

# L'assorbimento

***Emanuela Testai***

**Istituto Superiore di Sanità  
Department of Environment and Primary Prevention  
Mechanisms of Toxicity Unit  
Rome-Italy  
*emanuela.testai@iss.it***



E  
s  
p  
o  
s  
i  
z  
i  
o  
n  
e

Fase farmaco/  
tossico-cinetica

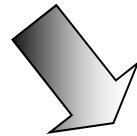
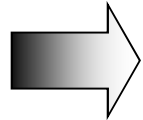
ADME X  $\rightarrow$  X\*

assorbimento

distribuzione

metabolismo

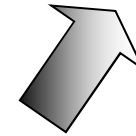
escrezione



Fase farmaco/  
tossico- dinamica

Interazione  
tra X o X\* e  
il bersaglio

Effetto



## VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE

Quale è il livello di esposizione?

- **esterna** → A quale concentrazione una data sostanza è presente nei vari comparti ambientali/ dieta/aria /ambienti lavorativi/in prodotti ad uso voluttuario?

Attraverso quali vie l'uomo è esposto? (inalatoria, cutanea, orale..)

In quali situazioni ? lavoro, ambiente, stili di vita, alimentazione..

A quale sostanza si è esposti? (ad es., possono essere rilevanti i prodotti di degradazione ambientale)

**Interna** → Quale è la concentrazione della 'specie chimica' tossicologicamente rilevante negli organi o tessuti e comunque al bersaglio?

ADME (% di assorbimento cutaneo/orale/inalatorio)  
Biomarcatori di esposizione  
Studi di biomonitoraggio e misura del 'body-burden'

## Parametri essenziali da derivare

- % **Assorbimento** per via **orale**
- % **Assorbimento** per via **cutanea** (se non disponibile si usano valori di default vedi ad esempio la linea Guida EFSA per i pesticidi, i documenti SCCS, la adottanda linea Guida sui biocidi)
- % **Assorbimento** per via **inalatoria** (se non disponibile si procede con *route to route extrapolation*)
- Potenziale di bioaccumulo

## GLI STUDI DI TOSSICOCINETICA

...ovvero come studiare il destino di uno xenobiotico all'interno dell'organismo.....

**Come entra?**

**Come si muove?**

**Dove e come si distribuisce?**

**Come si trasforma?**

**Come e quanto viene eliminato? Attraverso quali vie?**

## Differenze e similitudini tra modelli animali e uomo

L'attività biologica di una sostanza chimica è in genere simile nell'uomo e negli animali

Le **maggiori diversità tra le specie sono dovute alla tossicocinetica** di uno xenobiotico nell'organismo, e specialmente in **assorbimento** e **metabolismo**

Le differenze di specie sono dovute :

- ✓ Diversa espressione genica dei **trasportatori** o degli **enzimi** coinvolti
- ✓ Diversi parametri cinetici, specificità di substrato e risposta ad attivatori/inibitori dei trasportatori o degli enzimi coinvolti

## Tossicocinetica

I parametri tossicocinetici : assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (**ADME**) permettono di valutare la dose interna di esposizione. Negli **studi in vivo** costituiscono parte integrante del modello animale: in un **approccio totalmente in vitro** considerazioni legate alla cinetica devono necessariamente essere poste come step iniziale della valutazione.



A questo dovranno essere accoppiati **studi di biocinetica in vitro** durante i test di tossicità.



Principali vie di ingresso:

**mucosa GI (via orale)**

**epitelio polmonare (via inalatoria)**

**cute (via dermale)**



Principali vie di escrezione:

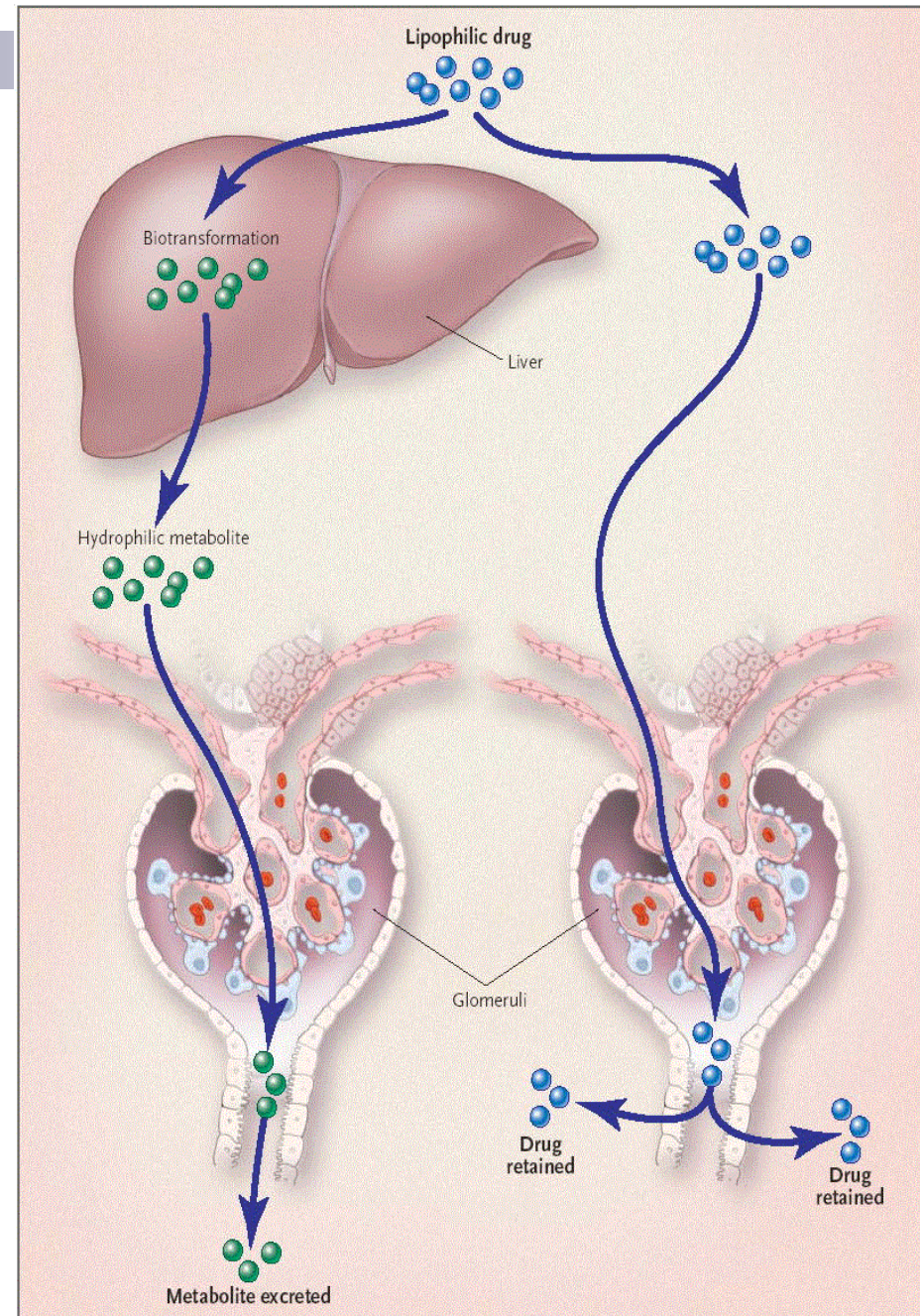
**urinaria**

**fecale (via biliare)**

**aria espirata**

**sudore**

**latte materno**



**Figure 1.** The Effect of Drug Metabolism on Excretion.

Lipophilic (or fat-soluble) drugs are metabolized to form relatively more hydrophilic (or water-soluble) metabolites than the parent drug, and these metabolites are thus more easily excreted.

## La TG OCSE che regola gli studi di Tossicocinetica è la TG n° 417 (aggiornata al 2010)

Viene chiaramente stabilita la necessità di **elasticità** nel disegno dello studio, in dipendenza delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto da testare.

Nonostante ad oggi ci sia una sola linea guida per il metodo in vitro (assorbimento percutaneo -TG 428) per condurre studi preclinici di ADME, sia nella TG417 che nel TGD della UE per il Risk Assessment è chiaramente evidenziata l'utilità di condurre studi in vitro per l'assorbimento, il metabolismo e le possibili interazioni.

## STUDI CLASSICI DI ADME IN VIVO

### Studi su animali (in genere ratti o topi)

- **Somministrazione dello xenobiotico (generalmente marcato con isotopi radioattivi) : via orale e i.v. o altre se pertinenti.**

Singola somministrazione di 2 dosi ben distanziate (bassa e alta) per evidenziare eventuali fenomeni di saturazione dell'assorbimento;

La marcatura radioisotopica permette di fare un bilancio completo, senza conoscere i processi di biotrasformazione

Prelievi di sangue a tempi diversi (da pochi minuti a 168 ore); uso di gabbie metaboliche a contenimento totale per la raccolta di urine, feci e aria espirata (con uso di opportune trappole) a tempi diversi.

Al sacrificio: prelievo degli organi (sui quali determinare la presenza di residui) e analisi della carcassa per il bilancio totale.

## STUDI CLASSICI DI ADME IN VIVO

- **Determinazione della concentrazione plasmatica  $f(t)$  per la determinazione di AUC,  $t_{1/2}$  e  $Cl_i$**

Il confronto tra la AUC orale e quella i.v. da importanti informazioni **sull'entità dell'assorbimento** (la via i.v. scavalca tutte le barriere delle vie di entrata e viene immessa direttamente nel circolo).

