

La valutazione dell'assorbimento intestinale *in vitro*

Laura Ceriotti e Marisa Meloni
VitroScreen, Milano - infos@vitroscreen.com

Perché lo studio del passaggio intestinale è utile nello sviluppo dei dispositivi medici?

Sicurezza ed efficacia dei dispositivi medici devono essere dimostrate dal fabbricante affinché i dispositivi possano ricevere un certificato di conformità ed essere immessi sul mercato comunitario. Recentemente, stanno emergendo nuovi approcci sperimentali *in vitro* per la valutazione:

- i) della sicurezza degli ingredienti usati nel prodotto finito facendo ricorso a metodi alternativi di sostituzione convalidati e accettati dalle autorità regolatorie internazionali, o metodi non convalidati formalmente ma la cui validità e affidabilità scientifica è supportata da numerosi dati sperimentali;
- ii) della sicurezza dei prodotti finiti con protocolli sperimentali che considerano 'caso per caso' le peculiarità di ciascun prodotto;
- iii) della natura del meccanismo d'azione dei dispositivi medici a supporto dei dati clinici pre e post-marketing sui quali si fonda l'efficacia terapeutica di questi prodotti e della classificazione.

Sempre più spesso vengono adottati nuovi approcci sperimentali alla valutazione di sicurezza ed efficacia che rispecchiano il progresso tecnologico e la disponibilità di modelli biologici rilevanti, predittivi ed affidabili, in grado di dare una risposta etica alle richieste di sicurezza e protezione della salute degli utilizzatori.

Il saggio di assorbimento intestinale *in*

vitro rappresenta sicuramente una delle valutazioni fondamentali per gli ingredienti contenuti in dispositivi medici ad uso orale e sembra destinato a trovare in questo ambito un impiego confrontabile, se non maggiore, rispetto a quello che già da tempo gli viene riconosciuto in ambito farmaceutico.

L'assorbimento nello studio della tossicocinetica

La tossicocinetica, che descrive i processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME) di una sostanza chimica, fornisce informazioni sulle concentrazioni della sostanza nel sangue o nei tessuti in funzione del tempo, indicandone il possibile accumulo e la biotrasformazione (es. metabolismo). L'assorbimento di una sostanza è da considerarsi come fattore limitante alla biocinetica della molecola e la sua valutazione è quindi fondamentale per definire i successivi studi tossicologici. Il contesto legislativo attuale, a partire dalla direttiva trasversale 2010/63 sull'impiego degli animali usati a fini sperimentali, dal Regolamento 1223/2009 sui prodotti cosmetici e dal Regolamento REACH sulle sostanze chimiche, spinge allo sviluppo, alla convalida e all'impiego di metodi alternativi all'uso degli animali anche per questo complesso *endpoint*. All'inizio degli anni 2000, ECVAM ha descritto limiti e punti di forza dei modelli *in vivo*, *in situ* e *in vitro* allora disponibili per la valutazione dell'assorbimento gastrointestinale (1). Nel 2008 è stato finalizzato lo studio di preconvalida di due modelli *in vitro* basati su cellule Caco-2 con buoni risultati di riproducibilità e predittività anche se non soddisfacenti per l'identificazione di composti poco o moderatamente assorbiti (2). Più recentemente, sono stati eseguiti studi per migliorare e standardizzare i metodi di coltura delle cellule Caco-2 superando i problemi di variabilità ed eterogeneità del sistema (3-4). Il modello intestinale con le Caco-2 è l'oggetto di un elevato numero di pubblicazioni in ambito farmaceutico che ad oggi ne giustifica la validità scientifica e lo promuove come modello biologico di riferimento per lo studio dell'assorbimento intestinale *in vitro*.

