formano una dispersione stabile (colloide o sospensione in cui la sostanza chimica in esame non si deposita né si separa dal solvente formando più fasi) nell'acqua o nel DMSO (ciò vale per tutti i componenti della sostanza chimica in esame se la prova è eseguita su una sostanza multiconstituente o su una miscela).

Le sostanze chimiche che non soddisfano queste condizioni alla massima concentrazione finale richiesta di 2 000 μM (cfr. il paragrafo 22) possono comunque essere testate a concentrazioni inferiori. In tal caso, i risultati che soddisfano i criteri di positività descritti al paragrafo 39 possono essere comunque utilizzati nel processo di identificazione della sostanza chimica come sensibilizzante cutaneo, mentre un risultato negativo ottenuto con concentrazioni < 1 000 μM dovrebbe essere considerato non conclusivo (cfr. il modello predittivo di cui al paragrafo 39). In generale, le sostanze con un LogP inferiore o uguale a 5 sono state testate con successo, mentre le sostanze estremamente idrofobiche con un LogP superiore a 7 sono al di fuori dei limiti di applicabilità noti del metodo di prova (14). Per le sostanze con un LogP compreso tra 5 e 7 le informazioni disponibili sono limitate.

I risultati negativi devono essere interpretati con prudenza perché le sostanze reattive esclusivamente nei confronti dei residui di lisina possono essere identificate come negative dal metodo di prova. Inoltre, a causa della capacità metabolica limitata della linea cellulare utilizzata (21) e a causa delle condizioni sperimentali, anche i pro-apteni (sostanze chimiche che richiedono attivazione enzimatica, ad esempio mediante enzimi P450) e i pre-apteni (sostanze chimiche attivate tramite auto-ossidazione), in particolare quelli a ossidazione lenta, possono dare risultati negativi. D'altra parte le sostanze chimiche in esame che non agiscono come sensibilizzanti, ma che sono comunque fattori di stress chimico, possono dar luogo a falsi positivi (14). Inoltre, se le sostanze chimiche in esame sono altamente citotossiche, la loro valutazione non sempre è affidabile. Infine, le sostanze chimiche che interferiscono con l'enzima luciferasi possono determinare un rischio di confusione con l'attività della luciferasi nei saggi a livello cellulare provocando un'inibizione apparente o una maggiore luminescenza (22). Ad esempio, è stato segnalato che le concentrazioni di fitoestrogeni superiori a 1 μM interferirebbero con i segnali di luminescenza in altri saggi con geni reporter basati sulla luciferasi a causa della sovrattivazione del gene reporter della luciferasi (23). Di conseguenza, è necessario esaminare attentamente l'espressione della luciferasi ottenuta in presenza di concentrazioni elevate di fitoestrogeni o di sostanze chimiche simili che si ritiene provochino una sovrattivazione del gene reporter della luciferasi comparabile a quella causata dai fitoestrogeni (23). Nel caso in cui si possa dimostrare che il metodo di prova non è applicabile ad altre categorie specifiche di sostanze chimiche, è opportuno evitare di utilizzarlo per tali categorie.

Oltre ad essere di ausilio nella distinzione tra sostanze sensibilizzanti della pelle e sostanze non sensibilizzanti, il saggio KeratinoSens™ fornisce informazioni sulla relazione concentrazione-risposta che possono contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione, nel quadro di un approccio integrato di tipo IATA (19). Tuttavia, è necessario uno studio supplementare, che sia preferibilmente basato su dati affidabili rilevati sulle persone, per stabilire in che modo i risultati del saggio KeratinoSens™ possono contribuire alla valutazione della potenza (24) e alla classificazione dei sensibilizzanti in sottocategorie secondo il sistema UN GHS/CLP.

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2 utilizza una linea cellulare aderente immortalizzata derivata da cheratinociti umani HaCaT trasferiti in modo stabile con un plasmide selezionabile. La linea cellulare contiene il gene della luciferasi sotto il controllo trascrizionale di un promotore costitutivo fuso con un elemento ARE di un gene di cui è nota la regolazione positiva (*up-regulation*) della sua espressione sotto l'effetto dei sensibilizzanti cutanei (25) (26). Il segnale della luciferasi riflette l'attivazione da parte dei sensibilizzanti di geni endogeni dipendenti dal fattore Nrf2, e la dipendenza del segnale della luciferasi dal fattore Nrf2 nella linea cellulare ricombinante è stata dimostrata (27). Ciò consente la misurazione quantitativa (mediante rivelazione della luminescenza) dell'induzione del gene della luciferasi, grazie all'uso di substrati di luciferasi che producono una luminescenza soddisfacente, come indicatore dell'attività del fattore di trascrizione Nrf2 nelle cellule in seguito all'esposizione a sostanze elettrofile.

