

Considerazioni sulla rilevanza per l'uomo degli studi sperimentali

Angelo Moretto

Università degli Studi di Padova

CONSIDERAZIONI SULLA RILEVANZA PER L'UOMO DEGLI STUDI SPERIMENTALI

Introduzione

La maggior parte delle informazioni tossicologiche sui composti chimici con i quali l'uomo entra in contatto derivano da studi su animali. Pertanto, un problema fondamentale è quello della estrapolazione di questi dati, non solo quantitativa ma anche qualitativa; ovvero, diventa essenziale definire la rilevanza per l'uomo di quanto descritto nell'animale da esperimento. Nel contesto della discussione che segue si intende per rilevanza per l'uomo l'effettiva correttezza di applicare all'uomo gli effetti tossicologici (rilevanza qualitativa) e le relative relazioni dose-risposta (rilevanza quantitativa) riscontrate nell'animale da esperimento.

Il problema della rilevanza per l'uomo è stato inizialmente affrontato per gli effetti cancerogeni, in seguito anche per gli altri effetti tossici. Il problema si è posto in seguito all'evoluzione della comprensione della biologia del cancro e l'identificazio-

ne degli eventi chiave nel processo di cancerogenesi. Storicamente, le valutazioni si basano sugli studi sui roditori e, per i composti in uso da molto tempo e con, talora, elevate esposizioni soprattutto professionali, anche sugli studi epidemiologici. Intrinseco nelle valutazioni basate sugli studi sui roditori era l'assunto che dall'osservazione dei tumori in animali da laboratorio si potessero identificare sostanze potenzialmente cancerogene per l'uomo per le quali, mediante l'uso di modelli matematici, fornire stime del rischio.

La rilevanza dei risultati degli studi di cancerogenesi sperimentale

Con l'aumentare delle conoscenze, risulta sempre più evidente che un numero apprezzabile di sostanze chimiche causano un'aumentata incidenza di cancro negli animali da laboratorio attraverso processi che non comportano un'interazione diretta con il DNA. Si è ora in una situazione in cui si conoscono molti dei processi biologici

coinvolti nella cancerogenesi e la sequenza di questi processi può essere descritta e riassunta nel concetto di modo d'azione (MOA). Un MOA postulato per la cancerogenesi è una sequenza plausibile di eventi chiave che portano a un effetto osservato. Questa sequenza, che deve avere il sostegno di osservazioni sperimentali e dati, descrive i principali eventi citologici e biochimici misurabili che sono necessari per causare l'osservato effetto cancerogeno.

Il modo d'azione e la rilevanza per l'uomo

Fondamentale nello sviluppo di questo concetto è una pubblicazione prodotta sotto gli auspici dell'International Programme of Chemical Safety coordinato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità inizialmente riportata in Sonich-Mullin et al. (2001). Questa pubblicazione descrive un "framework" che fornisce un approccio strutturato alla valutazione del peso complessivo degli elementi di prova per postulare un MOA.

L'approccio si basa su tre domande fondamentali:

1. Se la forza probante degli elementi di prova sia sufficiente per stabilire un MOA negli animali?
2. Gli eventi chiave del MOA animale sono plausibili nell'uomo?
3. Considerando i fattori tossicocinetici e tossicodinamici, gli eventi fondamentali del MOA animale sono plausibili nell'uomo?

Le domande 2 e 3 implicano considerazioni, rispettivamente, qualitative e quantitative, nell'analisi di concordanza delle informazioni relative al MOA animale e ai suoi eventi chiave.

Per rispondere alla prima domanda è necessario applicare alcuni criteri di causalità in logica successione e mutuati dalle considerazioni di Bradford-Hill utilizzati in epi-

demologia:

1. MOA postulato.
2. Eventi chiave; parametri critici associati.
3. Relazioni dose-risposta.
4. Associazione temporale.
5. Forza, coerenza e specificità dell'associazione della chiave con la risposta tumorale.
6. Plausibilità e coerenza biologica.
7. Possibili MOA alternativi.
8. Incertezze, incongruenze e lacune nei dati.
9. Conclusione sul MOA.

La risposta alla seconda domanda richiede la valutazione qualitativa della pertinenza del MOA all'eventuale sviluppo del cancro nell'uomo. Per questo è necessario valutare se gli eventi chiave specifici che si verificano nel MOA animale possano verificarsi nell'uomo.

In generale, i dettagli degli eventi chiave iniziali sono probabilmente più specifici per le sostanze chimiche, ad esempio l'enzima risposta di induzione da parte del fenobarbital nel fegato di roditore, o la formazione di un metabolita citotossico dal cloroformio mediante enzima/i citocromo P-450. Gli eventi successivi, invece, sono più generici al MOA, quali, ad esempio, la stimolazione pleiotropica della proliferazione o l'iperplasia rigenerativa. Pertanto, la valutazione della concordanza nell'uomo degli eventi chiave per il MOA per una data sostanza chimica non è specifica per quella sostanza, ma è generalizzabile al MOA nell'uomo.