L'assorbimento intestinale su cellule Caco-2

Il modello di assorbimento intestinale basato sulle cellule Caco-2, isolate da un adenocarcinoma colonrettale umano, è

un sistema *in vitro* ben caratterizzato che rende possibile studiare la tossicità orale di tutte quelle sostanze che vengono ingerite intenzionalmente o accidentalmente, definire il loro meccanismo di trasporto attraverso la barriera intestinale, e quindi determinare la biodisponibilità delle stesse nel sangue e nei tessuti. Una lista delle caratteristiche rilevanti delle cellule Caco-2 è riportata nella *Tabella 1*.

Le cellule, che vengono fatte crescere su specifici supporti porosi per 21 giorni, si polarizzano e differenziano formando un epitelio continuo (monostrato) con giunzioni strette funzionali (**Fig 1a**) e microvilli a livello apicale (orletto a spazzola). Il monostrato cellulare fornisce una barriera fisica e biochimica al passaggio di ioni e piccole moleco-

le. Come mostrato nello schema di *Figura 1b*, il monostrato separa il modello in due comparti ben distinti: uno apicale, corrispondente al lume intestinale *in vivo* e uno basolaterale che corrisponde al comparto della circolazione sanguigna e linfatica dell'organismo. Inoltre, le cellule esprimono alcuni recettori ed enzimi metabolici (sucrasi-isomaltasi, fosfatasi alcalina, lattasi e aminopeptidasi) che sono normalmente associati all'orletto a spazzola degli enterociti così come trasportatori e proteine per l'efflusso. Per questo motivo il modello di assorbimento con le Caco-2 può fornire informazioni circa le 2 maggiori vie dell'assorbimento intestinale *in vivo* delle sostanze somministrate oralmente: la diffusione passiva, attraverso la via paracellulare/transcellulare, ed il trasporto attivo mediato da trasportatori (**Fig 1c**).

Con il monostrato di Caco-2 si sono trovati valori di permeabilità che correlano bene con dati umani di assorbimento *in vivo* per parecchi farmaci e sostanze chimiche. Di conseguenza, l'impiego del modello delle Caco-2 per predire l'assorbimento orale umano di sostanze ed ingredienti è cresciuto, così come la sua importanza come strumento di *screening* qualitativo di assorbimento intestinale, soprattutto nella ricerca farmacologica.

Tabella 1 Caratteristiche del monostrato di cellule intestinali Caco-2. Dopo il differenziamento su inserti permeabili si ottiene un sistema *in vitro* che, come mostrato nella foto al microscopio elettronico a trasmissione (5), mima per morfologia e funzionalità l'epitelio intestinale *in vivo*

Caratteristiche del monostrato di cellule intestinali Caco-2	
Origine	Adenocarcinoma colonrettale umano
Crescita	Cellule epiteliali in monostrato
Differenziamento	21 giorni dopo la confluenza su inserto poroso - strutturale: epitelio continuo con giunzioni strette funzionali e microvilli - funzionale: azione enzimatica a livello dell'orletto a spazzola - funzionale: trasporto attivo verso il lume intestinale mediato da trasportatori non ionici di membrana
Morfologia	Cellule polarizzate, con giunzioni serrate e orletto a spazzola apicale
Parametri elettrici	Resistenza elettrica elevata > 400Ω cm ²
Enzimi digestivi e associati a microvilli	Peptidasi e disaccaridasi specifiche dell'intestino tenue: sucrasi-isomaltasi, lattasi, aminopeptidasi-N, fosfatasi alcalina
Trasporto attivo	Aminoacidi, zuccheri, vitamine, ormoni...
Trasporto ionico di membrana	Na ⁺ , K ⁺ ATPasi, scambiatore Na ⁺ , H ⁺ , cotrasportatore Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , canali apicali per Cl ⁻
Trasportatori non ionici di membrana	P-glicoproteina (P-gp), MRPs, LRP
Recettori	Vitamina B12, vitamina D3, EGF, trasportatori per il glucosio (GLUT1,3,5 e SGLT1)