Il valore di  $t_{1/2}$  e la cinetica di eliminazione dal sangue forniscono indicazioni sulla **persistenza della sostanza** nei vari compartimenti. Spesso si identifica un andamento bifasico: il primo dovuto essenzialmente al first pass effect, il secondo alla eliminazione della quantità distribuita agli organi meno o più lentamente perfusi.

## STUDI CLASSICI DI ADME IN VIVO

- **Determinazione della escrezione urinaria, fecale e nell'aria espirata  $f(t)$  del parentale e dei metaboliti**

Tutta la radioattività presente nelle urine, deriva chiaramente da materiale che è stato **assorbito**, per cui il valore di escrezione urinaria può venir utilizzato come indicazione di assorbimento.

Al contrario la radioattività presente nelle feci può essere dovuta alla somma tra materiale assorbito (successivamente escreto) e materiale **non assorbito** e semplicemente transitato nel tratto GI.

Per distinguere le due componenti si utilizza l'incannulazione della via biliare: ciò che passa dalla bile è stato sicuramente assorbito.

Una variazione delle percentuali di escrezione urinaria e fecale tra dosi basse/alte può indicare una variazione di pathway metabolico o una saturazione delle vie di escrezione.

L'escrezione nell'aria espirata è spesso associata ad eliminazione di CO<sub>2</sub>, indice di metabolismo completo al residuo monocarbonioso.

## STUDI CLASSICI DI ADME IN VIVO

- **Determinazione del potenziale di bioaccumulo : misura della concentrazione nei vari organi  $f(t)$**

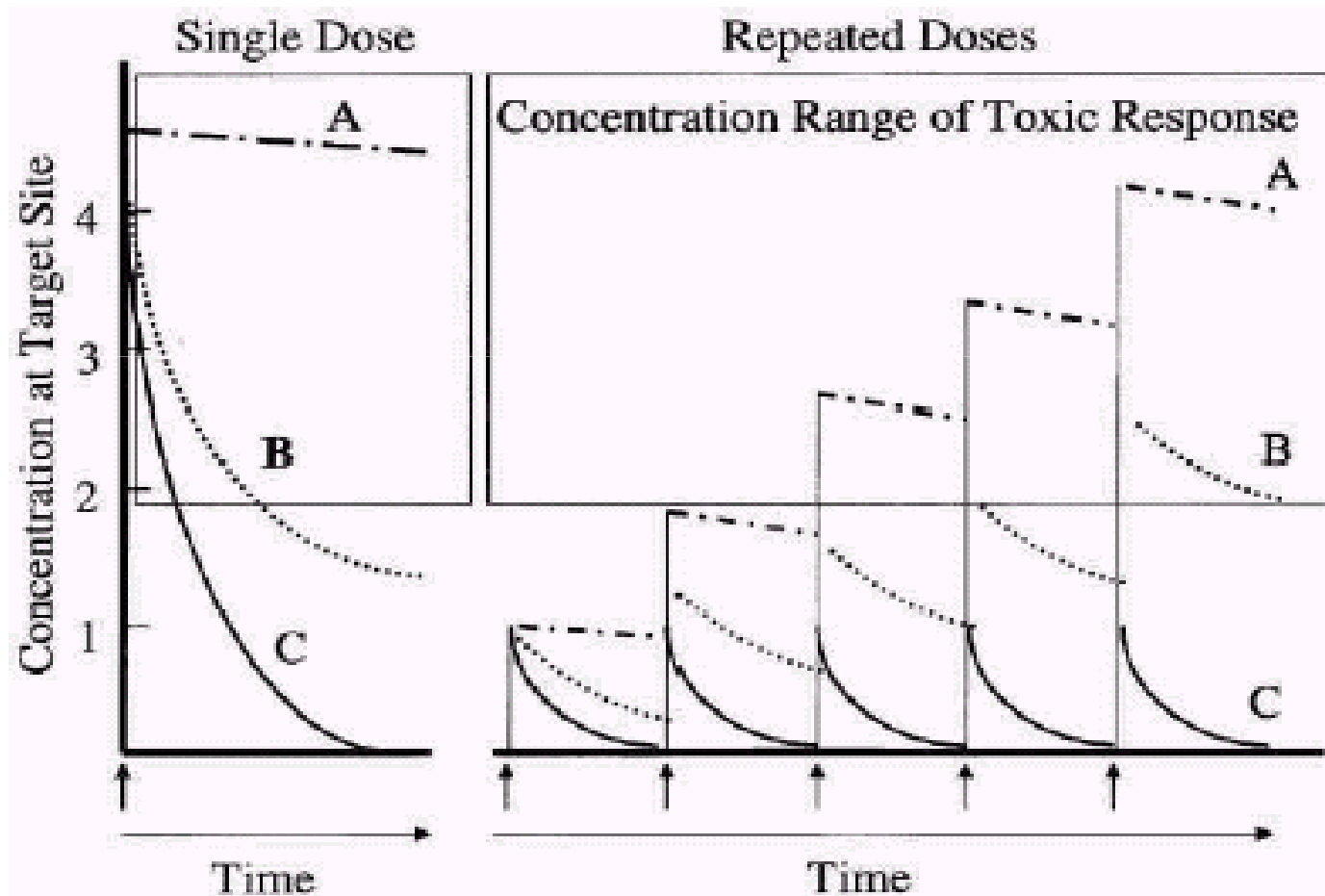
La lipofilicità del composto fornisce la prima indicazione sulla sua persistenza nell'organismo: composti molto lipofili bioaccumulano nelle membrane e nel tessuto adiposo con facilità.

Il tempo di permanenza dei residui dopo la singola somministrazione fornisce ulteriori informazioni e indica gli organi in cui lo xenobiotico tende ad accumularsi.

Le differenze tra le singole e somministrazioni ripetute (13-14 gg. con il prodotto freddo, l'ultima dose con il marcato) indicano il reale potenziale di bioaccumulo, evidenziano cambi di metabolismo ed escrezione dovuti a fenomeni di induzione enzimatica, importanti indicazioni per gli studi di tossicità ripetuta.

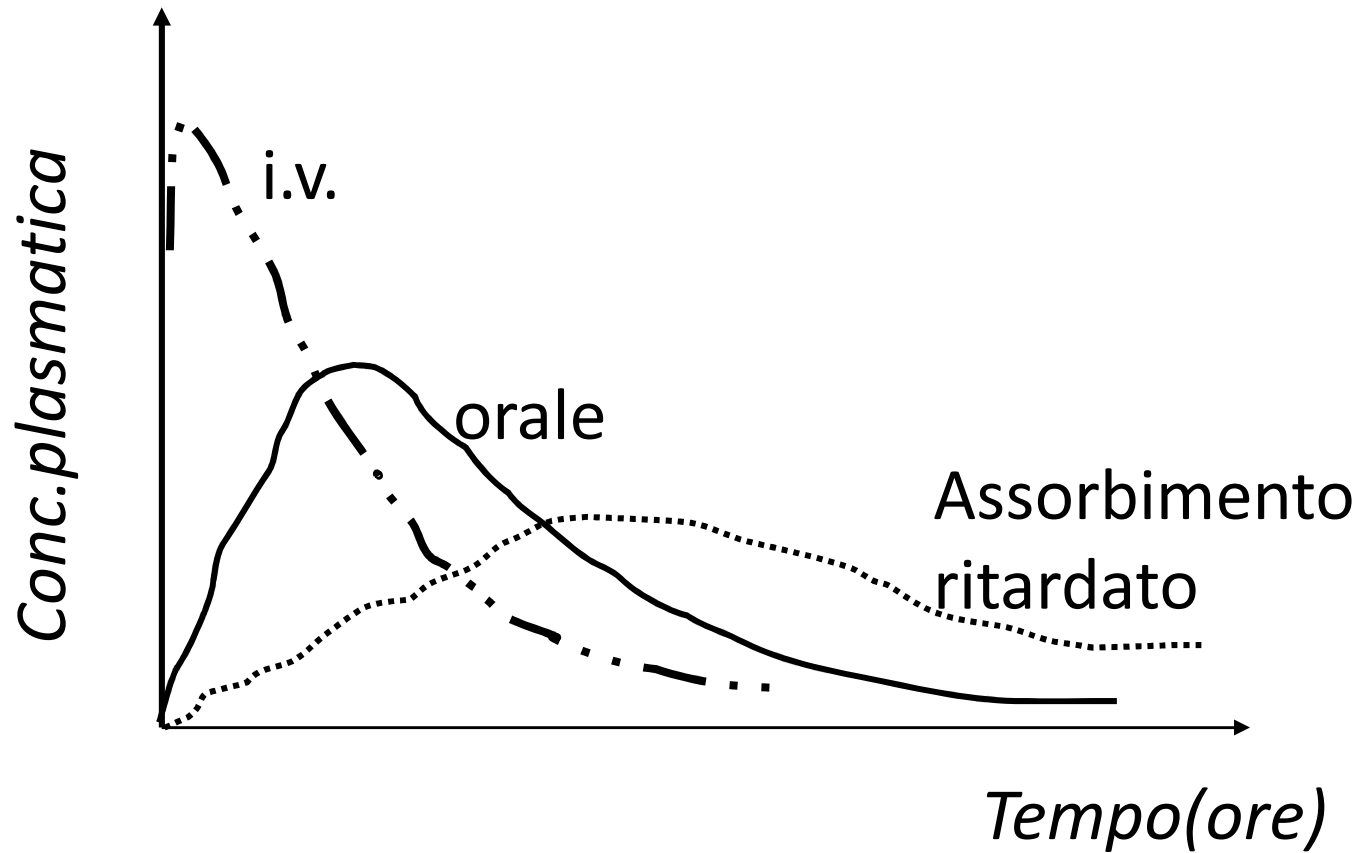
- ✓ Se la frequenza di somministrazione è tale che la velocità di somministrazione è maggiore della velocità di eliminazione  $\Rightarrow$  **accumulo del tossico** e raggiungimento dello stato stazionario.
- ✓ Il raggiungimento dello stato stazionario dipende dall'emivita del tossico e dalla frequenza di somministrazione. Per avere lo stato stazionario, il tossico deve essere somministrato ad intervalli di tempo inferiori a 5 emivite.
- ✓ E' quindi importante conoscere l'emivita del tossico per prevedere l'entità dell'esposizione.

