

LA VARIABILITÀ UMANA NELLA RISPOSTA AGLI AGENTI TOSSICI NELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO: COME PREDIRLA ATTRAVERSO METODOLOGIE *IN VITRO* E MODELLI *IN SILICO* NEI RISULTATI DI UN PROGETTO EFSA



Nicoletta Santori, Franca M. Buratti, Emma Di Consiglio, Emanuela Testai, Laura Turco e Susanna Vichi
Dipartimento di Ambiente e Salute, ISS

RIASSUNTO - La popolazione umana mostra un elevato grado di variabilità tra gli individui nella risposta a sostanze estranee all'organismo, siano esse farmaci o sostanze tossiche, dovuta a fattori diversi, sia legati al destino della sostanza nell'organismo (cinetica), che alle interazioni con i possibili bersagli (dinamica). L'European Food Safety Authority (EFSA) ha finanziato un Progetto coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità con l'obiettivo di sviluppare metodologie, strategie sperimentali e modelli che integrassero i dati di cinetica e dinamica per predire la variabilità umana. Il Progetto, della durata di quattro anni, ha raccolto informazioni su enzimi del metabolismo e trasportatori, su diversi meccanismi di azione, creato diversi data-base, prodotto dati sperimentali utilizzando metodologie indicate come New Approach methodologies (NAMs) su diverse sostanze tra cui pesticidi, tossine naturali, additivi alimentari, polifenoli e farmaci e sviluppato modelli fisiologici in cui sono stati integrati i dati di cinetica e dinamica (PBK-(D)). I risultati ottenuti rappresentano un ulteriore passo nelle strategie EFSA per migliorare la valutazione del rischio, diminuendo l'incertezza e aumentando la trasparenza.
Parole chiave: valutazione del rischio; fattori di incertezza; tossicocinetica; variabilità umana; modelli fisiologici cinetici (PBK)

SUMMARY (Results of an EFSA Project on how to make predictions about human variability in the risk assessment of toxic substances by involving *in vitro* methods and *in silico* models) - The human population is characterized by a high degree of variability between individuals in response to xenobiotics (drugs or toxic substances), due to different factors, related to both the destination of the substance in the organism (kinetics), and the interactions with possible targets (dynamics). EFSA funded a project coordinated by the Italian National Institute of Health with the aim to develop methodologies, experimental strategies and models that integrate kinetics and dynamics data to predict human variability. The 4 years project collected information on transporters and metabolic enzymes, and on different mechanisms of action; furthermore, the project created databases, produced experimental data using NAMs (New Approach Methodologies) on pesticides, natural toxins, food additives, polyphenols, pharmaceuticals; moreover, it developed physiological models in which the data of kinetics and dynamics (PBK- (D)) were integrated. The obtained results represent a further step in EFSA's strategies to improve risk assessment, decreasing uncertainty and increasing transparency.

Key words: risk assessment; uncertainty factors; toxicokinetics; human variability; physiologically-based kinetic model (PBK)

nicoletta.santori@iss.it

Nel processo di valutazione dei rischi per la salute associati all'esposizione a contaminanti ambientali e presenti nella dieta, si sta sempre più affermando l'importanza di considerare dati meccanicistici (vale a dire i meccanismi precoci che portano a un effetto) e tossicocinetici. La tossicocinetica è essenzialmente l'insieme di processi normalmente denominati ADME (assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione), attraverso i quali una sostanza

entra nell'organismo mediante processi di trasporto passivo o attivo (cioè mediato da trasportatori), si distribuisce attraverso il circolo sanguigno e, raggiunti gli organi deputati, viene trasformata da enzimi del metabolismo per facilitarne l'eliminazione, evitando il suo accumulo. La sostanza viene quindi escreta (ad esempio, attraverso urine, feci, sudore) come tale o come prodotti della sua trasformazione. Durante la sua permanenza nell'organismo la sostanza o i suoi ►

metaboliti possono interagire con recettori specifici o macromolecole cellulari o geni, inducendo un effetto: l'insieme di questi fenomeni viene denominato tossicodinamica (Figura 1).