Nel saggio KeratinoSens™ le sostanze chimiche in esame sono considerate positive se provocano un'induzione statisticamente significativa dell'attività della luciferasi superiore a una determinata soglia (ossia superiore a 1,5 volte, il che corrisponde a un aumento del 50 %), al di sotto di una concentrazione definita che non incide in misura significativa sulla vitalità cellulare (ossia al di sotto di 1 000 μM e a una concentrazione in cui la vitalità cellulare è superiore al 70 % (9) (12)). A tal fine si stabilisce il fattore massimo (I_{max}) per il quale è moltiplicata l'induzione dell'attività della luciferasi rispetto al controllo (negativo) con solvente. Inoltre, poiché le cellule sono esposte a una serie di concentrazioni delle sostanze chimiche in esame, la concentrazione necessaria per ottenere un'induzione statisticamente significativa dell'attività della luciferasi superiore alla soglia (ossia il valore $EC_{1.5}$) dovrebbe essere interpolata a partire dalla curva dose-risposta (cfr. il paragrafo 32 per i calcoli). Infine, dovrebbero essere effettuate in parallelo misurazioni della citotossicità per stabilire se l'induzione dell'attività della luciferasi avviene in presenza di concentrazioni sub-citotossiche.

Prima di utilizzare sistematicamente il saggio della luciferasi ARE-Nrf2 conforme al presente metodo di prova, i laboratori dovrebbero dimostrare la loro competenza tecnica utilizzando le sostanze elencate nell'appendice 2.

Sono disponibili standard di prestazione (28) che facilitano la validazione di metodi di prova della luciferasi ARE-Nrf2 in vitro nuovi e modificati simili al saggio KeratinoSens™ e permettono di modificare rapidamente il presente metodo di prova per potervi inserire. L'accettazione reciproca dei dati conformemente all'accordo OCSE sarà garantita solo per i metodi di prova validati secondo gli standard di prestazione, se tali metodi di prova sono stati esaminati e integrati nella corrispondente linea guida dell'OCSE.

PROCEDURA

Attualmente l'unico metodo coperto dal presente metodo di prova è il saggio scientificamente valido KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Le procedure operative standard per il saggio KeratinoSens™ sono disponibili e dovrebbero essere applicate quando si utilizza questo metodo di prova in laboratorio (15). I laboratori che intendono applicare questo metodo di prova possono ottenere la linea cellulare ricombinante utilizzata nel saggio KeratinoSens™ sottoscrivendo un accordo di licenza con lo sviluppatore del metodo di prova. Nei seguenti paragrafi viene fornita una descrizione dei componenti e delle procedure principali del metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2.

Preparazione delle colture di cheratinociti

Bisogna utilizzare una linea cellulare transgenica che comporti un'introduzione stabile del gene reporter della luciferasi sotto il controllo dell'elemento ARE (ad es. la linea cellulare KeratinoSens™). Al ricevimento, le cellule sono moltiplicate (ad es. da 2 a 4 passaggi) al fine di costituire uno stock omogeneo da conservare in stato di congelamento. Le cellule di questo stock originario possono essere moltiplicate fino a un numero massimo di passaggi (ossia 25 nel caso del metodo KeratinoSens™) e sono utilizzate per prove di routine con il mezzo di mantenimento idoneo (nel caso del metodo KeratinoSens™, si tratta di DMEM contenente siero e geneticina).

Per le prove, le cellule devono avere una confluenza pari all'80-90 % e occorre fare attenzione affinché non venga mai raggiunta la confluenza completa. Il giorno prima della prova, le cellule sono raccolte e ripartite su piastre a 96 pozzetti (10 000 cellule/pozzetto per il metodo KeratinoSens™). Bisogna fare attenzione ad evitare la sedimentazione delle cellule al momento dell'inoculazione al fine di assicurare la distribuzione omogenea del numero di cellule tra i pozzetti. In caso di distribuzione non omogenea, questa fase potrebbe dar luogo a un'elevata variabilità da un pozzetto all'altro. Per ciascuna ripetizione si utilizzano tre repliche per misurare l'attività della luciferasi e una replica parallela per il saggio della vitalità cellulare.

Preparazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

La sostanza chimica in esame e le sostanze di controllo vengono preparate il giorno della prova. Per il saggio KeratinoSens™, le sostanze chimiche in esame sono disciolte in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione finale desiderata (ad esempio 200 mM). Le soluzioni di DMSO possono essere considerate soluzioni autosterilizzanti e quindi non è necessario procedere alla sterilizzazione mediante filtrazione. Le sostanze chimiche non solubili in DMSO sono disciolte in acqua sterile o in un mezzo di coltura e le soluzioni sono sterilizzate, ad esempio mediante filtrazione. Per una sostanza chimica in esame senza un peso molecolare definito (Mw), si prepara una soluzione madre a una concentrazione predefinita (40 mg/ml o 4 % (p/v)) nel saggio KeratinoSens™. In caso di utilizzo di solventi diversi dal DMSO, dall'acqua o dal mezzo di coltura, è necessario fornire un'adeguata motivazione scientifica.

A partire dalle soluzioni madre della sostanza chimica in esame nel DMSO, sono preparate diluizioni in serie con il DMSO per ottenere 12 concentrazioni di riferimento della sostanza chimica da testare (da 0,098 a 200 mM nel saggio KeratinoSens™). Se la sostanza chimica in esame non è solubile nel DMSO, le diluizioni per ottenere le concentrazioni di riferimento sono ottenute utilizzando acqua sterile o un mezzo di coltura sterile. Indipendentemente dal solvente utilizzato, le concentrazioni di riferimento sono quindi ulteriormente diluite 25 volte in un mezzo di coltura contenente siero e infine utilizzate per il trattamento dopo un'ulteriore diluizione con fattore 4 in modo che le concentrazioni finali della sostanza chimica in esame siano comprese tra 0,98 e 2 000 µM nel saggio KeratinoSens™. Se giustificato, è possibile utilizzare concentrazioni diverse (ad esempio in presenza di un prodotto citotossico o scarsamente solubile).