Relationship between dose and concentration at the target site under different conditions of dose frequency and elimination rate

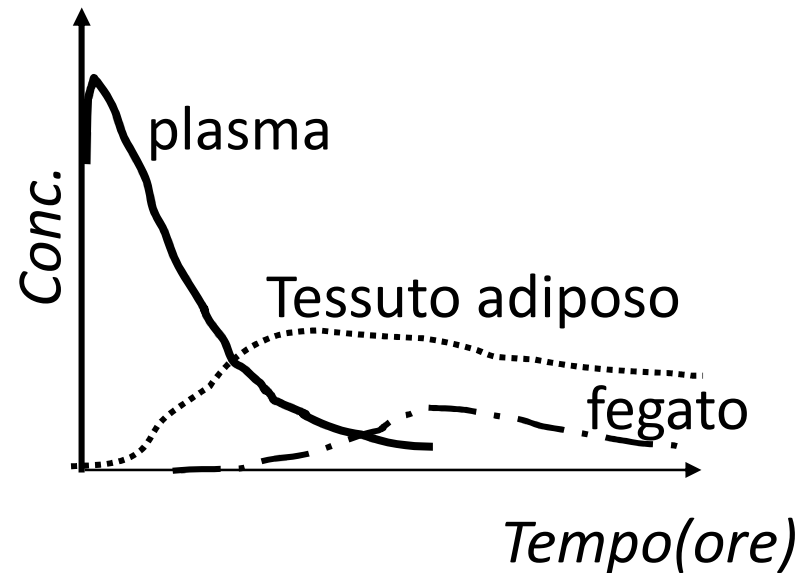
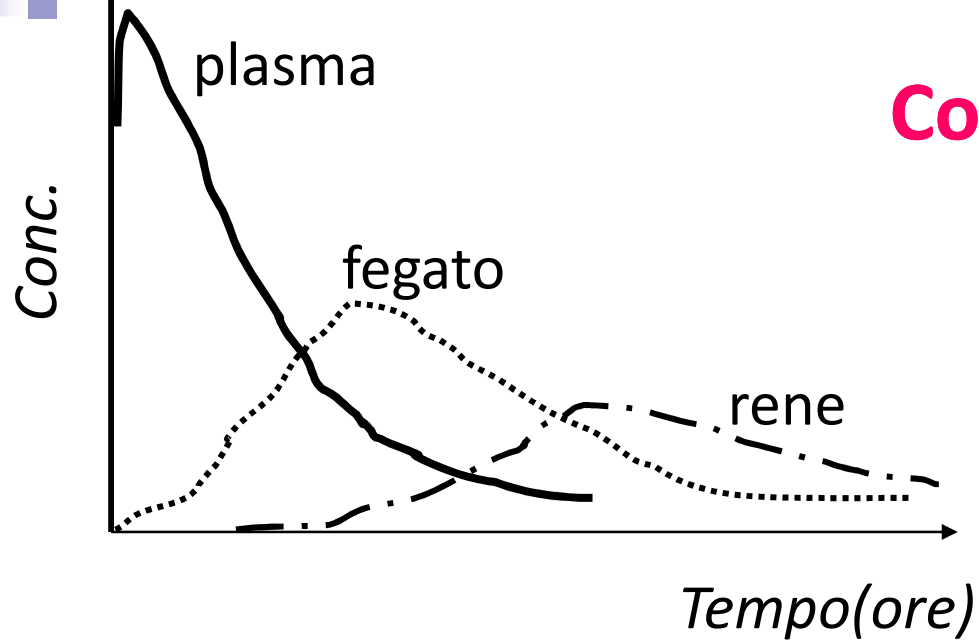




## Diversi comportamenti cinetici



# Comportamenti cinetici



## STUDI CLASSICI DI ADME IN VIVO

- **Identificazione qualitativa e quantitativa dei metaboliti prodotti e costruzione del pathway metabolico.**

Analisi delle frazioni plasmatiche, urinarie, fecali caratterizzate da presenza di radioattività con metodi generalmente cromatografici abbinati a spettrometria di massa per l'identificazione della struttura dei metaboliti prodotti.

Utilizzo di enzimi idrolitici per ottenere dai coniugati il prodotto di partenza.

Analisi dei tessuti, omogenizzazione ed estrazione con solventi a diversa polarità per valutare la frazione libera e quella eventualmente legata covalentemente alle macromolecole cellulari.

Non è possibile pensare ad un **singolo studio in vitro** che permetta di mimare i processi tossicocinetici, ma si può ricorrere ad una **batteria di test** ognuno dei quali possa fornire indicazioni utili.

Molti **metodi non-animale di tossicocinetica** sono ad un buon livello di sviluppo e sono spesso utilizzati come test complementari (come previsto anche dalla Linea Guida OCSE n°417) (**vedi Adler et al, 2011; Coecke et al, 2012**). Si considerano perciò in ‘pole position’ per entrare in fase di validazione (**Bessem et al, in preparation**)

In alcuni casi (ad esempio escrezione renale/biliare e assorbimento polmonare), lo sviluppo di metodi in vitro è molto meno avanzato. Gli esperti hanno stimato in 5-7 anni il tempo ancora necessario per lo sviluppo di metodi appropriati che poi successivamente dovranno essere validati.

Una volta che saranno disponibili metodi validi per l'identificazione dei parametri relativi ai singoli step del processo ADME, sarà necessario disporre degli algoritmi in grado di **integrare i dati in vitro-in silico**: in questo contesto sono di fondamentale importanza modelli matematici come i **PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic models*)** che permettono un'analisi quantitativa in funzione del tempo dei processi tossicocinetici e tossicodinamici di una sostanza. Si tratta di **modelli computerizzati sviluppati su algoritmi che integrano informazioni** sulla fisiologia di specie animali diverse, sulle proprietà chimico fisiche delle sostanze e sulla dose dipendenza delle reazioni biochimiche che sono alla base di metabolismo ed escrezione.

## LA MODELLISTICA IN TOSSICOCINETICA

I modelli basati su parametri fisiologici PB-PK integrano insieme ai risultati sperimentali ottenuti in studi di ADME (in vitro o in vivo) i dati corrispondenti alle caratteristiche anatomiche, fisiologiche e biochimiche della specie e i dati meccanicistici disponibili.

**Lo sviluppo di un modello PB-PK prevede che il modello venga:**

- **rappresentato (numero di compartimenti e loro caratteristiche, tipo e entità di esposizione e descrizione del metabolismo),**
- **parametrizzato (introduzione dei parametri biochimico-fisiologici)**
- **simulato (predizione attraverso il modello dei processi relativi a diversi scenari di esposizione)**
- **validato (confronto dei dati ottenuti dalla simulazione con dati sperimentali ottenuti) e migliorato.**

## LA MODELLISTICA IN TOSSICOCINETICA

Quali sono le caratteristiche anatomiche, fisiologiche e biochimiche da inserire nel modello?