Nel processo di valutazione del rischio ai valori di riferimento ottenuti attraverso la caratterizzazione della curva dose-risposta (No Observed Adverse Effect Level - NOAEL la dose più alta a cui non si osservano effetti; Low Observed Adverse Effect Level - LOAEL cioè il livello più basso a cui si osservano effetti o la Benchmark Dose, estrapolazione matematica dei dati sperimentali o meglio il limite inferiore del suo intervallo di confidenza - BMDL) si applicano Fattori d'Incertezza (Uncertainty factor, UF), spesso indicati anche come SF (Safety Factor) o AF (Assessment Factor). Tali fattori, oltre alla variabilità tra le specie (quando i dati siano ottenuti da modelli animali) e alla qualità dei dati disponibili, tiene conto anche della variabilità interindividuale. Infatti, la popolazione umana mostra un elevato grado di variabilità tra gli individui, dovuta a fattori fisiologici (genere, età, gravidanza), alla presenza di patologie (disfunzioni epatiche o renali che influenzano l'eliminazione), a fattori genetici (polimorfismi enzimatici o dei trasportatori) o acquisiti (variazioni nell'espressione genica per induzione dovuta a esposizione ad altre sostanze).

La conoscenza dell'andamento di tale variabilità, che è fortemente influenzato dalla cinetica di una sostanza, è fondamentale perché permette di identificare i gruppi di soggetti a rischio maggiore e di mettere in atto le misure di mitigazione dei rischi per proteggere proprio i gruppi più suscettibili.

Grazie al progresso scientifico e tecnologico è oggi possibile ottenere queste informazioni attraverso metodologie *in vitro* e *in silico*, indicate anche come New Approach Methodologies (NAM) di cui fanno parte anche i modelli fisiologici cinetici (PBK models) attraverso i quali è possibile stimare, mediante previsioni matematiche, le concentrazioni circolanti di una sostanza per valutarne l'esposizione interna.

Il Progetto EFSA

I metodi *in vitro* e i modelli PBK integrati con i dati di dinamica sono stati identificati come priorità da EFSA per progredire, nell'area della sicurezza alimentare, verso la riduzione del numero di animali utilizzati nei test tossicologici e una comprensione degli effetti basata sul meccanismo di azione.

In questo contesto l'EFSA ha lanciato una call per un Progetto (art. 36) su questi argomenti, il cui obiettivo principale era lo sviluppo di metodologie, strategie sperimentali e modelli che integrassero i dati di