Il controllo negativo (con solvente) utilizzato nel saggio KeratinoSens™ è il DMSO (n. CAS 67-68-5, purezza ≥ 99 %), per il quale si preparano sei pozzetti per piastra. Esso subisce la stessa diluizione descritta al paragrafo 22 per le concentrazioni di riferimento, in modo tale che la concentrazione finale del controllo negativo (con solvente) sia pari all'1 %, valore che notoriamente non influisce sulla vitalità cellulare e corrisponde alla concentrazione del DMSO nella sostanza chimica in esame e nel controllo positivo. Se la sostanza chimica in esame non è solubile nel DMSO ed è stata diluita in acqua, il livello di DMSO in tutti i pozzetti della soluzione di prova finale deve essere ricondotta all'1 %, come per le altre sostanze chimiche in esame e sostanze di controllo.

Il controllo positivo utilizzato nel caso del saggio KeratinoSens™ è l'aldeide cinnamica (n. CAS 14371-10-9, purezza ≥ 98 %), per la quale si prepara una serie di 5 concentrazioni di riferimento che vanno da 0,4 a 6,4 mM nel DMSO (a partire da una soluzione madre di 6,4 mM) che viene diluita seguendo la procedura descritta al paragrafo 22 per le concentrazioni di riferimento, in modo tale che la concentrazione finale del controllo positivo sia compresa tra 4 e 64 µM. Si possono utilizzare altri controlli positivi idonei, preferibilmente controlli che forniscono valori EC_{1,5} nella gamma dei valori medi, qualora siano disponibili dati storici per ricavare criteri di accettazione risultanti da procedure comparabili.

Applicazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

Per ogni sostanza chimica in esame e sostanza di controllo positivo, è necessario un esperimento finalizzato a ricavare una predizione (positiva o negativa) consistente in almeno due ripetizioni indipendenti contenenti ciascuna tre repliche (ossia n = 6). In caso di discordanza di risultati tra le due ripetizioni indipendenti, è necessaria una terza ripetizione contenente tre repliche (ossia n=9). Ogni ripetizione indipendente è eseguita in un giorno diverso con una nuova soluzione madre delle sostanze chimiche in esame e cellule raccolte in modo indipendente. Le cellule tuttavia possono provenire dallo stesso passaggio.

Dopo avere effettuato l'inoculazione seguendo la procedura descritta al paragrafo 20, le cellule sono coltivate per 24 ore nelle piastre per microtitolazione a 96 pozzetti. Il mezzo va quindi rimosso e sostituito con un nuovo mezzo di coltura (150 µl di mezzo di coltura contenente siero ma senza geneticina nel caso del metodo KeratinoSens™) al quale si aggiungono 50 µl della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo diluite 25 volte. Almeno un pozzetto per piastra deve restare vuoto (senza cellule o trattamenti) al fine di determinare i valori di fondo.

Le piastre trattate sono quindi messe in incubazione per 48 ore a una temperatura di 37(± 1) °C e con il 5 % di CO₂ nel saggio KeratinoSens™. È necessario prestare attenzione al fine di evitare l'evaporazione delle sostanze chimiche in esame volatili, come pure la contaminazione incrociata tra i pozzetti, ad esempio coprendo le piastre con un foglio di protezione prima dell'incubazione con le sostanze chimiche in esame.

Misurazioni dell'attività della luciferasi

I fattori determinanti per una lettura corretta della luminescenza sono tre:

- la scelta di un luminometro sensibile,
- l'uso di un tipo di piastra avente un'altezza sufficiente ad evitare la contaminazione incrociata attraverso la luce;
e
- l'uso di un substrato di luciferasi in grado di emettere luce sufficiente ad assicurare una sensibilità soddisfacente e una variabilità ridotta.

Prima della prova è necessario effettuare un esperimento di controllo secondo la procedura descritta nell'appendice 3 per accertare che queste tre condizioni siano soddisfatte.

Dopo 48 ore di esposizione alla sostanza chimica in esame e alle sostanze di controllo nel saggio KeratinoSens™, le cellule sono lavate con tampone fosfato isotonico, e il tampone di lisi appropriato per la lettura della luminescenza è aggiunto a ciascun pozzetto per 20 minuti a temperatura ambiente.

Le piastre contenenti lisato cellulare sono quindi collocate per la lettura nel luminometro, che nel saggio KeratinoSens™ è programmato per: i) aggiungere il substrato di luciferasi a ciascun pozzetto (ossia 50 µl), ii) attendere un secondo e iii) integrare l'attività della luciferasi per 2 secondi. L'eventuale utilizzo di impostazioni alternative, ad esempio a seconda del modello di luminometro utilizzato, deve essere giustificato. Inoltre, è possibile utilizzare anche un substrato luminescente, purché l'esperimento di controllo della qualità soddisfi i criteri descritti nell'appendice 3.

Valutazione della citotossicità

Per il saggio della vitalità cellulare KeratinoSens™, dopo le 48 ore di esposizione il mezzo è sostituito con un nuovo mezzo contenente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-bromuro di difeniltetrazolio, tiazolil blu tetrazolio bromuro; n. CAS 298-93-1) e le cellule sono messe in incubazione per 4 ore a 37°C e con il 5 % di CO₂. Il mezzo contenente MTT viene quindi rimosso e le cellule durante la notte sono sottoposte a lisi (ad esempio aggiungendo soluzione SDS al 10 % in ciascun pozzetto). In seguito ad agitazione, l'assorbimento è misurato a 600 nm con un fotometro.