Peso corporeo

output cardiaco e portata sanguigna in ogni organo rilevante

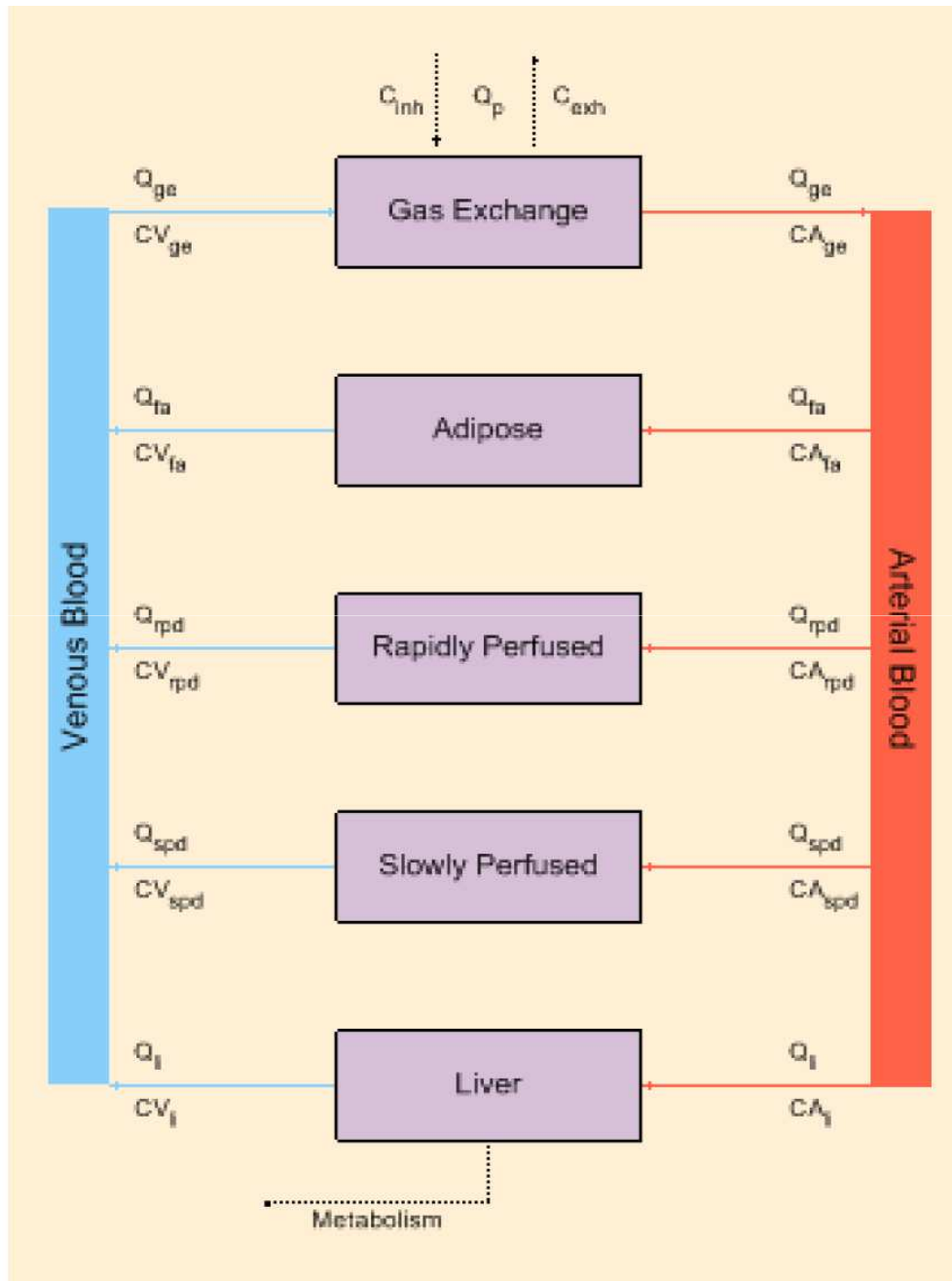
velocità di respirazione

velocità di filtrazione glomerulare

caratteristiche biochimiche degli organi (pH, conc. salina)

posizione anatomica degli organi rispetto alla via di 'entrata'.

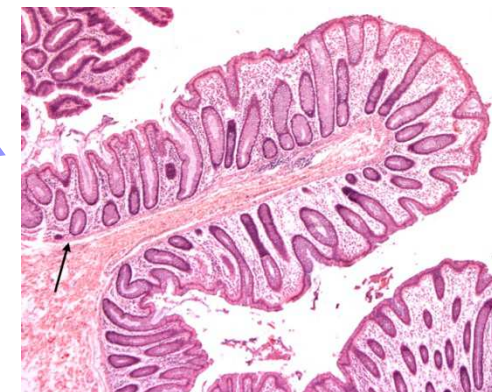
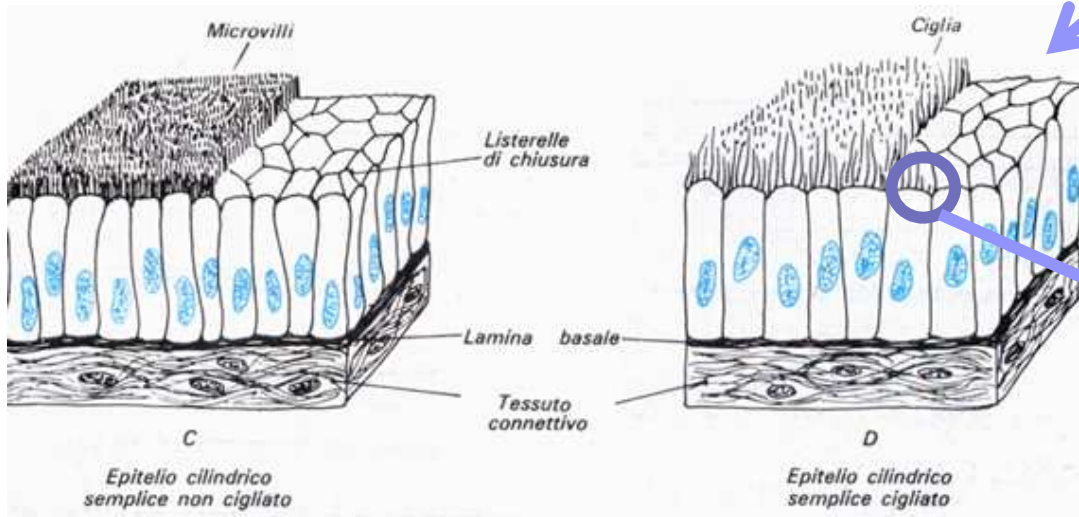
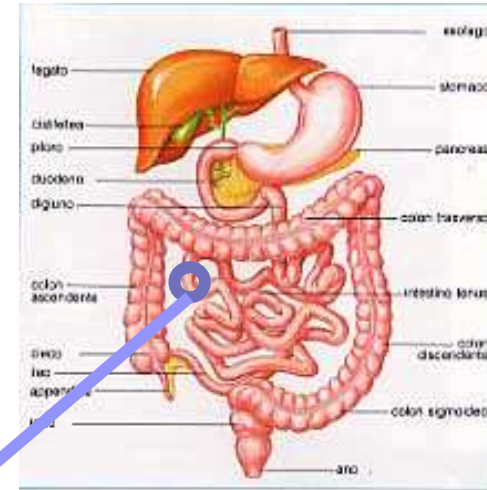
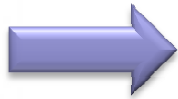
Sono anche considerate le caratteristiche chimico-fisiche dello xenobiotico.



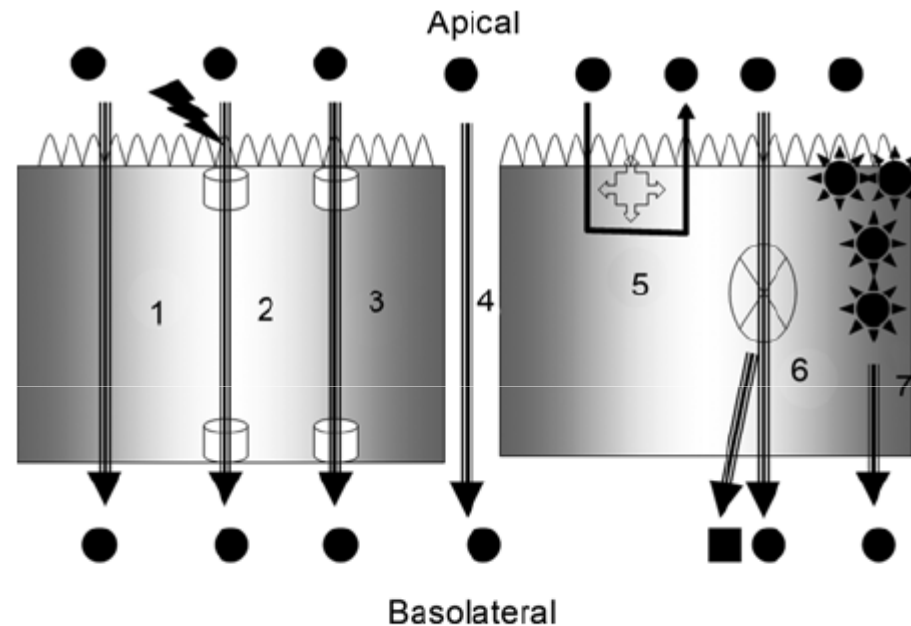
**PBPK:** Sono modelli sviluppati su algoritmi che integrano informazioni sulla fisiologia di specie animali diverse, proprietà chimico fisiche e dose-dipendenza delle reazioni biochimiche. Permettono estrapolazioni di età/ specie/ stati fisiopatologici



# Assorbimento per via orale



## Diversi meccanismi di assorbimento intestinale



(1) passive, transcellular; (2) active or secondary active; (3) facilitated diffusion; (4) passive, paracellular; (5) absorption limited by P-gp and/or other efflux transporters; (6) intestinal first-pass metabolism followed by absorption of parent and metabolite; (7) receptor-mediated transport .