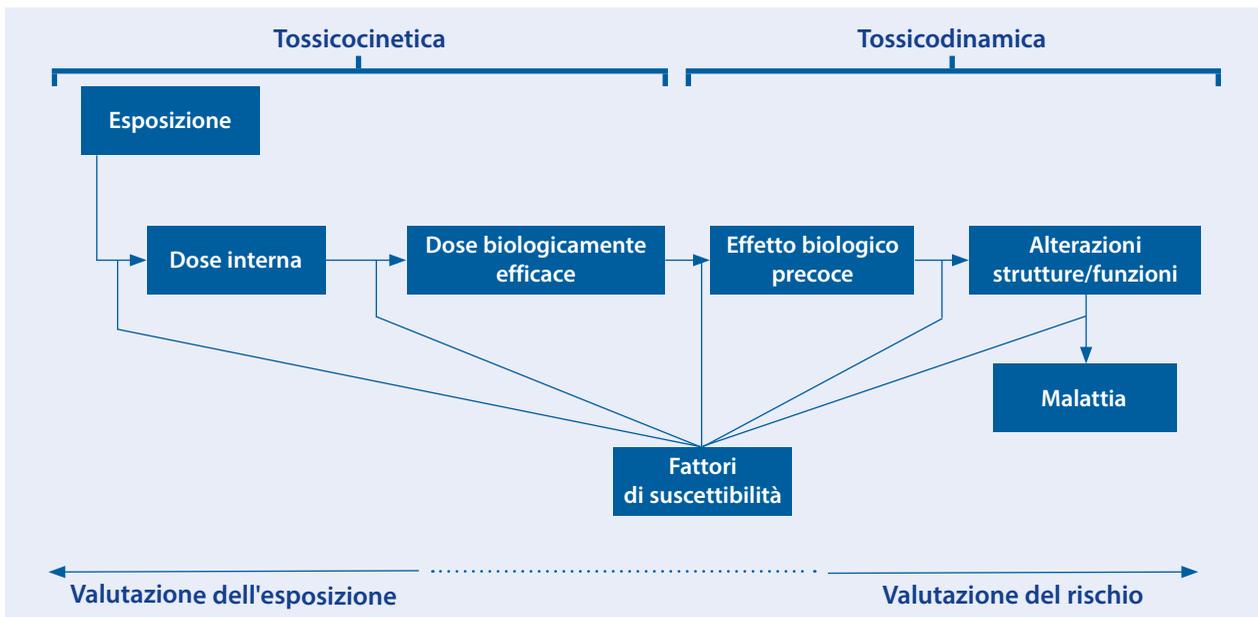


Figura 1 - I processi cinetici e dinamici nella valutazione del rischio

cinetica e dinamica per predire la variabilità umana, da utilizzare nella valutazione della sicurezza alimentare. Lo scopo era fondamentalmente quello di aumentare la robustezza e la trasparenza delle attività condotte da EFSA, diminuendo le incertezze associate alla valutazione dei rischi dovute alla variabilità interindividuale.

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS), in particolare il Gruppo di ricerca nel reparto Meccanismi, Biomarcatori e Modelli (Dipartimento di Ambiente e Salute), ha risposto alla call in qualità di coordinatore e responsabile scientifico del Progetto che è stato selezionato e finanziato. Al Progetto dal titolo: "Modelling human variability in toxicokinetic and toxicodynamic processes using Bayesian meta-analysis, physiologically-based (PB) modelling and *in vitro* systems", hanno partecipato come partners la French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) e le Università di Utrecht, Brest e Salonicco. Il Progetto partito alla fine del 2016, inizialmente della durata di 42 mesi, ha usufruito di una proroga per poter mitigare gli effetti relativi alla pandemia da COVID-19 e si è concluso a novembre 2020. Oltre ai numerosi articoli scientifici pubblicati nel corso del Progetto, la descrizione completa delle metodologie utilizzate, dei risultati ottenuti e delle prospettive future sono state descritte nel Report finale approvato e pubblicato da EFSA (1).

Il Progetto ha raggiunto lo scopo principale dividendo le attività in 4 obiettivi specifici:

- 1) quantificare la variabilità umana nei processi tossicocinetici mediante ricerche bibliografiche, creazione di data-base e meta-analisi riguardanti gli enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici (principali isoforme del citocromo P450-CYP, paraoxonasi, carbossilesterasi, UDP-glucuroniltransferasi, glutatione-S-trasferasi, sulfotransferasi) e trasportatori (Glicoproteina P-PgP, Trasportatori cationi organici -OCT, Trasportatori anioni organici-OAT, Trasportatori polipeptidi anioni organici-OATP);
- 2) quantificare la variabilità umana nei processi tossicodinamici mediante ricerche bibliografiche, creazione di data-base e meta-analisi per alcuni specifici meccanismi di azione tra cui stress ossidativo, steatosi, inibizione dell'acetilcolinesterasi;
- 3) produrre dati sperimentali per colmare i gap dei dati di letteratura impiegando NAMs sul metabolismo isoforma-specifico e migliorare le informa-

zioni dinamiche per substrati specifici degli enzimi studiati al punto 1) e caratterizzati dai meccanismi studiati al punto 2), come input specifici per il modello PBK (Figura 2). I dati sono stati prodotti su una serie di sostanze rilevanti dal punto di vista di sicurezza alimentare (pesticidi, contaminanti, additivi, tra cui chlorpyrifos, phosmet, triflumuron, amiodarone, microcistine e micotossine, resveratrolo);

- 4) sviluppare un modello PBK generico, calibrato e validato per la singola sostanza chimica, integrando le informazioni tossicodinamiche nel modello.

L'interazione tra i vari obiettivi è descritta nella Figura 3.

Risultati del Progetto

Il Gruppo di ricerca, oltre che del coordinamento generale del Progetto, si è occupato in prima persona della ricerca bibliografica e della creazione dei database che raccogliessero i dati presenti in letteratura sull'attività di alcuni enzimi e trasportatori (obiettivo 1) e della produzione di nuovi dati *in vitro* (obiettivo 3) relativi ai processi di cinetica. ▶

