

MURINE LOCAL LYMPH NODE ASSAY (LLNA)



DEFINICIÓ

Test *in vivo* per avaluar el potencial d'un producte químic per induir dermatitis al·lèrgica de contacte (ACD) en humans.

END-POINT

Proliferació de limfòcits als nòduls limfàtics auriculars.

MOSTRA

Suspensió cel·lular dels nòduls limfàtics auriculars de ratolins femelles CBA/Ca o CBA/J.

INTRODUCCIÓ

El test del Nòdul Limfàtic Local murí (LLNA) ha estat validat per ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) i per ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), i protocolitzat a la directriu OCDE 429, com a mètode alternatiu al tradicional assaig de maximització en conill porquí (*Guinea Pig Maximization Test de Magnusson i Kligman*, GPMT, recollit en la directriu 406 de l'OCDE). Permet la identificació del risc potencial de produir dermatitis al·lèrgica de contacte per un agent químic.

En comparació al GPMT, el LLNA aporta avantatges en el benestar animal (eliminació de patiment i stress) i reducció del nombre total d'animals.

El principi bàsic del LLNA és la mesura de la proliferació de limfòcits en els nòduls limfàtics auriculars, els quals drenen l'àrea de les orelles (zona d'aplicació del producte químic o "agent sensibilitzador").

Aquesta proliferació és deguda a l'activació de la resposta immune front a la sensibilització dèrmica local produïda per l'agent sensibilitzador en qüestió.

Generalment, aquesta proliferació és proporcional a la dosi aplicada i permet una mesura objectiva i quantitativa de la sensibilització.

TÈCNICA

S'utilitzen ratolins femella de les soques CBA/Ca o CBA/J, d'edat compresa entre les 8 i les 12 setmanes, 5 animals per cada grup de tractament, amb un mínim de 3 concentracions consecutives de la substància a assajar, a més dels grups de control positiu i negatiu.

En resum, el protocol a seguir és el següent:

Es realitza un protocol de sensibilització, que consisteix en tres dies de tractament (al dors d'ambdues orelles) i dos dies de repòs dels animals. A continuació s'administra timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) per via intravenosa, i, transcorregudes cinc hores, es sacrifiquen els animals i s'extreuen els nòduls limfàtics auriculars. Aquests òrgans s'homogeneïtzen i s'efectua una lectura de radiació β (recompte de desintegracions per minut).

La concentració màxima a provar del producte problema serà la més elevada que no produeixi toxicitat sistèmica ni inflamació local excessiva. Per tal de determinar la concentració apropiada pot ser necessària la realització d'un assaig preliminar (*range finding*). S'utilitza el vehicle com a control negatiu i el mercaptobenzotiazol com a control positiu.

Els resultats de cada grup tractat s'expressen mitjançant l'índex d'estimulació (SI), el qual és el quocient entre la mitjana de les desintegracions per minut (dpm) per cada ratolí en el grup i les

dpm/ratolí del grup control negatiu (per a cada un dels grups tractats i dels control positiu).

La substància testada es considerarà sensibilitzadora de la pell quan el SI per cada tractament sigui superior o igual a 3. Ara bé, el SI no serà l'únic factor a tenir en compte per a la interpretació dels resultats; s'hauran de considerar altres factors com: la relació dosi-resposta, la toxicitat, la solubilitat, la consistència del vehicle i les respostes dels controls positius.

APLICACIONS

- Avaluació de la capacitat sensibilitzadora d'un producte, fonamentalment en el sector de la cosmètica i en el sector farmacèutic.

NORMATIVES I BIBLIOGRAFIA

- Murine Local Lymph Node Assay (LLNA). ICCVAM IWG LLNA Protocol. January 2001.
- Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S., ICCVAM Evaluation of the Murine Local Lymph Node Assay - I. The ICCVAM Review Process. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 34 (3), p.249-257, Dec 2001.
- Dean, JH, Twerdok, LE, Tice, RR, Sailstad, DM, Hattan, DG I Stokes, WS. ICCVAM Evaluation of the Murine Local Lymph Node Assay. II. Conclusions and Recommendations of an Independent Scientific Peer Review Panel. Regulatory Toxicology and Pharmacology 34, 258-273 (2001).
- Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S., ICCVAM Evaluation of the Murine Local Lymph Node Assay - III. Data Analyses Completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 34 (3), p.274-286, Dec 2001.
- Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD 429.