DATI E RELAZIONE

Valutazione dei dati

I seguenti parametri sono calcolati con il saggio KeratinoSens™:

- il fattore massimo medio per il quale è moltiplicata l'induzione dell'attività della luciferasi (I_{max}) per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame e del controllo positivo;
- il valore EC_{1,5} che rappresenta la concentrazione per la quale è stata ottenuta un'induzione dell'attività della luciferasi superiore alla soglia di 1,5 volte (equivalente a un aumento dell'attività della luciferasi pari al 50 %); e
- le concentrazioni IC₅₀ e IC₃₀ corrispondenti a una riduzione del 50 % e del 30 % della vitalità cellulare.
- L'equazione 1 permette di calcolare il fattore moltiplicativo dell'induzione dell'attività della luciferasi, e il valore risultante massimo dell'induzione (I_{max}) corrisponde alla media delle singole ripetizioni.

Equazione 1:

$$\text{Fold induction} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

dove

L_{sample} è il valore della luminescenza rilevato nel pozzetto contenente la sostanza chimica in esame

L_{blank} è il valore della luminescenza rilevato nel pozzetto vuoto, ossia senza né cellule né trattamenti

L_{solvent} è il valore medio della luminescenza rilevato nei pozzetti contenenti cellule e controllo (negativo) con solvente

EC_{1,5} è calcolato mediante interpolazione lineare con l'equazione 2, e il valore risultante di EC_{1,5} è la media geometrica delle singole ripetizioni.

Equazione 2:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

dove

C_a è la concentrazione più bassa, in μM , che provoca un aumento dell'induzione $> 1,5$ volte

C_b è la concentrazione più alta, in μM , che provoca un aumento dell'induzione $< 1,5$ volte

I_a è la moltiplicazione dell'induzione misurata alla concentrazione più bassa che provoca un aumento dell'induzione $> 1,5$ volte (media di tre pozzetti replicati)

I_b è la moltiplicazione dell'induzione misurata alla concentrazione più alta che provoca un aumento dell'induzione $< 1,5$ volte (media di tre pozzetti replicati)

La vitalità è calcolata con l'equazione 3:

Equazione 3:

$$Viability = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

dove

V_{sample} è l'assorbanza rilevata durante la prova con MTT nel pozzetto contenente la sostanza chimica in esame

V_{blank} è l'assorbanza rilevata durante la prova con MTT nel pozzetto vuoto, ossia senza né cellule né trattamenti

$V_{solvent}$ è il valore medio dell'assorbanza rilevata durante la prova con MTT nei pozzetti contenenti le cellule e il controllo (negativo) con solvente

IC_{50} e IC_{30} sono calcolati mediante interpolazione lineare con l'equazione 4 e i valori risultanti di IC_{50} e IC_{30} sono calcolati come media geometrica delle singole ripetizioni.

Equazione 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

dove

X è la riduzione % alla concentrazione da calcolare (50 e 30 per IC_{50} e IC_{30})

C_a è la concentrazione più bassa, in μM , per la quale la riduzione della vitalità è $> x$ %

C_b è la concentrazione più alta, in μM , per la quale la riduzione della vitalità è $< x$ %

V_a è la vitalità in % alla concentrazione più bassa per la quale la riduzione della vitalità è $> x$ %

V_b è la vitalità in % alla concentrazione più alta per la quale la riduzione della vitalità è $< x$ %

Per ciascuna concentrazione che determina un'induzione dell'attività della luciferasi $> 1,5$ volte, la significatività statistica è calcolata (ad esempio mediante un test t di Student bilaterale) confrontando i valori della luminescenza per le tre repliche di campioni con i valori della luminescenza nei pozzetti contenenti il controllo (negativo) con solvente, al fine di stabilire se l'induzione dell'attività della luciferasi è statisticamente significativa ($p < 0,05$). La concentrazione più bassa per la quale l'aumento dell'induzione dell'attività della luciferasi è $> 1,5$ volte è il valore che determina il valore $EC_{1,5}$. In ciascun caso si verifica se tale valore è inferiore al valore IC_{30} e dunque se la riduzione della vitalità cellulare è inferiore al 30 % alla concentrazione che determina $EC_{1,5}$.

Si consiglia di verificare i dati visivamente con l'ausilio di grafici. In assenza di una curva dose-risposta chiaramente osservabile, o se la curva dose-risposta ottenuta è bifasica (ossia supera due volte la soglia di 1,5), è opportuno ripetere l'esperimento per verificare se il risultato è specificamente riconducibile alla sostanza chimica in esame o se invece è dovuto a un artefatto sperimentale. Nel caso in cui la risposta bifasica sia riproducibile in un esperimento indipendente, si deve indicare il valore $EC_{1,5}$ più basso (la concentrazione alla quale la soglia di 1,5 è superata per la prima volta).

Nei rari casi in cui si osserva un'induzione statisticamente non significativa superiore a 1,5 volte, seguita da un'induzione statisticamente significativa a una concentrazione più elevata, i risultati di questa ripetizione sono ritenuti validi e positivi solo se l'induzione statisticamente significativa superiore alla soglia di 1,5 è stata ottenuta per una concentrazione non citotossica.

