Laboratorio per le Tecnologie delle Terapie Avanzate

Analisi della sensibilizzazione cutanea in vitro tramite metodo U-SENS™ per nuove molecole, materiali innovativi e medical devices

Valutazione in vitro della sensibilizzazione cutanea mediante la quantificazione del cambiamento di espressione del CD86 associato al processo di attivazione dei monociti e delle cellule dendritiche utilizzando il test U-SENS™.
A contatto con sostanze sensibilizzanti, le cellule di linfoma istiocitico umano U937 vengono attivate e aumentano l'espressione del marker di superficie CD86. L'U-SENS™ è un metodo in vitro che permette di valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea di sostanze e/o composti. Il calcolo dell'indice di stimolazione del marker cellulare CD86 e della percentuale di vitalità cellulare, valutate tramite citometria a flusso, permette di discriminare tra sostanze sensibilizzanti e non. Il saggio messo a punto da LTTA seguendo le indicazioni del test U-SENS™, descritto nella linea guida OECD/OCDE 442E, sfrutta una nuova tecnologia che consente di ottenere risultati affidabili, riproducibili e predittivi in tempi rapidi.

Laboratorio	LTTA
Area di specializzazione	Salute e Benessere
Referenti	Fabio Casciano, Rebecca Voltan
Keyword	sensibilizzazione, CD86, vitalità cellulare

"Saggio per la valutazione della biocompatibilità cutanea"