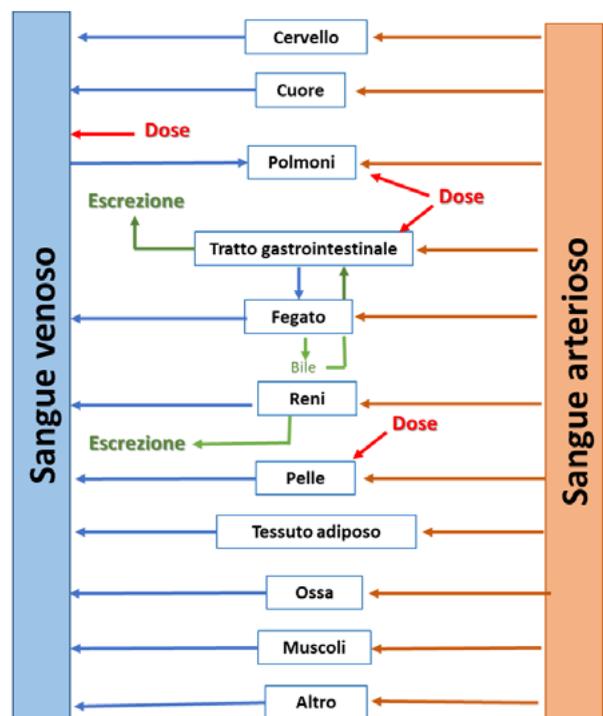


Figura 2 - Schema di un modello generico di PBK costituito da una serie di compartimenti rappresentanti gli organi/tessuti del corpo umano, connessi mediante flusso sanguigno