Le informazioni che possono essere utilizzate per valutare gli eventi chiave negli esseri umani possono provenire da studi

in vitro e *in vivo* sulla sostanza stessa, ma anche da informazioni di base riguardanti l'anatomia, la fisiologia, l'endocrinologia, le malattie genetiche, l'epidemiologia e qualsiasi altro tipo di informazioni riguardo agli eventi chiave nell'uomo.

Nella valutazione della concordanza delle informazioni nell'uomo a quello negli animali, è necessario tenere in considerazione e descrivere alcuni punti fondamentali quali:

- Incidenza del cancro nel sito anatomico e tipo cellulare di interesse,
- Conoscenza della natura e della funzione del sito bersaglio, compresi lo sviluppo, la struttura (macro e microscopica), meccanismi di controllo a livello fisiologico, cellulare e livelli biochimici,
- Condizioni patologiche umane e animali che forniscono informazioni per quanto riguarda la regolazione e la reattività degli organi bersaglio,
- Risposte umane e animali alla sostanza chimica, o analoghi, a esposizioni a breve, medio o lungo termine, compresi gli organi bersaglio e gli effetti.

Alla conclusione del processo sarà possibile concludere se il MOA osservato nell'animale è o meno presente anche nell'uomo e, quindi, se i dati sull'animale sono o meno applicabili all'uomo. Qualora i dati non fossero conclusivi è evidente che, a scopo precauzionale, si dovranno ritenere pertinenti per l'uomo.

Per quanto riguarda la rilevanza quantitativa è necessario tener conto di tutte le informazioni tossicocinetiche e tossicodinamiche disponibili sia sugli animali da esperimento che sugli esseri umani. Tali dati dovranno comprendere informazioni sulle dosi biologicamente efficaci necessarie per produrre le risposte dinamiche da cui può derivare lo sviluppo della neoplasia.

Se un evento chiave di un MOA di un determinato composto richiede una dose sperimentale elevata, allora la rilevanza per il rischio per l'uomo diventa una questione di esposizione. Questo è particolarmente vero quando l'uomo dimostri una sensibilità inferiore a quella dell'animale e che l'innescò dell'effetto richieda dosi così elevate da non essere plausibili nel caso di esposizioni reali dell'uomo. Pertanto, in questo caso, la valutazione dell'esposizione dell'uomo è fondamentale per una corretta valutazione del potenziale, e quindi del rischio, di causare cancro nell'uomo. Di conseguenza, anche la comprensione e conoscenza della relazione dose-risposta è fondamentale al fine di derivare modelli di estrapolazione che siano coerenti con la nostra comprensione della biologia.

In alcune occasioni vi possono non essere informazioni sufficienti sugli eventi chiave nell'uomo. In questo caso, potrebbero essere utilizzati dati epidemiologici. Ad esempio, il database biochimico e citologico sugli eventi chiave nell'uomo per composti che agiscono come il fenobarbital tramite l'attivazione del recettore CAR per indurre tumori epatici è incompleto. Tuttavia, esistono dati epidemiologici solidi che dimostrano che l'esposizione al fenobarbital per periodi prolungati a dosi relativamente elevate non provoca il cancro nell'uomo. Una possibilità, quindi, è quella di "leggere" da questi risultati con fenobarbital e applicarli a qualsiasi altro composto che ne condivida il MOA negli animali nell'indurre tumori epatici nei roditori e concludere che tumori causati da un tale composto non sono quantitativamente rilevanti per la valutazione del rischio del composto nell'uomo.

Conclusione sugli effetti cancerogeni

In conclusione, le nostre conoscenze attuali sulla biologia del cancro ci permettono di valutare la rilevanza per l'uomo dei dati sperimentali ottenuti sull'animale. In alcuni casi, gli effetti sull'animale posso-