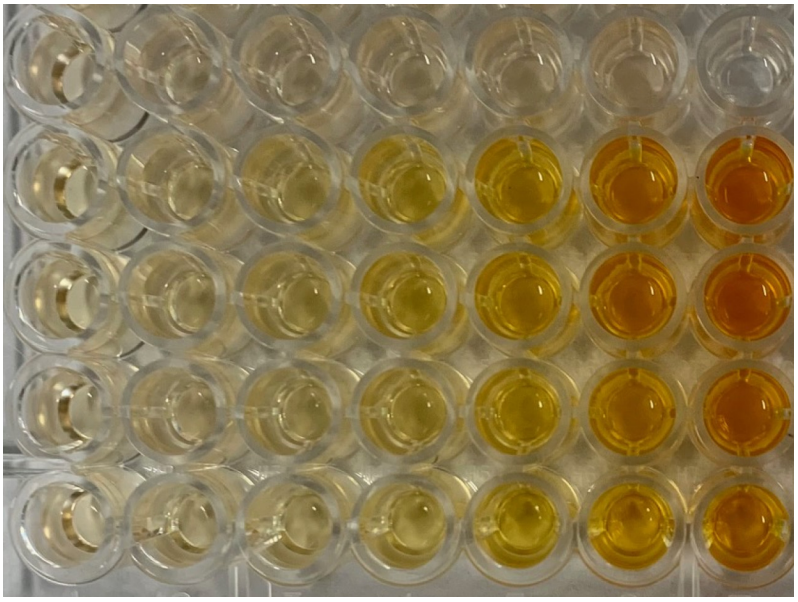


Fig. 1: cellule U937 trattate in piastra con le sostanze oggetto di studio

RETE ALTA TECNOLOGIA
EMILIA-ROMAGNA
HIGH TECHNOLOGY NETWORK

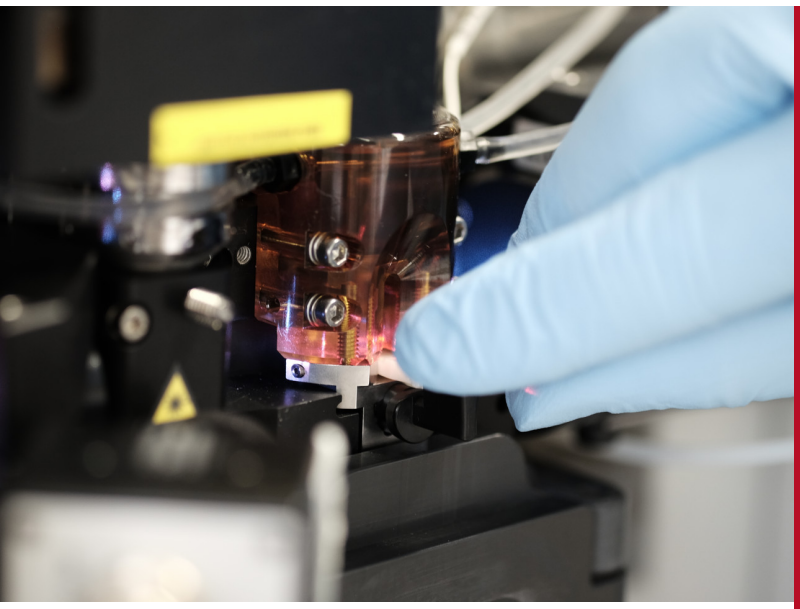


Fig. 2: particolare dello strumento con cui è stata effettuata l'analisi dei campioni U-SENS™

Descrizione

Il test U-SENS™ è utile per testare il potere sensibilizzante sulla cute di materiali, medical devices, creme cosmetiche, sostanze, estratti biologici o altre molecole. E' particolarmente indicato per studiare la sensibilizzazione prima dei test sugli animali o in loro sostituzione in alcuni casi.
E' un test in vitro che quantifica i cambiamenti nell'espressione del marker di superficie cellulare (CD86) sulla linea cellulare di derivazione umana (cellule U937) dopo 45 ± 3 ore di esposizione alla sostanza da indagare. Il marker di superficie CD86 è un tipico marker di attivazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi. Il cambiamento dei livelli di espressione del CD86 rispetto al veicolo di controllo viene rilevato mediante la citometria a flusso in seguito alla colorazione cellulare con anticorpi marcati con isocianato di fluoresceina. L'indice di stimolazione del CD86 rispetto al controllo viene calcolato per discriminare le sostanze sensibilizzanti da quelle non sensibilizzanti.

Aspetti innovativi

In medicina si ha la necessità di predire la risposta biologica di organi e tessuti quando questi vengono a contatto con composti o farmaci. La nostra cute è continuamente esposta ad agenti esterni che possono scatenare risposte allergiche.
Per questa ragione, la disponibilità di analisi in vitro per la valutazione della sicurezza di prodotti che implicano un contatto cutaneo (breve o prolungato) rappresenta un obiettivo fondamentale per la ricerca e sviluppo.
Grazie a questo saggio si ha la possibilità di ottenere risposte in tempi brevi e con costi contenuti sul potenziale effetto sensibilizzante delle sostanze oggetto di studio.

Applicazioni

Il saggio U-SENS™ può essere applicabile per l'analisi di diverse sostanze chimiche e di materiali che possono entrare in contatto con la cute. L' U-SENS™ grazie alla riproducibilità e affidabilità dimostrata offre la possibilità di studiare qualsiasi sostanza o composto di cui si vogliano conoscere gli effetti sensibilizzanti. Questo può essere d'interesse per aziende cosmetiche, biomedicali ed in genere del settore biotecnologico per studi di nuove molecole, materiali innovativi, dispositivi medici o cosmetici nelle varie fasi di sviluppo.

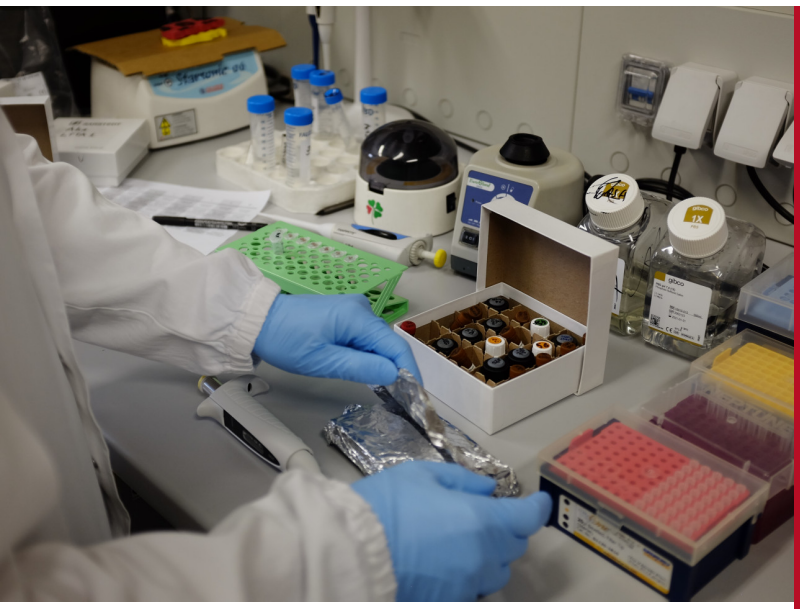


Fig. 3: procedura di marcatura delle cellule per l'acquisizione al citofluorimetro