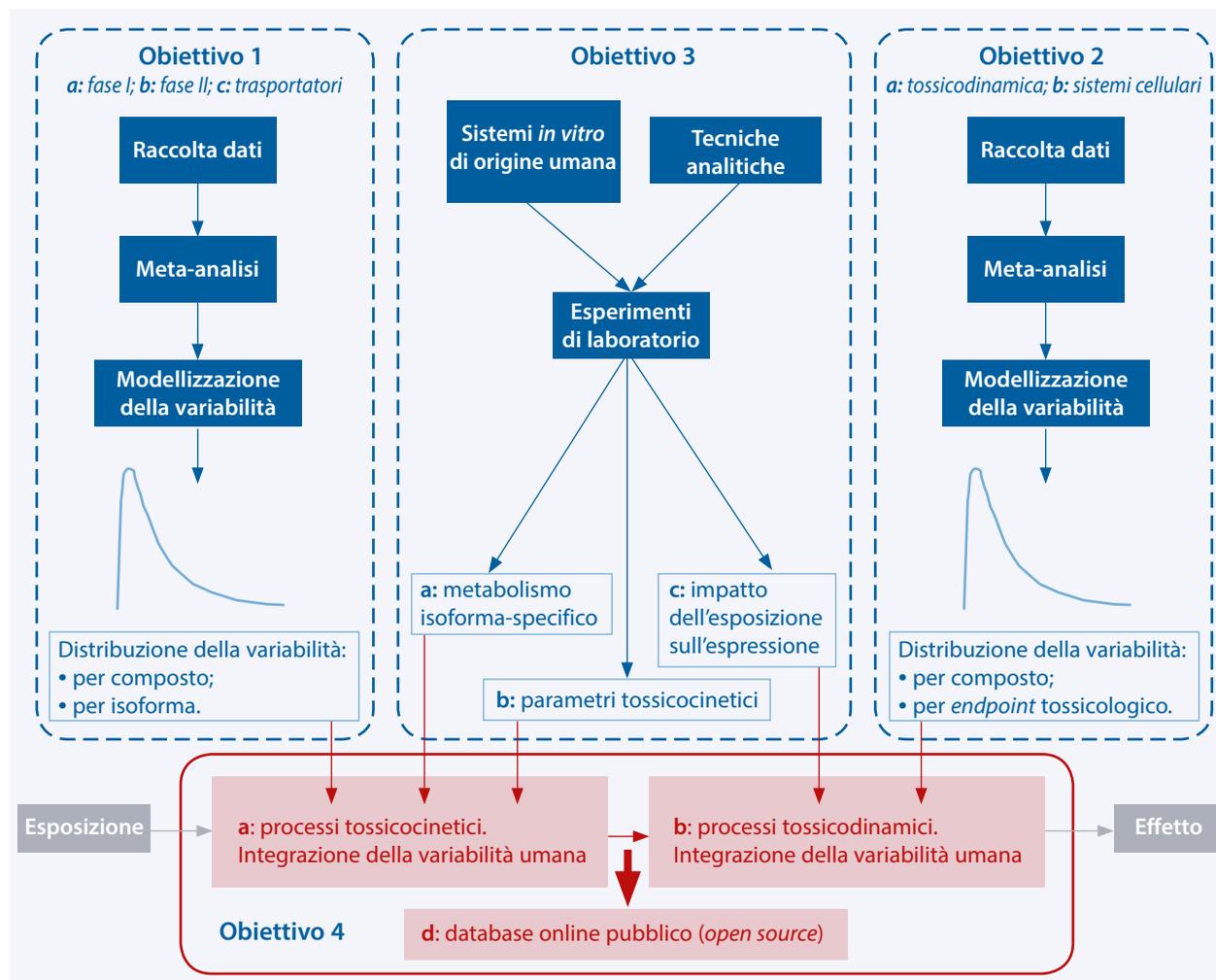


Figura 3 - Interazione tra i 4 obiettivi del Progetto

La ricerca bibliografica sistematica è stata effettuata utilizzando le principali piattaforme bibliografiche, quali Scopus, PubMed e Web of Science. Gli articoli raccolti sulle attività degli enzimi e dei trasportatori selezionati, misurate *in vivo* nell'uomo, sono stati analizzati criticamente con stringenti criteri di esclusione, inclusione e qualità dei dati. Quelli considerati validi sono stati importati in un database il cui formato è compatibile con gli altri database dell'EFSA (in modo da permettere una fruizione immediata). È stata, inoltre, effettuata una standardizzazione dei dati relativi ai parametri cinetici raccolti, necessaria per eseguire una meta-analisi in modo armonizzato per ciascun parametro. I dati raccolti si riferiscono alla popolazione sana, non esposta ad agenti chimici o farmaci; per lo più in età adulta, dal momento che spesso i dati raccolti relativi a specifiche fasce di età

(anziani, bambini e neonati) sono risultati limitati. È stata riportata anche la frequenza dei polimorfismi enzimatici.

Sulla base dei dati ottenuti, relativamente alla variabilità legata a differenze in tossicocinetica per specifici enzimi e substrati, il Progetto è stato in grado di effettuare una ri-valutazione del fattore di incertezza usato di default per tenere conto della variabilità interindividuale nell'attuale processo di valutazione del rischio. Tale fattore pari a 10 è costituito dal prodotto delle due componenti di cinetica e dinamica di uguale importanza ($10^{0,5} = 3,16$) come mostrato in Figura 4.

La necessità di suddividere le due componenti (cinetica e dinamica) nacque originariamente per distinguere il loro contributo, in modo da poter modificare il fattore di incertezza (UF maggiore o minore) quan-

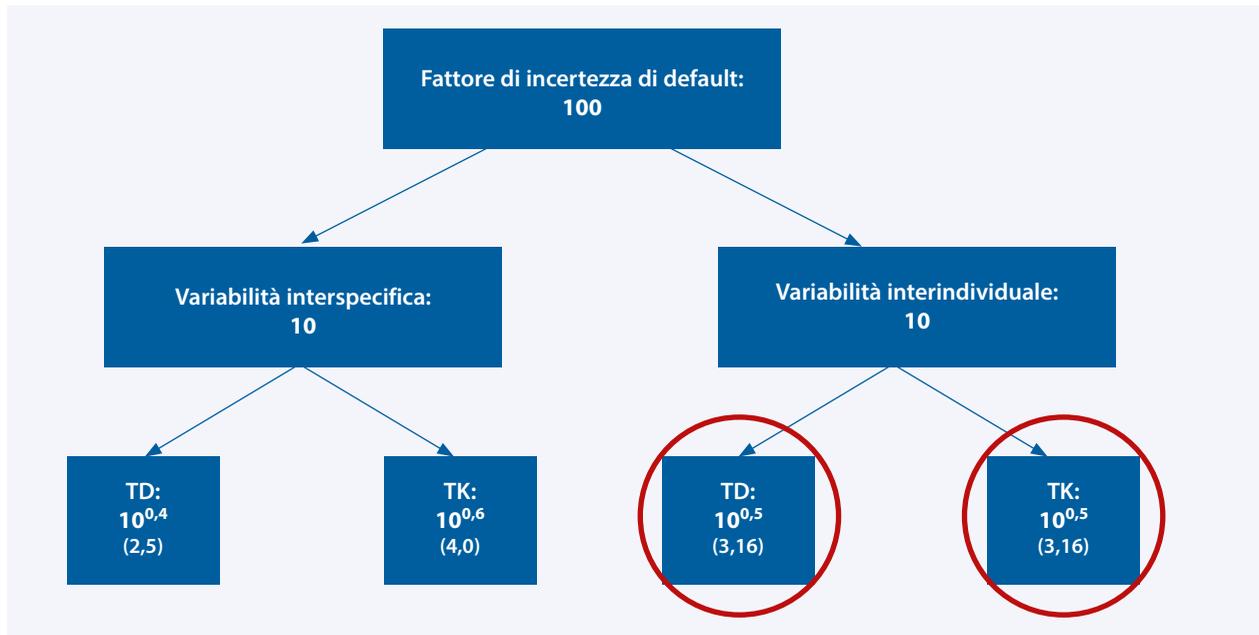


Figura 4 - La composizione dei fattori di incertezza di default usati nella valutazione del rischio