Infine, per le sostanze chimiche in esame che producono un aumento dell'induzione pari o superiore a 1,5 volte già alla concentrazione di prova più bassa di 0,98 μM , il valore $EC_{1,5} < 0,98$ è fissato sulla base di un esame visivo della curva dose-risposta.

Criteri di accettabilità

Quando si utilizza il saggio KeratinoSens™ devono essere soddisfatti i criteri di accettabilità elencati di seguito. In primo luogo, l'induzione dell'attività della luciferasi ottenuta con il controllo positivo (aldeide cinnamica) deve essere statisticamente significativa e superiore alla soglia di 1,5 (ad esempio con un test t) ad almeno una delle concentrazioni impiegate (da 4 a 64 μM).

In secondo luogo, il valore $EC_{1,5}$ deve rientrare tra due deviazioni standard dalla media storica dell'infrastruttura utilizzata per la prova (ad es. tra 7 μM e 30 μM , in base ai dati usati per la validazione), da aggiornare regolarmente. Inoltre, l'induzione media delle tre repliche per l'aldeide cinnamica a 64 μM deve essere compresa tra 2 e 8. Se quest'ultimo criterio non è soddisfatto, la curva dose-risposta dell'aldeide cinnamica dovrà essere verificata attentamente, e le prove potranno essere accettate solo in presenza di una curva dose-risposta chiaramente osservabile, con l'induzione dell'attività della luciferasi che aumenta con l'aumentare della concentrazione per il controllo positivo.

Infine, il coefficiente medio di variazione della luminescenza per il controllo negativo (con solvente) DMSO deve essere inferiore al 20 % per ciascuna ripetizione con 6 pozzetti testati in triplicato. Se la variabilità è superiore, i risultati non devono essere presi in considerazione.

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

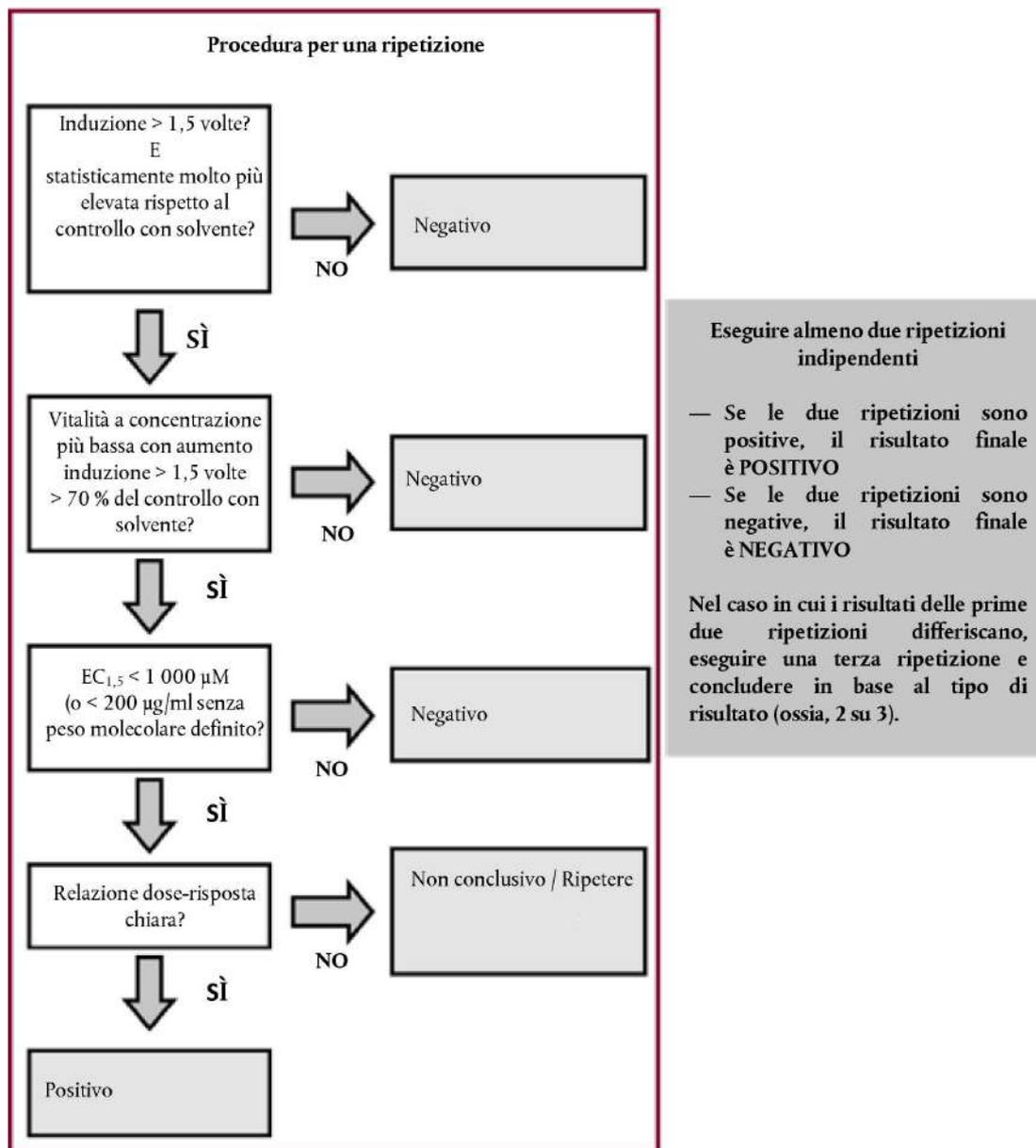
Una predizione KeratinoSens™ è considerata positiva se tutte e 4 le condizioni elencate di seguito sono soddisfatte in 2 ripetizioni su 2 o in 2 ripetizioni su 3; in caso contrario, la predizione KeratinoSens™ è considerata negativa (figura 1):