Partner coinvolti	TPM- Tecnopolo Mirandola “Mario Veronesi” IRST- Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori" di Meldola (FC)
Tempi di realizzazione	1 mese
Livello di maturità tecnologica	TRL 9 - sistema reale testato in ambiente operativo
Valorizzazione applicazione	Il servizio è già disponibile ed ad oggi è stato già utilizzato nell’ambito del progetto **POR FESR *Cubibox*** per testare prodotti cosmetici e medical devices.

Esempio di applicazione

Analisi della sensibilizzazione cutanea di un fluido corpo

Il fluido corpo viene applicato a livello cutaneo e permane su ampie superfici del corpo per un tempo molto lungo; per questo, è importante valutare la sua biocompatibilità specifica sulla cute. Grazie all’U-SENS™ assay LTTA è grado di valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea, requisito fondamentale nella valutazione della sicurezza delle sostanze prodotte come richiesto dalla legislazione chimica nell'Unione Europea.

Il saggio è stato messo a punto seguendo la normativa OECD/OCDE 442E che prevede la valutazione in vitro della sensibilizzazione cutanea sulla linea cellulare U937 di derivazione umana attraverso l’analisi dell’espressione del marker di superficie CD86. Il protocollo seguito per testare il fluido corpo ha previsto una prima parte di preparazione del composto portandolo ad una concentrazione di 50 mg/mL. Successivamente è stato diluito alle concentrazioni finali di 6.25-12.5-25-100-200 µg/ml nel mezzo di coltura usato per le cellule.
Oltre alla sostanza da testare, vengono testati parallelamente anche il controllo positivo (TNBS o resorcinolo) alla dose di 50 µg/mL e il controllo negativo (acido lattico) alla dose di 200 µg/mL. Il fluido corpo, il controllo positivo e negativo, il veicolo e il terreno di coltura delle cellule vengono incubati 1:1 (v/v) con la sospensione cellulare preparata nella piastra a fondo piatto da 96 pozzetti per 45±3 ore a 37°C- 5% di CO2. L’analisi citofluorimentrica viene eseguita in seguito alla colorazione delle cellule con anticorpo anti-CD86 marcati con FITC. Infine, viene applicato un algoritmo per il calcolo dell’indice di stimolazione e della percentuale di vitalità cellulare che permette di discriminare tra sostanze sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanee.

LTTA

Laboratorio per le Tecnologie delle Terapie Avanzate



LTTA è un Laboratorio accreditato dalla Regione Emilia-Romagna che si basa sull'attività coordinata di servizi con competenze complementari e fortemente indirizzate all'innovazione e al trasferimento tecnologico nel settore delle Scienze della vita e Tecnologie per la salute. LTTA si occupa principalmente di studiare, a fini applicativi, i meccanismi di differenziamento e rigenerazione tissutale ed effettuare indagini genomiche e proteomiche in patologie ad alto impatto assistenziale (es: neoplastiche, cardiovascolari, neurodegenerative e infettive). Tra le attività più rilevanti di LTTA si distinguono le attività di preclinical testing su sistemi in vitro e in vivo. I 7 Servizi altamente qualificati di LTTA (Animal facility, Biobanca, Bioinformatica, Citofluorimetria/cell sorting, Interazioni molecolari, biomarkers e delivery, Microscopia Avanzata, Ricerca clinica) interagiscono con imprese ed enti pubblici e privati grazie alla messa a disposizione di competenze, moderne metodologie e strumentazioni. LTTA fa parte di network nazionali ed internazionali di collaborazione per progetti regionali ed europei.

Sito web	https://ltta.tecnopolo.fe.it/
Direttore	Paola Rizzo
Data pubblicazione	09/06/2022