do fossero disponibili dati specifici per la sostanza. Alla fine del secolo scorso, fu proposta la possibilità di usare un fattore di incertezza legato al pathway metabolico, in assenza di dati cinetici specifici sulla sostanza (2), purché si conoscesse quale enzima fosse coinvolto. I dati del Progetto hanno permesso di rivalutare gli UF per alcuni degli enzimi studiati (CYP3A4, CYP2D6, paroxonasi, glucuroniltransferasi) (3-6) e per alcuni trasportatori (7), per i quali la base di dati si è dimostrata sufficientemente robusta per l'applicazione del modello bayesiano.

Nel caso del CYP3A4, ad esempio, la meta analisi dei dati ha mostrato che la variabilità interindividuale negli adulti sani è limitata quando l'esposizione delle sostanze metabolizzate avviene per la via intravenosa (coefficiente di variabilità - CV= 1,7-1,8), ma che aumenta se la sostanza è ingerita (CV 2,5-3,0): in ogni caso i CV per coprire il 95° o il 97,5° percentile della popolazione sono compresi nell'UF di default pari a 3,16 (3).

Relativamente alle paroxonasi, gli UF calcolati risultavano essere al di sopra del valore di default (3,16), solo per due genotipi specifici. Tuttavia, l'integrazione delle frequenze genotipiche e la distribuzione delle attività enzimatiche hanno eliminato queste differenze. Mediante la valutazione dei dati disponibili è stato comunque possibile dimostrare, come differenze nelle

attività enzimatiche misurate per le paroxonasi, rivestono un ruolo fondamentale nella valutazione del rischio per specifiche classi di composti, come i pesticidi organofosforici (4).

I database e l'analisi dei dati sono stati condotti anche per gli altri CYP e per le carbossilesterasi e le glutazione trasferasi (GST), anche se a causa dei dati limitati, non è stato possibile fare comparazioni con l'UF di default (8-10).

Relativamente all'obiettivo 3, le attività sperimentali sono state focalizzate alla caratterizzazione *in vitro* delle diverse isoforme umane di CYP ed esterasi, coinvolte nel metabolismo di pesticidi (phosmet e triflumuron) a livello epatico e intestinale (11, 12) e sono state studiate le possibili interazioni a livello cinetico tra pesticidi organofosforici (ad esempio, clorpyrifos e phosmet), evidenziando la possibilità di inibizione reciproca in condizioni di esposizione reale (12).

Il potenziale effetto neurotossico per lo sviluppo del clorpyrifos, è stato investigato in un sistema sperimentale *in vitro*, utilizzando cellule staminali pluripotenti umane (hiPSC), in grado di crescere e differenziarsi in neuroni, cellule gliali e astrociti, mimando i processi chiave dello sviluppo neurologico del cervello umano. Tali studi, condotti in collaborazione con il Joint Research Centre della Commissione Europea, ►

hanno evidenziato come l'integrazione del comportamento cinetico di una sostanza con alterazioni di specifici endpoint neurologici sia un elemento chiave per una caratterizzazione quantitativa della neurotossicità dello sviluppo (13).

È stata, inoltre, studiata la detossificazione di vari congeneri delle microcistine (MCs) a carico delle varie isoforme di GST e della reazione di coniugazione spontanea con il glutatone in varie condizioni sperimentale (14) e il ruolo delle proteine di trasporto (efflusso e influsso) che regolano l'assorbimento intestinale delle tossine utilizzando un modello *in vitro* 3D, EpiIntestinal, ricostituito da cellule umane.