Trasporto passivo ed attivo

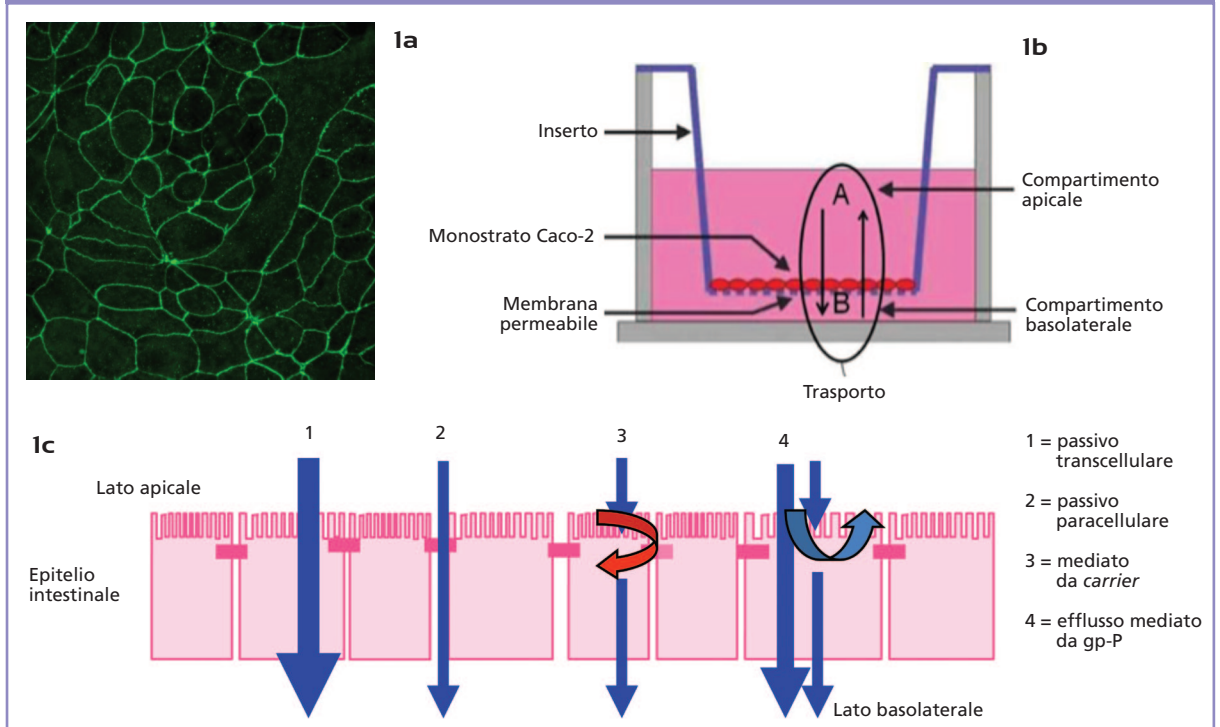
Gli studi di assorbimento intestinale *in vitro* sono effettuati nelle due direzioni rispetto al monostrato cellulare applicando la sostanza nel compartimento donatore (**Fig 1b**).

Il passaggio attraverso il monostrato è espresso come coefficiente di permeabilità apparente (Papp). Quando si hanno a disposizione le permeabilità nelle due direzioni si possono ipotizzare i meccanismi di trasporto coinvolti. Le sostanze con trasporto passivo hanno generalmente la stessa permeabilità nelle due direzioni. Quando il rapporto di efflusso (ER) tra le due permeabilità (Papp BA/Papp AB) è >2 è probabile che sia coinvolto un meccanismo attivo di trasporto direzionale.

Il trasporto attivo viene conformato facendo esperimenti di assorbimento in presenza di inibitori del metabolismo energetico o di specifici trasportatori, e/o in presenza di più concentrazioni della sostanza chimica per evidenziare una cinetica a saturazione.