1. il valore I_{max} è superiore a (>) 1,5 volte e diverso in misura statisticamente significativa rispetto al valore ottenuto per il controllo (negativo) con solvente (quale determinato con un test t Student bilaterale non accoppiato);
2. la vitalità cellulare è superiore al (>) 70 % alla concentrazione più bassa per la quale l'aumento dell'induzione dell'attività della luciferasi è superiore a 1,5 volte (ossia alla concentrazione che determina $EC_{1,5}$);
3. il valore $EC_{1,5}$ è inferiore a (<) 1 000 μM (o < 200 $\mu\text{g/ml}$ per le sostanze chimiche in esame senza un peso molecolare definito);
4. per l'induzione della luciferasi si osserva una curva dose-risposta complessiva chiara (o una risposta bifasica, come indicato al paragrafo 33).

Se, in una data ripetizione, le prime tre condizioni sono soddisfatte ma non si osserva una curva dose-risposta chiara per l'induzione della luciferasi, il risultato di tale ripetizione deve essere considerato non conclusivo e potrebbero essere necessarie ulteriori prove (figura 1). Inoltre, anche un risultato negativo ottenuto con concentrazioni < 1 000 μM (o < 200 $\mu\text{g/ml}$ per le sostanze chimiche senza un peso molecolare definito) deve essere considerato non conclusivo (cfr. il paragrafo 11).

Figura 1

Modello predittivo utilizzato nel saggio KeratinoSens™. Una predizione KeratinoSens™ deve essere considerata nel quadro di un approccio di tipo IATA e conformemente alle disposizioni dei paragrafi 9 e 11.



In rari casi, le sostanze chimiche in esame che inducono un'attività della luciferasi a livelli molto vicini a quelli delle concentrazioni citotossiche possono essere positive in alcune ripetizioni in presenza di concentrazioni non citotossiche (ossia il valore $EC_{1,5}$ che determina la concentrazione al di sotto (<) del valore IC_{30}), e in altre ripetizioni unicamente ai livelli citotossici (ossia il valore $EC_{1,5}$ che determina la concentrazione al di sopra (>) del valore IC_{30}). Tali sostanze chimiche saranno ritestate procedendo a un'analisi dose-risposta più ristretta, con un fattore di diluizione più basso (ad esempio 1,33 o $\sqrt{2}$ (= 1,41) volte tra i pozzetti), al fine di determinare se l'induzione ha avuto luogo a livelli citotossici oppure no (9).

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame

— Sostanza mono-costituente

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

- caratteristiche fisiche, idrosolubilità, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;
 - purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico ecc.;
 - trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
 - concentrazione/i testata/e;
 - condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili.
- Sostanza multicomponente, UVCB o miscela:
- caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), la purezza, le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;
 - caratteristiche fisiche, idrosolubilità, solubilità nel DMSO e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;
 - peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso delle miscele/dei polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;
 - trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
 - concentrazione/i testata/e;
 - condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili.

Controlli

- Controllo positivo
 - identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
 - caratteristiche fisiche, idrosolubilità, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, se del caso e a seconda dei dati disponibili;
 - purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico ecc.;
 - trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
 - concentrazione/i testata/e;
 - condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
 - riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità, se del caso.
- Controllo negativo (con disperdente)
 - identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS e/o altri identificatori;
 - purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico ecc.;
 - caratteristiche fisiche, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, nel caso in cui siano utilizzati controlli negativi/disperdenti diversi da quelli citati nel presente metodo di prova e secondo i dati disponibili;
 - condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
 - motivazione della scelta del solvente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Condizioni del metodo di prova

- nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio;
- descrizione del metodo di prova utilizzato;
- linea cellulare utilizzata, condizioni di conservazione e provenienza (ad esempio, l'infrastruttura dalla quale provengono le cellule);
- numero di passaggi e livello di confluenza delle cellule utilizzate per la prova;
- metodo di conteggio delle cellule utilizzato per l'inoculazione prima della prova e misure prese per assicurare una distribuzione omogenea del numero di cellule (cfr. paragrafo 20);
- il luminometro utilizzato (ad esempio il modello), compresi le impostazioni dello strumento, il substrato di luciferasi utilizzato e la dimostrazione della qualità delle misurazioni della luminescenza sulla base della prova descritta nell'appendice 3;
- la procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'applicazione del metodo di prova (ad esempio mediante sostanze per testare il rendimento) o per dimostrare la riproducibilità dell'applicazione del metodo di prova nel tempo.

Procedura sperimentale

- numero di ripetizioni e di repliche utilizzate;
- concentrazioni della sostanza chimica in esame, modalità di applicazione e tempo di esposizione (se diverso da quello raccomandato);
- descrizione dei criteri di valutazione e di decisione impiegati;
- descrizione dei criteri di accettazione dello studio;
- descrizione di qualsiasi modifica della procedura sperimentale.