Per le altre sostanze alcune delle informazioni erano presenti in letteratura e sono state organizzate in modo tale che potessero essere utilizzate nella validazione dei modelli PBK generici nei quali sono state inserite le informazioni sulla variabilità individuale relativa alla cinetica e sviluppati nell'obiettivo 4. Le sostanze per cui sono stati sviluppati i modelli sono: Chlorpyrifos, Diazinon, Phosmet, Triflumuron, Amiodarone, Microcistina-LR, Microcistina-RR, Resveratrolo, Zea-ralenone. Un modello è stato sviluppato anche in relazione allo studio di interazione binaria tra clorpyrifos e phosmet.

L'integrazione della variabilità tossicodinamica è avvenuta utilizzando dati ottenuti sulla inibizione dell'attività della acetilcolinesterasi (AChE) dopo esposizione al clorpyrifos come caso studio. Tuttavia, l'analisi dei dati di variabilità umana in dinamica (Obiettivo 3) ha dimostrato che la variabilità, in questo ambito, è difficile da stimare e questo deriva da diverse ragioni:

- la variabilità in cinetica contribuisce alla variabilità dinamica e agisce come fattore confondente, particolarmente per i composti estesamente metabolizzati;



- spesso i dati di letteratura non presentano dati dose-risposta, per cui non è possibile fare confronti;
- i biomarcatori e le unità di misura con cui sono espressi possono essere molto diversi e non si possono riportare in modo armonico;
- i tessuti e i livelli di biomarcatori possono essere altamente eterogenei e spesso ignoti.

Conclusioni

L'identificazione della variabilità legata all'età e alle differenze inter-fenotipiche può permettere la caratterizzazione della distribuzione della variabilità della popolazione umana per quanto riguarda i processi di tossicocinetica. Le attività del Progetto hanno permesso di ottenere e pubblicare informazioni riguardo la variabilità legata alla cinetica nella popolazione umana in formato *open source*, e di fornire all'EFSA dei database adatti all'integrazione con quelli già esistenti.

Un'informazione interessante emersa con la ricerca bibliografica sistematica è che, contrariamente a quanto ci si potesse aspettare, e data la mole di dati apparentemente disponibili, informazioni di qualità riguardo la maggior parte degli enzimi e dei trasportatori sono ancora limitate. Le metodologie, i substrati e le condizioni sperimentali sono spesso diverse e non consentono un confronto tra i dati. I dati sull'uomo, come atteso, si riferiscono principalmente ai prodotti farmaceutici, ma per alcuni enzimi (ad esempio, GST) non sono stati identificati ancora dei substrati specifici *in vivo*. Lo stesso vale e in maniera ancora più evidente anche per alcuni trasportatori, a causa della rilevante sovrapposizione della specificità del substrato. Un discorso analogo e forse anche con un impatto maggiore vale per la variabilità dinamica.

I nostri dati sottolineano la rilevanza dei dati di cinetica *in vitro* così come quelli sul metabolismo isoforma-specifico, che sono in grado di:

- migliorare la valutazione del rischio per singola sostanza o miscele con indicazione di potenziali differenze inter-individuali;
- supportare lo sviluppo di modelli di estrapolazione quantitativa *in vitro* *in vivo* (QIVIVE) e PBK(D), in un approccio valutativo *animal free*;
- fornire informazioni chiave sulle differenze di specie;
- identificare UF correlati al pathway metabolico.

I modelli generici PBK mirano a predire la cinetica *in vivo* nell'uomo, integrando la variabilità e le informazioni sostanza-specifiche. I risultati ottenuti dai nostri casi studio hanno prodotto risultati soddisfacenti: i risultati stimati dal modello differivano dai valori sperimentali al massimo per un fattore 2, confermando la bontà della previsione.

I risultati ottenuti sono in linea con le priorità dell'EFSA, comprese le attività relative all'implementazione di nuovi metodi di approccio (NAM) per la valutazione del rischio. La necessità di sviluppare database *open source* su dati di cinetica e dinamica e modelli PBK(D) per l'integrazione dei dati di esposizione, sono stati identificati come passaggi chiave per tale processo. Con i risultati di questo Progetto, il lavoro di EFSA, per definire un processo sempre più accurato nella valutazione del rischio, non è da considerarsi concluso. Infatti sono numerose le prospettive future che prevedono l'integrazione dei dati ottenuti in database *open source* (ad esempio, Open Food Tox), e l'integrazione delle distribuzioni statistiche della variabilità correlata al pathway metabolico in una piattaforma in via di sviluppo in EFSA (TK-plate); il miglioramento del modello generico sviluppato per permettere l'integrazione dei dati di cinetica e dinamica per la valutazione del rischio per l'uomo, ma anche per gli animali non limitandosi a una singola sostanza ma includendo miscele di sostanze, valutandone le possibili interazioni, soprattutto a livello cinetico. ■