L'assorbimento e i meccanismi di trasporto di diversi alcaloidi vegetali, quali

Figura 1 a) Immagine di immunofluorescenza dell'occludina, proteina che compone le giunzioni strette, sul monostrato di Caco-2 differenziato a formare un epitelio continuo su membrana permeabile. **b)** Rappresentazione schematica del sistema *in vitro* utilizzato per il saggio di assorbimento intestinale. Il monostrato di Caco-2 separa il pozzetto in due compartimenti ben distinti: quello apicale (A) e quello basolaterale (B). La misura del trasporto passivo (A-B) e del trasporto attivo (B-A) attraverso il monostrato permette di predire la permeabilità a livello intestinale di una sostanza somministrata per via orale *in vivo*. **c)** Schema dei meccanismi di trasporto passivi ed attivi coinvolti nel processo di assorbimento intestinale



berberina, palmitina e coptisina, sono stati studiati sul modello di Caco-2 rilevando valori di ER>2. L'aggiunta di un inibitore della P-glicoproteina (P-gp), quale la ciclosporina, ha determinato una diminuzione della Papp b-a dei composti aumentando l'assorbimento e dimostrando il coinvolgimento di questo trasportatore (6). Essendo la P-gp coinvolta anche nell'assorbimento di diversi medicinali, è possibile che si verifichino interazioni tra farmaci e composti vegetali, con la conseguente modifica delle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche delle molecole.

Ruolo chiave dell'assorbimento intestinale nella valutazione della sicurezza di additivi alimentari e materiali nano-ingegnerizzati

La valutazione dell'assorbimento intestinale di una sostanza è necessaria

per chiedere l'autorizzazione ad utilizzare nuovi additivi nel settore alimentare. Nell'opinione scientifica di EFSA del 2012 (7), è descritto un approccio seriale per la valutazione della tossicità degli additivi alimentari che adotta una strategia in linea con i principi delle 3R (ridurre l'impiego degli animali, migliorarne le condizioni e sostituirli).

La tossicocinetica è parte delle *core areas* per tutte e tre le serie di test tossicologici previsti. In particolare, nella prima serie di test, gli studi di tossicocinetica hanno lo scopo di stabilire se un composto, o un suo prodotto di degradazione, o metabolico, è assorbito a livello intestinale. Se si dimostra che l'assorbimento è trascurabile attraverso studi sperimentali o con considerazioni teoriche basate su dati di letteratura non si intraprendono altri studi. In caso contrario si procede con studi di ADME *in vivo* (OECD TG 417). Per i nanomateriali ingegnerizzati (ENM) che entrano nel settore alimentare, ad esempio come *novel food*, materiali a contatto con gli alimenti, additivi alimentari o pesticidi, sono richiesti studi di genotossicità *in vitro*, di ADME e di tossicità orale *in vivo*. Tuttavia, se si dimostra che gli ENM non sono assorbiti a livello gastrointestinale, si riduce il numero degli studi da effettuare (8). Sebbene le specifiche caratteristiche degli ENM (es. solubilità, bioaccumulo, aggregazione, etc.) rendano difficile

la loro valutazione tossicologica, il modello con cellule Caco-2 può essere utilizzato come primo approccio per identificare la pericolosità dei nanomateriali. È stato dimostrato di recente, ad esempio, che la co-cultura di cellule Caco-2 con cellule mucipare rende il modello intestinale più realistico e più predittivo dell'assorbimento intestinale delle nanoparticelle di TiO₂ *in vivo* (9).

Interesse dell'epitelio intestinale oltre la valutazione dell'assorbimento

Accanto agli studi di assorbimento intestinale, biodisponibilità e trasporto, il monostrato di Caco-2 rappresenta un ottimo modello biologico per valutare le azioni di tipo meccanico esercitate da dispositivi medici e/o integratori sulla barriera intestinale. Questi prodotti possono modificare

- i) la funzionalità e l'integrità della barriera,
- ii) la sua permeabilità con l'attivazione dei canali legati al flusso di acqua e di ioni,
- iii) la distribuzione e quantità delle proteine, quali occludina e zonula occludens-1 che compongono le giunzioni strette.