no essere considerati del tutto irrilevanti per l'uomo per la presenza di un peculiare MOA. In altri casi, considerazioni quantitative possono indicare che l'effetto sull'uomo, benché plausibile dal punto di vista tossicologico, non è mai atteso per questioni di dose; ovvero che la dose richiesta per ottenere l'effetto nell'uomo è talmente elevata che non potrà essere raggiunta in condizioni reali. Queste considerazioni si applicano alla valutazione del rischio, per cui, ad esempio, la derivazione dei limiti di esposizione può seguire procedure adeguate alle conclusioni sul MOA. Con maggiore difficoltà queste possono essere applicate alla classificazione delle sostanze e all'uso che si fa talora della classificazione. Infatti, è possibile che in alcuni casi sulla base di considerazioni sul MOA una sostanza sia classificata in modo dubitativo ("probabilmente cancerogena"). Però, per alcune categorie di sostanze la gestione del rischio è fatta sulla base della classificazione (ovvero dell'identificazione del pericolo che è qualitativa) e non della valutazione del rischio (che è quantitativa). In questo modo si possono introdurre limiti o restrizioni eccessivi, non giustificati dalle conoscenze tossicologiche e biologiche. Questo risulta in uno spreco di risorse sia per gli studi fatti e non utilizzati per le decisioni, sia per l'imposizione di inutili limiti e restrizioni economicamente onerosi.

Gli effetti non cancerogeni

Per quanto riguarda gli effetti non cancerogeni si possono fare delle considerazioni aggiuntive. Infatti, la conoscenza degli eventi chiave di un effetto tossicologico possono permettere l'applicazione di fattori di incertezza diversi dai valori predefiniti. Infatti, in genere, nella derivazione dei limiti di esposizione per l'uomo sulla base dei dati animali si applicano i cosiddetti fattori di incertezza (o sicurezza) per tener conto delle possibili differenze di specie fra l'animale e l'uomo (fattore 10, interspecie)

e differenze di sensibilità all'interno della specie umana (fattore 10, intraspecie). Questo fattore 10x10 (100) è applicato alla dose senza effetto nell'animale da esperimento (NOAEL, no observable adverse effect level). In presenza di informazioni comparative sulla relazione dose-risposta o su altri parametri fisiologici o tossicologici, si possono calcolare e applicare fattori specifici (CSAF, chemical specific assessment factor), in cui uno o più dei valori predefiniti per le differenze di specie o interindividuali nella tossicocinetica o nella tossicodinamica vengono sostituite da un valore basato su informazioni specifiche per la sostanza chimica. Tali informazioni possono portare a un aumento o, più spesso, a una diminuzione valore rispetto al normale default di 100. Da qui si possono derivare limiti di esposizione meno stringenti, senza aumentare il rischio per la popolazione esposta, ma con possibile beneficio economico.

L'analisi del MOA può contribuire, inoltre, all'individuazione di eventuali sottopopolazioni (ad esempio, quelle con predisposizione genetica) che possono essere a maggior rischio, anche solo in alcune specifiche fasi della vita.

Conclusioni

Concludendo, i progressi fatti dalla biologia e dalla tossicologia permettono in molti casi di comprendere la rilevanza per l'uomo delle osservazioni fatte nell'animale da esperimento. Da questo deriva una migliore valutazione del rischio, con significative ricadute per la sicurezza delle popolazioni esposte e con possibili risparmi sulle risorse da investire per la sicurezza.

Bibliografia

1. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W. *IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans*. Crit Rev Toxicol. 2006 Nov-Dec;36(10):781-92. doi: 10.1080/10408440600977677. PMID: 17118728

2. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco VL, Doe JE, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Wolf DC. Classification schemes for carcinogenicity based on hazard-identification have become outmoded and serve neither science nor society. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016 Dec;82:158-166. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.10.014. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27780763.
3. Boobis AR, Doe JE, Heinrich-Hirsch B, Meek ME, Munn S, Ruchirawat M, Schlatter J, Seed J, Vickers C. IPCS framework for analyzing the relevance of a noncancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol*. 2008;38(2):87-96. doi: 10.1080/10408440701749421. PMID: 18259981.
4. Doe JE, Boobis AR, Cohen SM, Dellarco VL, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Wolf DC. The codification of hazard and its impact on the hazard versus risk controversy. *Arch Toxicol*. 2021 Nov;95(11):3611-3621. doi: 10.1007/s00204-021-03145-6. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34559250; PMCID: PMC8492552.
5. Fukunaga S, Ogata K, Eguchi A, Matsunaga K, Sakurai K, Abe J, Cohen SM, Asano H. Evaluation of the mode of action and human relevance of liver tumors in male mice treated with epyrifenacil. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2022 Dec;136:105268. doi: 10.1016/j.yrtph.2022.105268. Epub 2022 Oct 6. PMID: 36210011.
6. Meek ME, Boobis A, Cote I, Dellarco V, Fotakis G, Munn S, Seed J, Vickers C. New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J Appl Toxicol*. 2014 Jan;34(1):1-18. doi: 10.1002/jat.2949. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24166207; PMCID: PMC6701984.
7. Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M; International Programme on Chemical Safety. IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2001 Oct;34(2):146-52. doi: 10.1006/rtph.2001.1493. PMID: 11603957.