Risultati

- presentazione in formato tabulare dei valori I_{max} , $EC_{1.5}$ e di vitalità (ossia IC_{50} e IC_{30}) ottenuti per la sostanza chimica in esame e per il controllo positivo per ciascuna ripetizione, nonché dei valori medi (I_{max} : media aritmetica; $EC_{1.5}$ e vitalità: media geometrica) e delle deviazioni standard calcolate utilizzando i dati delle singole ripetizioni, e indicazione della classificazione della sostanza chimica in esame secondo il modello predittivo;
- coefficiente di variazione ottenuto con le letture della luminescenza per il controllo negativo per ogni esperimento;
- grafico raffigurante le curve dose-risposta per l'induzione dell'attività della luciferasi e la vitalità;
- descrizione di eventuali altre osservazioni pertinenti, se del caso.

Discussione dei risultati

- discussione dei risultati ottenuti con il saggio KeratinoSens™;
- esame dei risultati del metodo di prova nel quadro di un approccio di tipo IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhrer S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
- (4) Capitolo B.42 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea: saggio LLNA (*Local Lymph Node Assay*)
- (5) Capitolo B.6 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea.
- (6) Capitolo B.50 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea: saggio LLNA (*Local Lymph Node Assay*): DA.
- (7) Capitolo B.51 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea: saggio LLNA (*Local Lymph Node Assay*): BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pagine, Available at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.

- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
 - (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
 - (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1969.
 - (22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
 - (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
 - (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
 - (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.
 - (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
 - (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
 - (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitization ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment NO 213, OECD, Paris.
 - (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
 - (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. <http://www.epa.gov/oppead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo e i valori di riferimento comunemente accettati. È una misura dell'efficienza del metodo di prova e un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza» per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (29).

AOP (*Adverse Outcome Pathway, meccanismo d'azione degli eventi avversi*): sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso in vivo (2).

ARE (*Antioxidant Response Element*): l'elemento di risposta agli antiossidanti (denominato anche EpRE, elemento di risposta agli elettrofilici) è un elemento di risposta presente nella regione promotrice a monte di molti geni citoprotettivi e geni di fase II. Una volta attivato da Nrf2, esso media l'induzione trascrizionale di tali geni.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Coefficiente di variazione: misura della variabilità calcolata per un gruppo di dati sulle repliche dividendo la deviazione standard per la media. Tale misura può essere moltiplicata per 100 per ottenere una percentuale.

EC_{1,5}: concentrazione, stabilita per interpolazione, alla quale l'induzione della luciferasi è moltiplicata per 1,5.

IC₃₀: concentrazione alla quale la vitalità cellulare è ridotta del 30 %.

IC₅₀: concentrazione alla quale la vitalità cellulare è ridotta del 50 %.

Pericolo: proprietà intrinseca di un agente o di una situazione in grado di provocare effetti avversi se un organismo, un sistema o una (sotto)popolazione vi sono esposti.

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment, approcci integrati in materia di prove e valutazioni*): approccio strutturato utilizzato per l'identificazione del pericolo (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o la valutazione della sicurezza (potenziale/potenza ed esposizione) di una sostanza chimica o di un gruppo di sostanze chimiche, che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

I_{max}: fattore d'induzione massima dell'attività della luciferasi, a qualsiasi concentrazione della sostanza chimica in esame, rispetto al controllo (negativo) con solvente.

Keap1: Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) è una proteina sensore in grado di regolare l'attività del fattore Nrf2. In condizioni non indotte la proteina sensore Keap1 attiva il fattore di trascrizione Nrf2 e ne provoca l'ubiquitinazione e la degradazione proteolitica nel proteasoma. In caso di modifica covalente dei residui di cisteina reattiva di Keap1 da parte di molecole di piccole dimensioni, il fattore Nrf2 può dissociarsi da Keap1 (8) (10) (11)).

Miscela: miscela o soluzione costituita da due o più sostanze che non reagiscono tra loro (1).

Sostanza mono-costituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

Sostanza multiconstituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multiconstituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multiconstituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multiconstituente è il risultato di una reazione chimica.

Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2): fattore di trascrizione che interviene nel percorso di risposta agli antiossidanti. Quando Nrf2 non è ubiquitinato, esso si sviluppa nel citoplasma e si sposta nel nucleo, dove si combina all'ARE nella regione promotrice a monte di molti geni citoprotettivi, dando inizio alla loro trascrizione (8) (10) (11).

Controllo positivo: replica contenente tutti i componenti di un sistema di prova, trattata con una sostanza che notoriamente induce una risposta positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

Pertinenza: descrizione della relazione tra la prova e l'effetto di interesse e indicazione del fatto che la prova sia o meno significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende la valutazione dell'accuratezza (concordanza) di un metodo di prova (29).

Affidabilità: misura in cui un metodo di prova può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. L'affidabilità è valutata calcolando la riproducibilità intra- e inter-laboratorio e la ripetibilità intra-laboratorio (29).

Riproducibilità: concordanza dei risultati ottenuti dall'esecuzione di prove sulla stessa sostanza chimica in applicazione dello stesso protocollo sperimentale (cfr. Affidabilità) (29).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate con il metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (29).