Utilizzando la misura della resistenza elettrica transepiteliale (*Trans Epithelial Electrical Resistance*, TEER), il passaggio paracellulare di marcatori comuni come il *Lucifer Yellow* (LY), e visualizzando la localizzazione delle proteine delle giunzioni strette mediante immunofluorescenza, si possono valutare e quantificare le proprietà filmogene dei dispositivi medici su Caco-2 e predire l'efficacia dei dispositivi nel proteggere la mucosa e/o ripristinare la normale omeostasi del tessuto intestinale formando un film protettivo. Un'ulteriore applicazione nella valutazione dell'efficacia applicata ai dispositivi medici è stata pubblicata di recente (10). In questo caso, è stato ottenuto un modello di 'intestino immunocompetente' grazie alla co-cultura di cellule Caco-2 con macrofagi. In questo modello la risposta delle cellule immunocompetenti è stata attivata in maniera indiretta da mediatori con azione anti-infiammatoria (IL10) e chemioattrattiva (IL8), rilasciati dalle cellule intestinali direttamente stimulate da un derivato preparato da *Malus domestica* Borkh. I risultati confermano l'interazione tra i due tipi cellulari e la possibilità di utilizzare il modello come strumento per lo studio degli effetti pro-infiammatori esercitati da pre e probiotici e nello screening di composti anti-infiammatori. La possibilità di coltivare le cellule Caco-2 con altri tipi cellulari (es. cellule del sistema immunitario, cellule goblet, etc.), oppure in condizioni sperimentali che ne alterano la permeabilità e la funzionalità inducendo un modello di stress (es. in presenza di acidi grassi, lipopolisaccaridi o citochine pro-infiammatorie) rende il modello adatto a mimare *in vitro* situazioni di perdita di omeostasi della barriera intestinale e predittivo dell'azione di potenziali agenti anti-infiammatori, bioadesivi e mucoprotettivi (11).

Bibliografia

- 1 E. Le Ferrec *et al* (2001) *In vitro* models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM workshop 46. European centre for the validation of alternative methods *Altern Lab Anim* 29 649-668
- 2 P. Prieto *et al* (2010) An Exploratory Study of Two Caco-2 Cell Models for Oral Absorption: A Report on Their Within-laboratory and Between-laboratory Variability, and Their Predictive Capacity *ATLA* 38 367-386
- 3 M. Natoli *et al* (2012) Good Caco-2 cell culture practices *Toxicology in Vitro* 26(8) 1243-1246
- 4 S. Ferruzza *et al* (2012) A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium *Toxicology in Vitro* 26(8) 1252-1255
- 5 K. Ravinder, R.K. Gill *et al* (2008) Serotonin modifies cytoskeleton and brush-border membrane architecture in human intestinal epithelial cells *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295 G700-G708
- 6 X. Zhang *et al* (2011) Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: involvement of P-glycoprotein *Xenobiotica* 41(4) 290-296
- 7 EFSA Scientific Opinion (2012) Guidance for submission for food additive evaluations *EFSA Journal* 10(7) 2760
- 8 EFSA Journal (2011) Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain 9(5) 2140
- 9 G. Janer *et al* (2014) Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles *Toxicology Letters* 228 103-110
- 10 B. De Servi, M. Meloni (2013) Poster: Anti-inflammatory effect of probiotics on co-culture models of macrophage-like and Caco-2 cells, Vitafoods, http://www.vitroscreen.com/pdf/2013%20POSTER%20PROBIOTICS_VITAFOD.pdf
- 11 L. Rizza *et al* (2012) Caco-2 cell line as a model to evaluate mucoprotective properties *International Journal of Pharmaceutics* 422 318-322