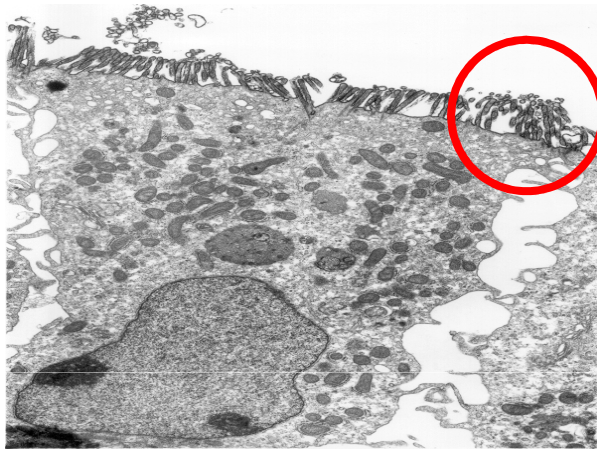
# Assorbimento orale in vitro

Il modello della **linea cellulare CaCo2** (linea di carcinoma del colon di origine umana) non è ancora accettato a livello regolatorio, ma viene utilizzato a scopo di screening specialmente dall'industria farmaceutica.

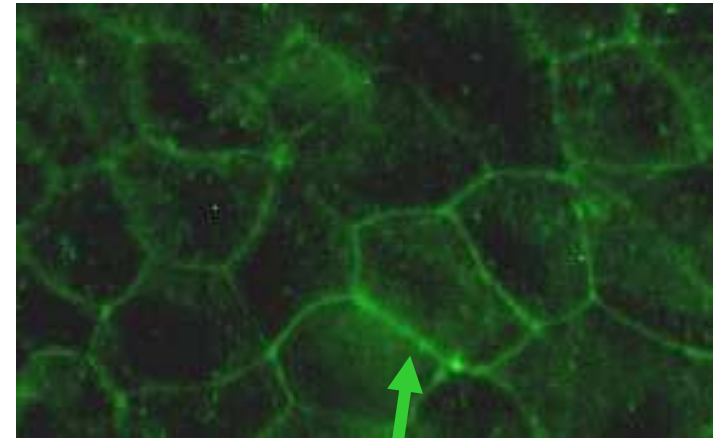
Le cellule CaCo2 hanno la **capacità di differenziare** in coltura (circa 21 giorni) disponendosi in monostrato e polarizzandosi. Un lato della membrana si specializza nell'assorbimento e sviluppa villi e orletto a spazzola; l'altro lato acquisisce le caratteristiche della membrana baso-laterale.

Particolari supporti per la coltivazione (insert) permettono di tenere separati il mezzo che mima il **contenuto del lume intestinale**, il comparto cellulare e il mezzo sottostante che mima ciò che assorbito passa in **circolo**.

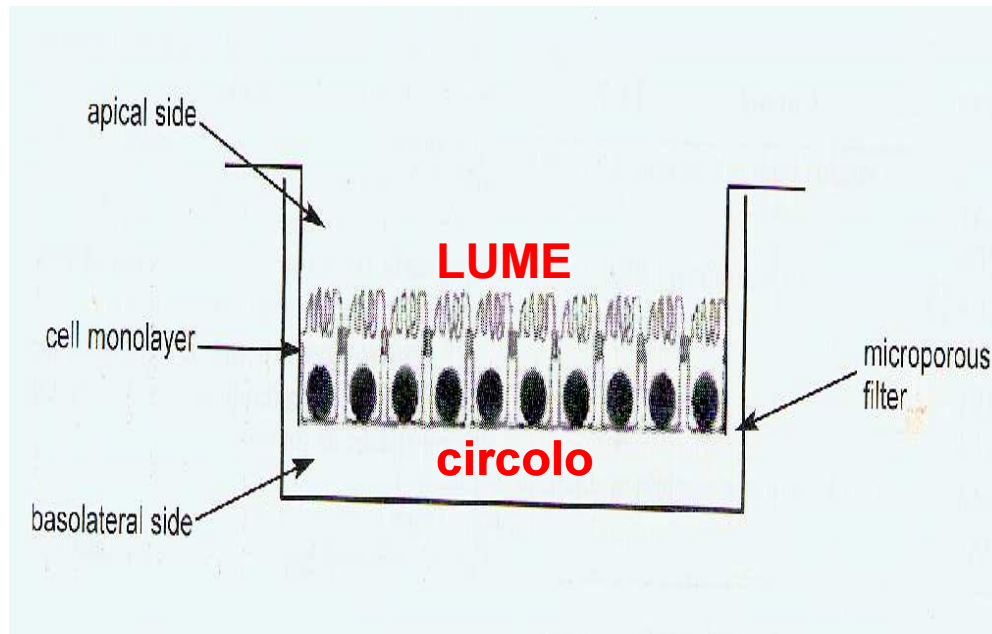
# La linea intestinale umana Caco-2: un modello in vitro di epitelio intestinale



microvilli



Giunzioni strette

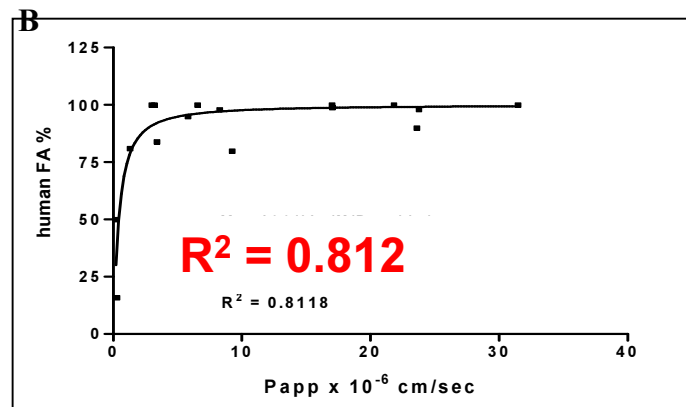
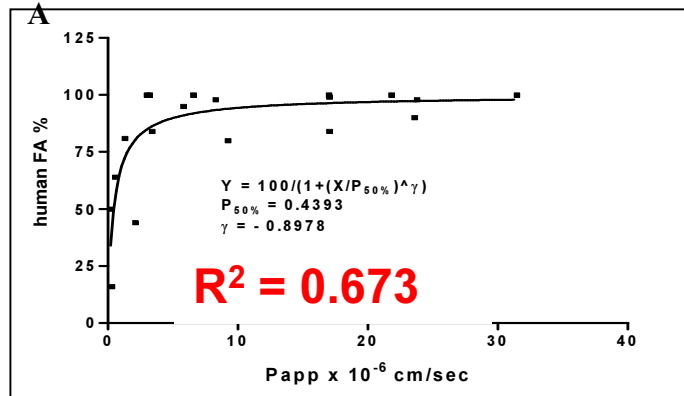


Le Caco-2 cells forniscono **buoni risultati semiquantitativi** con sostanze che vengono **ben assorbite (>30%)**, i dati su sostanze con assorbimento da limitato a basso non sono attendibili e non correlano con i dati disponibili in vivo (Matsson et al., 2005)

Il modello **non è capace di predire** quantitativamente l'assorbimento intestinale di

- 1) composti molto **lipofili**;
- 2) composti assorbiti a % **inferiori del 30-40%**;
- 3) sostanze per le quali l'assorbimento è mediato da alcune modalità di **trasporto attivo**;
- 4) sostanze per le quali il **metabolismo intestinale** (first pass pre-sistemico) è molto rilevante.