Controllo con solvente/disperdente: replica contenente tutti i componenti di un sistema di prova, esclusa la sostanza chimica in esame, ma incluso il solvente utilizzato. È utilizzata per stabilire la risposta di base per i campioni trattati con la sostanza chimica in esame disciolta nello stesso solvente.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate con il metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (29).

Sostanza: elementi chimici e loro composti allo stato naturale o ottenuti mediante un processo di produzione, compresi gli additivi necessari a conservare la stabilità del prodotto e le impurità derivanti dal processo utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza ripercussioni sulla stabilità della sostanza o modifiche della sua composizione (1).

Sostanza chimica in esame: il termine "sostanza chimica in esame" designa la sostanza oggetto della prova.

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi standardizzati e livelli di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di precauzioni e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiale biologico.

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in assoluto ma solo in relazione a un determinato scopo (29).

Appendice 2

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA

Sensibilizzazione cutanea in vitro: metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2

Prima di utilizzare sistematicamente il presente metodo di prova, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo correttamente la predizione attesa con il metodo KeratinoSens™ per le 10 sostanze raccomandate nella tabella 1 e ottenendo i valori EC_{1,5} e IC₅₀ che rientrano nel rispettivo intervallo di riferimento per almeno 8 delle 10 sostanze. Tali sostanze sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte per quanto riguarda i pericoli di sensibilizzazione cutanea. Altri criteri di selezione sono la disponibilità in commercio, la disponibilità di dati di riferimento in vivo di alta qualità e la disponibilità di dati in vitro di alta qualità ottenuti con il saggio KeratinoSens™.

Tabella 1

Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il saggio KeratinoSens™

Sostanza chimica	CASRN	Stato fisico	Predizione <i>In Vivo</i> ⁽¹⁾	Predizione KeratinoSens™ ⁽²⁾	EC _{1,5} (µM) Intervallo di riferimento ⁽³⁾	IC ₅₀ (µM) Intervallo di riferimento ⁽³⁾
Isopropanolo	67-63-0	Liquido	Non sensibilizzante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Acido salicilico	69-72-7	Solido	Non sensibilizzante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Acido lattico	50-21-5	Liquido	Non sensibilizzante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Glicerolo	56-81-5	Liquido	Non sensibilizzante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Alcole cinnamico	104-54-1	Solido	Sensibilizzante (debole)	Positiva	25 — 175	> 1 000
Etilene glicol dimetacrilato	97-90-5	Liquido	Sensibilizzante (debole)	Positiva	5 — 125	> 500
2-mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Solido	Sensibilizzante (moderato)	Positiva	25 — 250	> 500
Metildibromoglutaronitrile	35691-65-7	Solido	Sensibilizzante (forte)	Positiva	< 20	20 — 100
4-metilaminofenolo fosfato	55-55-0	Solido	Sensibilizzante (forte)	Positiva	< 12,5	20 — 200
2,4-dinitroclorobenzene	97-00-7	Solido	Sensibilizzante (estremo)	Positiva	< 12,5	5 — 20

⁽¹⁾ La predizione del pericolo (e della potenza) in vivo si basa sui dati dell'LLNA (13). La potenza in vivo è determinata mediante criteri proposti da ECETOC (24).

⁽²⁾ Una predizione KeratinoSens™ deve essere considerata nel quadro di un approccio di tipo IATA e conformemente alle disposizioni dei paragrafi 9 e 11 del presente metodo di prova.

⁽³⁾ Sulla base dei dati storici osservati (12).

Appendice 3

CONTROLLO QUALITÀ DELLE MISURAZIONI DELLA LUMINESCENZA**Esperimento di base volto a garantire misurazioni ottimali della luminescenza con il saggio KeratinoSens™**

I tre parametri elencati di seguito sono essenziali per ottenere risultati affidabili con il luminometro:

- sensibilità sufficiente ad assicurare un livello di fondo stabile nei pozzetti contenenti il controllo;
- assenza di gradiente sulla piastra risultante da tempi di lettura lunghi; e
- assenza di contaminazione luminosa dei pozzetti adiacenti da parte di pozzetti molto attivi.

Prima di procedere all'esecuzione della prova, si consiglia di accertarsi che le misurazioni della luminescenza siano di qualità adeguata eseguendo una prova su una piastra di controllo predisposta nel modo descritto di seguito (analisi in triplo).

Predisposizione della piastra per il primo esperimento preliminare

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Vuoto

EGDMA = etilene glicol dimetacrilato (n. CAS: 97-90-5), sostanza chimica che provoca una forte induzione

CA = aldeide cinnamica, riferimento positivo (n. CAS: 104-55-2)

L'analisi di controllo della qualità deve dimostrare:

- una relazione dose-risposta chiara per la riga D, con un valore $I_{\max} > 20$ volte il livello di fondo (nella maggior parte dei casi i valori I_{\max} sono compresi tra 100 e 300);

-
- l'assenza di una relazione dose-risposta per le righe C ed E (valori di induzione non superiori a 1,5 — idealmente non superiori a 1,3) dovuta a una possibile contaminazione luminosa, soprattutto in prossimità dei pozzetti molto attivi della riga EGDMA;
 - l'assenza di una differenza statisticamente significativa tra le righe A, B, C, E, F e G (assenza di gradiente sulla piastra); e
 - una variabilità inferiore al 20 % (livello di fondo stabile) per le righe A, B, C, E, F e G e i pozzetti contenenti DMSO della riga H.
-