

## **Determinazione in vitro della fototossicità**

La fototossicità è una reazione acuta che può essere causata da un singolo trattamento con una sostanza contemporaneamente all'esposizione alle radiazioni visibili o UV. Alcune linee guida internazionali riportano delle raccomandazioni per la conduzione di studi di fototossicità, tuttavia la OCSE non ha ancora accettato una linea guida per studi di fotoirritazione in vivo, ma ha raccomandato l'uso di saggi in vitro, prima di ricorrere ai test con gli animali (OCSE, 1996). I metodi in vitro sviluppati in questo settore comprendono saggi per lo screening di sostanze fototossiche, che usano principalmente cellule in coltura, e modelli basati sui meccanismi molecolari e cellulari della fototossicità. Di questi solo uno, il saggio di assunzione di rosso neutro con cellule Balb/c 3T3, è stato considerato scientificamente valido da ESAC (ECVAM, 1998a) e il protocollo, già presente nella Direttiva europea 86/609 (B 41. In vitro 3T3 NRU phototoxicity test) e nella linea guida OECD 432, pubblicato ECVAM INVITTOX PROTOCOL n°78, è adottato dal laboratorio Chelab per la verifica della fototossicità di prodotti cosmetici.

### **Saggio di assunzione del rosso neutro con cellule Balb/c3T3**

Il saggio 3T3 NRU PT prevede l'uso di fibroblasti di topo (Balb/c 3T3, clone 31), sui quali, dopo trattamento con la sostanza in esame e dopo opportuno irraggiamento, viene effettuato il test di assunzione del rosso neutro.

Questo è un test di vitalità che si basa sull'assorbimento del colorante vitale all'interno dei lisosomi delle cellule ancora integre. Il saggio di assunzione del rosso neutro è stato pubblicato per la prima volta nel 1985 (Borenfreund e Puerner, 1985) come possibile alternativa in vitro al test di Draize sul coniglio ed utilizzato, sia pure dopo lievi aggiustamenti, per evidenziare il potere irritante di sostanze di varia natura. Successivamente il protocollo è stato modificato per adattarlo al test di fototossicità, introducendo una fase di incubazione con la sostanza in esame prima dell'irraggiamento ed utilizzando una soluzione di sali di Earles come mezzo di incubazione delle cellule durante il periodo di irraggiamento.

I dati ottenuti della vitalità cellulare del campione e della sostanza di riferimento vengono elaborati con apposito software, riconosciuto e approvato da ECVAM in specifico per tale test, per ottenere la IC50 (con e senza trattamento UVA) che viene espressa come concentrazione mg/mL per il campione e come µg/mL per il controllo positivo.

Viene così calcolato il fattore di foto-irritazione (PIF) con la seguente formula:

$$\text{PIF} = \text{IC50 (-UVA)} / \text{IC50 (+UVA)}$$

Secondo la linea guida OECD 432 il campione in esame:

- Non è fototossico se  $\text{PIF} < 2$
- È probabilmente fototossico se  $2 < \text{PIF} < 5$
- È fototossico se  $\text{PIF} > 5$

Durante la fase di prevalidazione e lo studio di validazione internazionale vero e proprio (EU/COLIPA) che è stato condotto da 9 laboratori con risultati riproducibili, il test ha dimostrato di essere predittivo e di saper discriminare tra sostanze fotoirritanti e non.