## Characterization of the Caco-2 model in terms of its prediction capacity (Turco et al, TIV 2011)

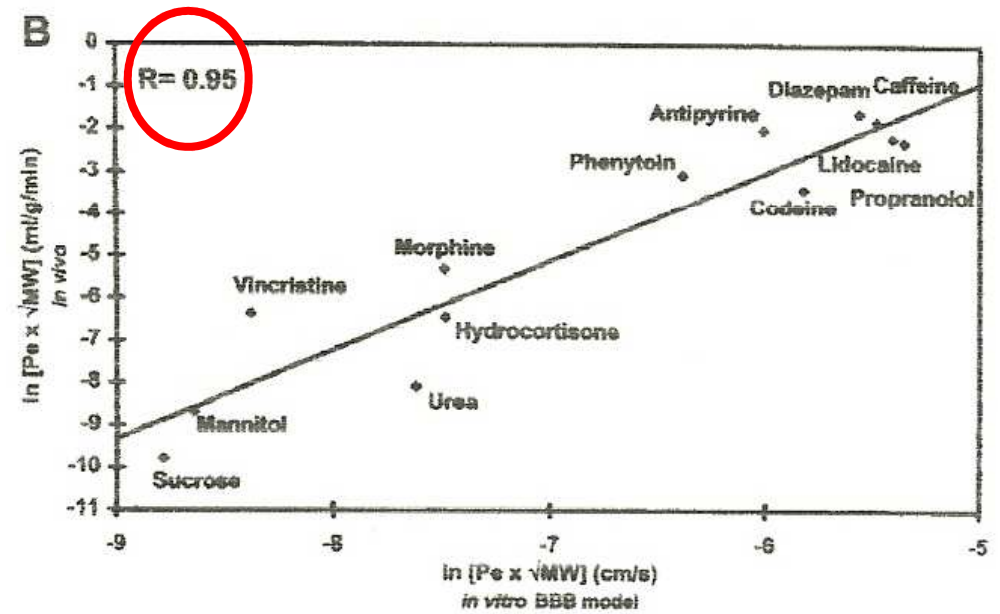
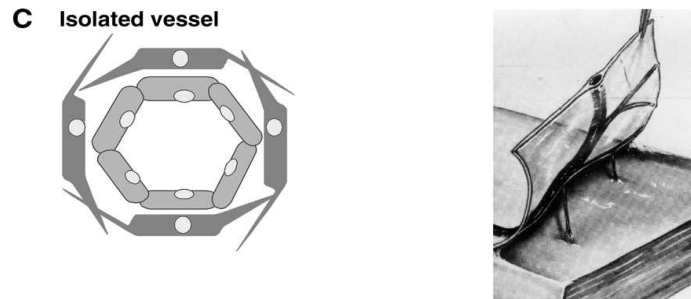
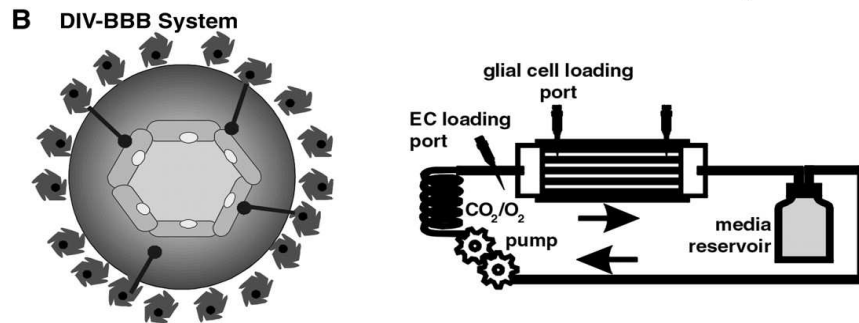
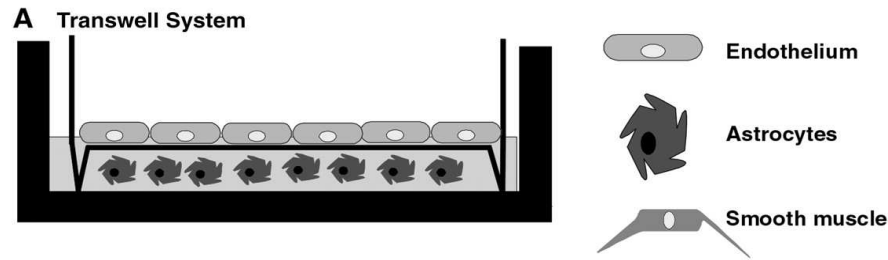


By plotting the  $P_{app}$  values vs the human FA, and using the Matsson et al. formula (2005) a non linear regression curve was obtained with  $R^2 = 0.673$ .

By excluding from the analysis all compounds one by one, the mean of the correlation coefficients was  $0.674 \pm 0.042$ .

When, based on the mode of intestinal absorption, colchicine, carbamazepine and cimetidine, **three compounds for which biokinetic parameters other than passive diffusions are relevant**, were excluded from the analysis the goodness of the correlation highly improved ( $R^2 = 0.812$ ).

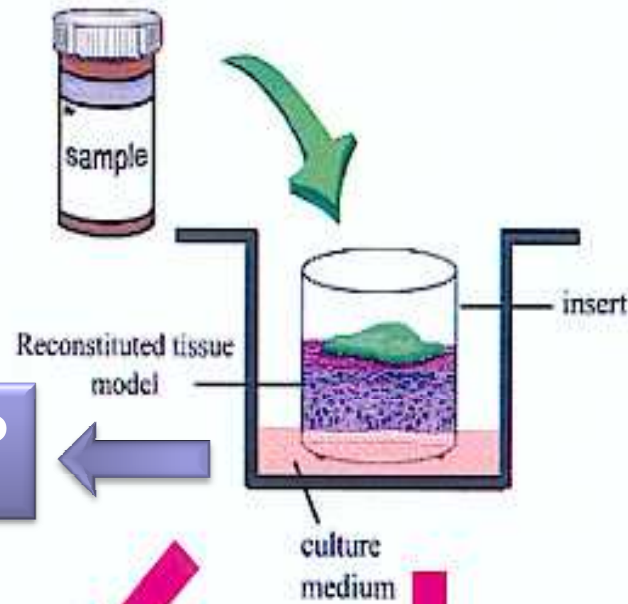
# Ricostruzione in vitro della barriera emato-encefalica



# In vitro testing approach for dermal absorption

Topical application of test product

Multiple End-point Analysis (MEA)



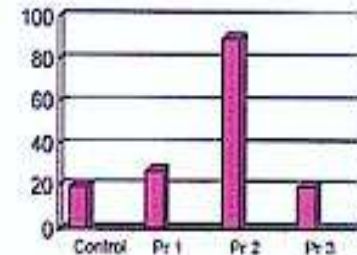
Assorbimento cutaneo



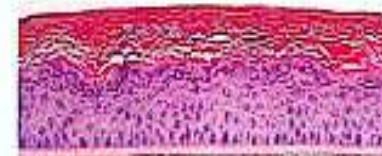
Gene Expression



Tissue viability (MTT)



Cytokine release in medium (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , ...)



Untreated

Histology



Retinoid-treated

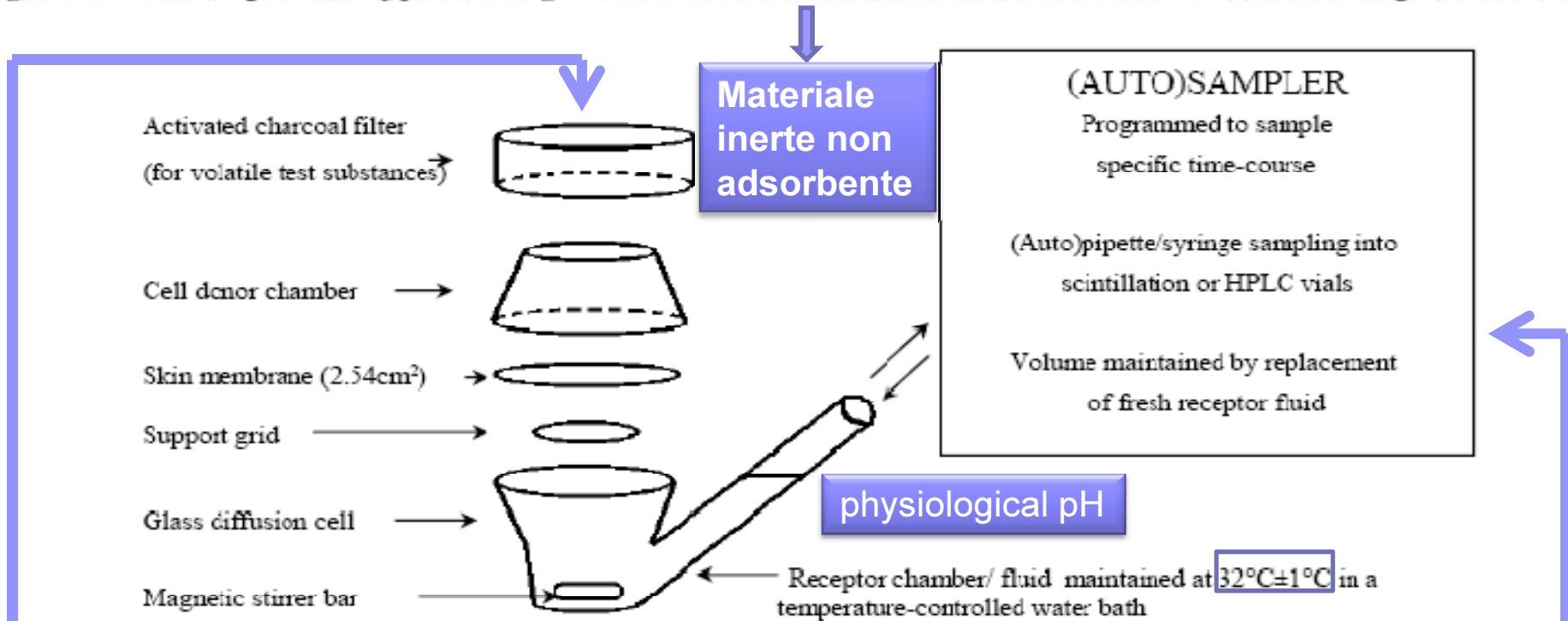
Reconstituted human epidermis



## Linea Guida OECD n 428 : Assorbimento percutaneo in vitro

- ✓ **Skin** from many mammalian species, including **humans**, can be used.
- ✓ The **permeability properties** of skin are maintained after excision from the body because the principal diffusion barrier is the non-viable **stratum corneum**.
- ✓ **Active transport** of chemicals through the skin **has not been identified**.
- ✓ The **skin** has been shown to have the capability to **metabolise** some chemicals during percutaneous absorption, but this **process is not rate limiting** in terms of actual absorbed dose, although it **may affect the nature of the material entering the bloodstream**.

Figure 1: An example of a Typical Design of a Static Diffusion Cell for *in vitro* Percutaneous Absorption Studies



- ✓ The test substance, which may be radiolabelled, is applied to the surface of a skin sample separating the two chambers of a diffusion cell.
- ✓ The chemical remains on the skin for a specified time under specified conditions, before removal by an appropriate cleansing procedure.
- ✓ The receptor fluid is sampled at time points throughout the experiment and analysed for the test chemical and/or metabolites.