Dichiarazione sui conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

1. Testai E, Bechaux C, Buratti FM, *et al.* Modelling human variability in toxicokinetic and toxicodynamic processes using Bayesian meta-analysis, physiologically-based modelling and *in vitro*. *EFSA J* 2021;18(4)EN-6504 (doi: 10.2903/sp.efsa.2021.EN-6504).
2. Renwick AG, Lazarus NR. Human variability and noncancer risk assessment - An analysis of the default uncertainty factor." *Regul Toxicol Pharmacol* 1998;27(1 Pt 2):3-20 (doi: 10.1006/rtph.1997.1195).
3. Darney K, Testai E, Buratti FM, *et al.* Inter-ethnic differences in CYP3A4 metabolism: a Bayesian meta-analysis for the refinement of uncertainty factors in chemical risk assessment. *Comput Toxicol* 2019;12(2):100092 (doi: 10.1016/j.comtox.2019.100092).
4. Darney K, Kasteel EEJ, Buratti FM, *et al.* Bayesian meta-analysis of inter-phenotypic differences in human serum paraoxonase-1 activity for chemical risk assessment. *Environ Int* 2020;138:105609 (doi: 10.1016/j.envint.2020.105609).
5. Darney K, Lautz LS, Bechaux C, *et al.* Human variability in polymorphic CYP2D6 metabolism: implications for the risk assessment of chemicals in food and emerging designer drugs. *Environ Int* 2021;156:106760 (doi: 10.1016/j.envint.2021.106760).
6. Kasteel EEJ, Darney K, Kramer NI, *et al.* Human variability in isoform-specific UDP-glucuronosyltransferases: markers of acute and chronic exposure, polymorphisms and uncertainty factors. *Arch Toxicol* 2020;94(8):2637-61 (doi:10.1007/s00204-020-02765-8).
7. Darney, K, Turco L, Buratti FM, *et al.* Human Variability in influx and efflux transporters in relation to uncertainty factors for chemical risk assessment. *Food Chem Toxicol* 2020;140:111305 (doi: 10.1016/j.fct.2020.111305).
8. Buratti FM, Darney K, Vichi S, *et al.* Human variability in glutathione-S-transferase activities, tissue distribution and major polymorphic variants: meta-analysis and implication for chemical risk assessment. *Toxicol Lett* 2021;337:78-90 (doi: 10.1016/j.toxlet.2020.11.007).
9. Vichi S, Buratti FM, Di Consiglio E, *et al.* OpenCYP: an open source database exploring human variability in activities and frequencies of polymorphisms for major cytochrome P-450 isoforms across world populations. *Toxicol Lett* 2021;350:267-82 (doi: 10.1016/j.toxlet.2021.07.019).
10. Di Consiglio E, Darney K, Buratti FM, *et al.* Human variability in carboxylesterases and carboxylesterase-related uncertainty factors for chemical risk assessment. *Toxicol Lett* 2021;350:162-70 (doi: 10.1016/j.toxlet.2021.07.005).
11. Timoumi R, Buratti FM, Abid-Esefi S, *et al.* Metabolism of triflumuron in the human liver: contribution of cytochrome P450 isoforms and esterases. *Toxicol Lett* 2019;312:173-80 (doi: 10.1016/j.toxlet.2019.05.009).
12. Santori N, Buratti FM, Dorne JCM, *et al.* Phosmet bioactivation by isoform-specific cytochrome P450s in human hepatic and gut samples and metabolic interaction with chlorpyrifos. *Food Chem Toxicol* 2020;143:111514 (doi: 10.1016/j.fct.2020.111514).
13. Di Consiglio E, Pistollato F, Mendoza-De Gyves E, *et al.* Integrating biokinetics and *in vitro* studies to evaluate developmental neurotoxicity induced by chlorpyrifos in human iPSC-derived neural stem cells undergoing differentiation towards neuronal and glial cells. *Reprod Toxicol* 2020;98:174-88 (doi: 10.1016/j.reprotox.2020.09.010).
14. Santori N, Buratti FM, Scardala S, *et al.* *In vitro* detoxication of microcystins in human samples: variability among variants with different hydrophilicity and structure. *Toxicol Lett* 2020;322:131-9 (doi: 10.1016/j.toxlet.2020.01.007).