## Linea Guida OECD n 428

- ✓ To demonstrate the **performance and reliability** of the test system in the performing laboratory, the results for **relevant reference chemicals** should be available and in agreement with published literature for the method used.
- ✓ This requirement could be met by testing an appropriate reference substance (preferably of a lipophilicity close to the test substance) concurrently with the test substance or by providing **adequate historical data** for a number of reference substances of different lipophilicity (e.g. caffeine, benzoic acid, and testosterone).
- ✓ It is necessary to demonstrate the **integrity of the prepared skin** (TEER= TransEpitelial Electrical Resistance o TEWL =Transepidermal Water Loss)
- ✓ When **skin metabolism** is being investigated, **freshly excised skin** should be used as soon as possible, and under conditions known to support metabolic activity (generalmente entro **24 h**, ma può dipendere dal mantenimento specifico dei sistemi enzimatici coinvolti).

## Linea Guida OECD n 428

- ✓ All components of the test system should be analysed and recovery is to be determined. This includes the donor chamber, the skin surface rinsing, the skin preparation and the receptor fluid/chamber.
- ✓ In some cases, the skin may be fractionated into the exposed area of skin and area of skin under the cell flange, and into stratum corneum, epidermis and dermis fractions, for separate analysis.
- ✓ The amount of test substance in the receptor fluid, skin preparation, skin surface washings and apparatus rinse should be analysed, using a suitable technique



**Unabsorbed dose:** represents that **washed** from the skin surface after exposure and present on the **nonocclusive cover**, including any dose shown to volatilise from the skin during exposure.

**Absorbed dose:** mass of test substance **reaching the receptor fluid** or systemic circulation within a specified period of time.

**Absorbable dose:** represents that **present on or in the skin** following washing.

Lo **strato corneo** è escluso tramite **tape stripping** (solo i primi due-tre strappi sono considerati 'vero strato corneo')

**La linea Guida n 428** si applica a tutta le sostanze chimiche ed è ampiamente utilizzata in ambito regolatorio. In alcuni casi sono stati prodotti specifici documenti per aiutare nella conduzione e nella interpretazione dei risultati:

**Pesticidi** : Linea Guida EFSA per l'assorbimento percutaneo

**Biocidi** : Note for Guidance in via di adozione (molto simile a quella dell'EFSA)

**Cosmetici** : indicazioni sono riportate in 'The SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 8<sup>th</sup> Revision SCCS/1501/12' e più nello specifico

**Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredient SCCS/1358/10**

Entrambi reperibili su :

[http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/index_en.htm)

Nel Novembre del 2012 l'SCCS ha anche tenuto un Workshop per iniziare a discutere sulla valutazione di sostanze con scarsa biodisponibilità (*Workshop on dermal safety assessment for substances with low bioavailability*)



Scientific Committee on Consumer Safety

SCCS

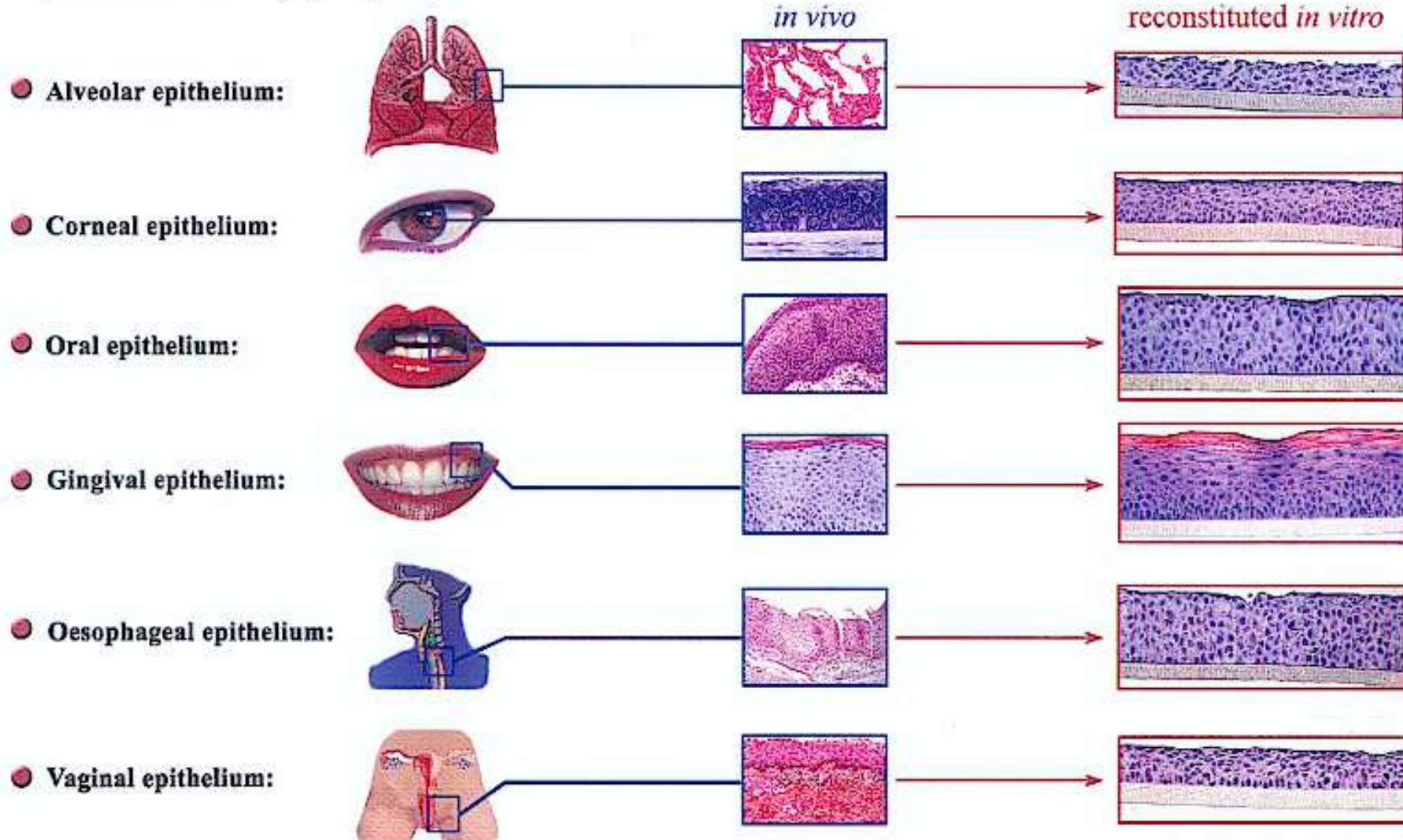
**Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients**

## Alcuni punti da sottolineare:

- ✓ La **composizione del liquido recettore** non deve limitare l'assorbimento in termini di solubilità e stabilità della sostanza da testare ( fisiologica tamponata per composti idrofili, addizionata di albumina o di altri solubilizzatori per composti lipofili), e non deve interferire con l'integrità di barriera e la metodologia analitica utilizzata.
- ✓ L'uso di **pelle umana** ricostituita è preferibile, ma in alternativa può essere usata pelle di suino che ha caratteristiche simili. La pelle del ratto è da 2 a 10 volte più permeabile di quella umana e il suo uso non è consigliato.
- ✓ Per avere una stima adeguata della **cinetica di assorbimento** dovranno essere previsti almeno **6 time-points** dopo l'applicazione (uno dei quali intorno ai 30 minuti). La scelta dei time-points dipende sia dall'uso del prodotto che dalle sue caratteristiche chimico-fisiche (es: per i prodotti da risciacquo dovrà essere mimata anche tale procedura).
- ✓ Il **recupero** della sostanza test (inclusi eventuali metaboliti dovrà essere nel range 85-115%.
- ✓ Secondo l'SCCS uno studio per essere attendibile dovrebbe essere condotto su **8 skin samples da 4 donatori**.
- ✓ La **media + 1SD** è utilizzata per calcolare il MoS. La scelta di aggiungere una SD è motivata dalla alta variabilità dei dati in vitro generalmente ottenuti .

# Human epithelial models

Using the same tissue culture techniques as for the reconstruction of human epidermis, several human mucosal tissue models are being produced, either by using immortalized cell lines (for the reconstruction of corneal, oral, oesophageal, alveolar or vaginal epithelial tissues) or primary cells (for the reconstruction of gingival epithelium).



## Perché è così importante determinare l'assorbimento cutaneo di un cosmetico?

La determinazione di assenza di assorbimento cutaneo (ma anche orale o inalatorio, se queste sono le vie di esposizione del cosmetico), limita fortemente la necessità di procedere con test di tossicità più o meno complessi. In questi casi infatti si possono utilizzare approcci come la **TTC (*Threshold of Toxicological Concern*)**, vale a dire la soglia per l'esposizione umana al di sotto della quale c'è una probabilità estremamente bassa che possa esserci un rischio per la salute. Tale approccio si può applicare a sostanze per le quali non siano disponibili dati di tossicità.



# Threshold of Toxicological Concern (TTC)

- = **soglia di allarme tossicologico**: è un sistema sviluppato per **valutare qualitativamente il rischio** relativo a sostanze presenti in piccole quantità all'interno degli alimenti. Può essere impiegato per la valutazione iniziale di una sostanza di cui non sia nota la tossicità (anche per determinare se è necessario effettuare una valutazione completa dei rischi)
- La TTC stabilisce una **soglia di esposizione umana** 'generica' per tutte le sostanze chimiche al di sotto della quale non si aspettano rischi apprezzabili per la salute.
- I valori di TTC sono stati determinati per sostanze aventi una struttura chimica e caratteristiche tossicologiche simili, **analizzando statisticamente** cospicui data-base tossicologici e altri dati disponibili sulla tossicità (NOEL, LOAEL, etc).

# Threshold of Toxicological Concern (TTC)

- Le strutture delle sostanze chimiche sono state raggruppate in tre vaste categorie (Cramer Classes) di **tossicità bassa, media o elevata (senza allerta di genotossicità)**, per ognuna delle quali è stato derivato un valore di TTC. La classe intermedia tende ad essere inglobata nella categoria con maggior tossicità

**tossicità bassa:**  $1800 \mu\text{g /person/d} \Rightarrow 30 \mu\text{g /kg bw/d}$

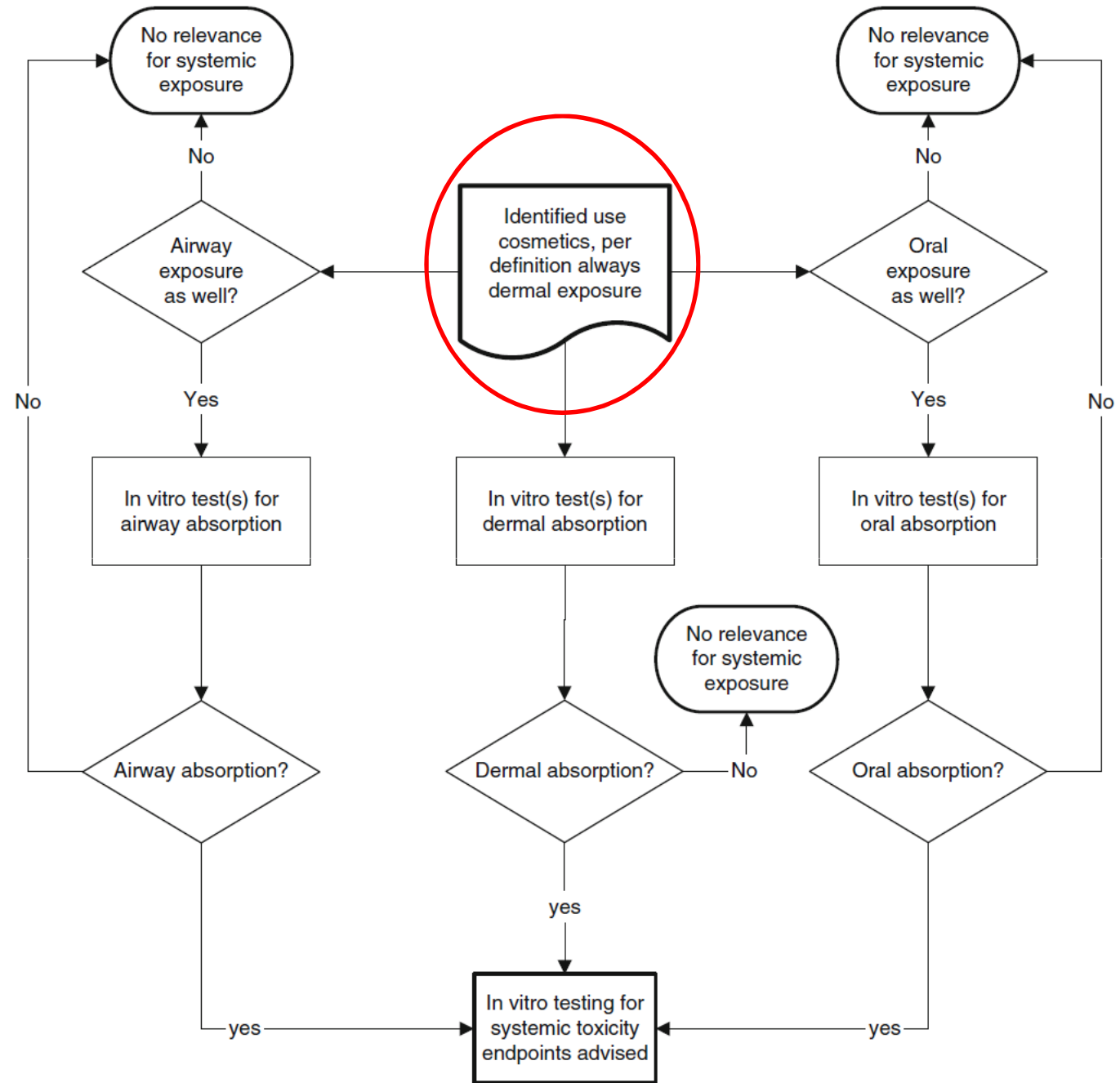
**tossicità elevata:**  $90 \mu\text{g/person/d} \Rightarrow 1.5 \mu\text{g/kg bw/d}$

- Per la valutazione è necessario disporre di dati di esposizione attendibili: se l'esposizione dell'uomo a una sostanza è inferiore al valore di TTC, si considera che la probabilità della comparsa di effetti avversi sia molto bassa.
- Esistono alcune limitazioni nella applicazione della TTC (es: Aflatoxin-like, azoxy-, N-nitroso-compounds, benzidine e idrazine escluse a causa dell'elevata potenza cancerogena, metalli, PCB e diossine e composti fortemente bioaccumulabili, steroidi, proteine...)



# Decision tree for absorption-based testing

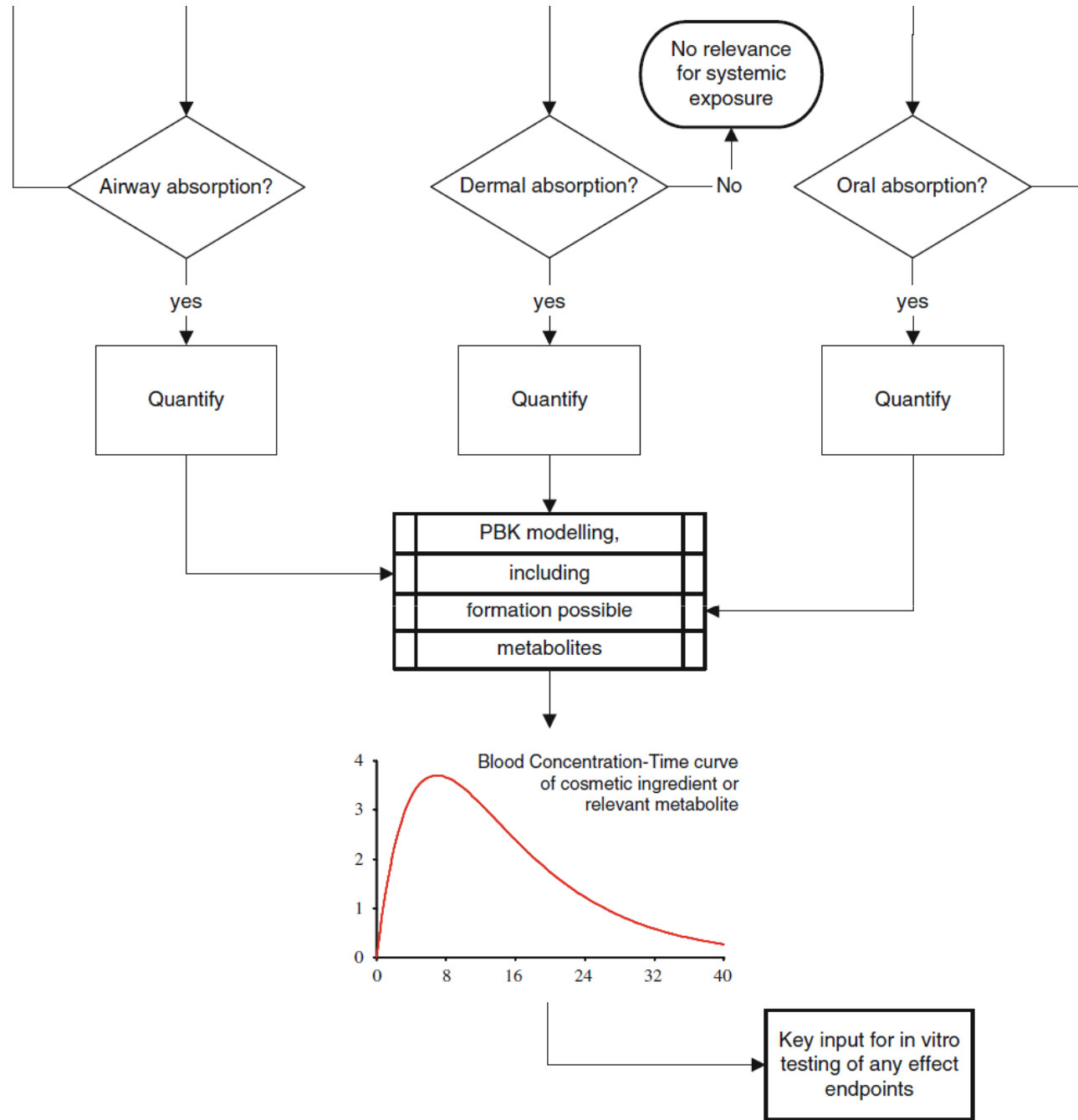
Da Adler et al, 2011





# Decision tree for (internal) exposure-based Testing

Da Adler et al, 2011



**GRAZIE!**