

8. COME LA SPERIMENTAZIONE SUGLI ANIMALI CONTRIBUISCE ALLA CONSULENZA SUL RISCHIO RIPRODUTTIVO

In attuazione della vigente normativa internazionale, la valutazione preclinica del rischio teratologico da farmaci viene effettuata mediante saggi condotti su animali da esperimento. I modelli animali impiegati per questa finalità sono stati individuati sulla scorta di una solida esperienza scientifica che ha trovato massimo stimolo dal clima di preoccupazione generato dalla crisi della talidomide negli anni sessanta. Un recente processo di unificazione ha provveduto ad eliminare le difformità prima esistenti tra i saggi impiegati nell'Unione Europea, negli USA e nel Giappone (ICH 1994).

L'impiego di animali nella ricerca suscita controversie sia di carattere etico, connesse all'uso di animali, che di carattere scientifico, da ricondurre principalmente a problemi di estrapolazione dei dati provenienti dalla sperimentazione animale all'uomo. Ciononostante gli studi sperimentali continuano a rappresentare uno strumento cardine nella valutazione del rischio teratologico. Lo sviluppo di metodologie di screening alternative che non sono basate sull'impiego di animali (per esempio saggi in vitro su cellule staminali) è vista con favore non solo dall'opinione pubblica, ma anche dalla comunità scientifica. Purtroppo i programmi di ricerca promossi per questo fine non hanno ancora condotto allo sviluppo di modelli sufficientemente predittivi. L'estrema dinamicità dei processi ontogenetici e la complessa natura delle interazioni materno-fetali, rappresentano ostacoli attualmente insormontabili per il raggiungimento di questo traguardo.

■ Criteri generali per lo screening dei farmaci teratogeni

La valutazione del rischio teratologico si basa sul cosiddetto segmento II, finalizzata alla ricerca delle principali manifestazioni del danno embrionale da farmaci: malformazioni, abortività e ritardato accrescimento intrauterino. Lo studio viene integrato da segmenti sperimentali finalizzati all'identificazione di possibili effetti avversi sul processo della fecondazione e sulle prime fasi dello sviluppo embrionale (segmento I), nonché sullo sviluppo pre- e post-natale e sulla performance materna (segmento III). Trattazioni esaustive sulle modalità di esecuzione di test di screening per teratogeni sono disponibili in letteratura (ICH1994, Barrow 2003, Holson et al 2000, Riecke 2000).

Il segmento II prevede il trattamento di animali gravidi con il farmaco, in corso di valutazione, durante tutto il periodo dell'organogenesi, quando è massimo il rischio teratologico. Al fine di contenere possibili fattori confondenti specie-specifici, i saggi vengono condotti su almeno due specie animali; topo o ratto (roditore) e coniglio (non-roditore). Un aspetto cruciale del segmento è rappresentato dalla defini-

zione della relazione dose-risposta. Per questa finalità gli animali vengono esposti ad almeno tre differenti dosaggi. L'aumento del grado di esposizione (concentrazione dell'agente o durata dell'esposizione) deve comportare un incremento della risposta teratogena. In mancanza di questa evidenza, l'esistenza di una correlazione di tipo causa-effetto tra l'esposizione e l'effetto osservato diviene dubbia. La relazione dose-risposta dei teratogeni è caratterizzata dalla presenza di una soglia, cioè da un livello di esposizione al di sotto del quale non sono osservabili effetti nocivi sul prodotto del concepimento. In termini biologici, la soglia rifletterebbe l'estensione dell'effetto tossico ad un popolazione di cellule embrionali così numerosa, tale per cui non sono più possibili processi riparativi.

Convenzionalmente, l'intervallo delle dosi saggiate dovrebbe idealmente avere ai suoi estremi una dose priva di effetti materni e fetali ed una dose capace di indurre tossicità materna sistemica, evidenziata da almeno una riduzione del 10% del peso materno.

La fase sperimentale termina con la ricerca degli effetti teratogeni attraverso riscontri morfologici e morfometrici effettuati su feti prossimi al termine della gravidanza. Vengono usualmente impiegate metodologie standardizzate relativamente semplici, idonee all'identificazione delle manifestazioni teratologiche maggiori. Non è per esempio prevista nei test di screening la sistematica valutazione istologica dei tessuti fetali.

Il processo di valutazione dei risultati scaturiti dalla sperimentazione si avvale di alcuni assunti: 1) l'esposizione ad un agente che causa effetti teratogeni nell'animale da esperimento potrebbe indurre, in presenza di livelli di esposizione sufficientemente elevati, effetti teratogeni nell'uomo; 2) tutti gli effetti osservabili (malformazioni, morte endouterina, ritardo di accrescimento e deficit funzionali) sono di potenziale rilievo; 3) lo spettro di effetti teratogeni osservabili nell'uomo potrebbe essere differente da quello osservato nell'animale da esperimento.

In presenza del riscontro di effetti teratogeni, la decisione di ammettere o meno il farmaco all'impiego clinico viene presa in funzione dei benefici terapeutici del composto. Questo tipo di logica ha permesso l'introduzione di potentissimi teratogeni nel mercato farmaceutico. L'isotretinoina, un derivato della vitamina A estremamente efficace nel trattamento di alcune forme di acne, rappresenta in questo senso un caso paradigmatico.

Limiti della sperimentazione animale

Come sottolineato in precedenza, i test animali continuano a rappresentare uno stadio importante ed insostituibile nella strategia di prevenzione del rischio teratologico da farmaci. Bisogna d'altra parte considerare che i modelli animali attualmente utilizzati sono lontani dal poter essere considerati ottimali. Un fattore che concorre a limitare il valore dei test è rappresentato dal fatto che la suscettibilità agli effetti teratogeni di un farmaco può variare in maniera sensibile nelle diverse specie (tabella 1).

Tabella 1*Suscettibilità di alcune specie animali ad agenti teratogeni*

Farmaco	Uomo	Primate non umano	Topo	Ratto	Coniglio	Criceto
Acido valproico	Spina bifida Difetti cardiovascolari Difetti cranio-facciali Difetti scheletrici	Difetti scheletrici	Esencefalia Difetti scheletrici	Difetti scheletrici	Difetti scheletrici	Esencefalia
Aspirina	NT	NC	NC	Difetti cardiovascolari Difetti scheletrici Gastroschisi Onfalocele	NT	NC
Acetazolamide	NT	NT	Ectrodattilia Difetti renali	Ectrodattilia Difetti renali	Ipoplasia del primo metacarpo	Ectrodattilia
ACE-inibitori	Disgenesia del tubulo renale Difetti craniofacciali	-	NC	NT	NT	NT
Talidomide	Malformazioni degli arti Malformazioni dell'orecchio Disfunzione dei nervi cranici Atresia intestinale Difetti cardiaci Difetti renali Dentizione anomala	Malformazioni degli arti Malformazioni dell'orecchio Disfunzione dei nervi cranici Atresia intestinale Difetti cardiaci Difetti renali Dentizione anomala	NT	NT	Malformazioni degli arti Difetti cardiaci Difetti renali Difetti intestinali	NT

NT: non teratogeno

NC: effetti non sufficientemente caratterizzati

Non sono stati completamente definiti i fattori che conducono una specie ad essere vulnerabile o resistente ad insulti teratogeni. Importanti sembrano essere a questo riguardo fattori sia di ordine farmacocinetico che organogenetico.

I parametri farmacocinetici determinano quanto, quando ed in quale forma un farmaco raggiunge i tessuti bersaglio. È stato dimostrato che il profilo farmacocinetico può presentare sostanziali variazioni con la specie, soprattutto in termini di velocità di eliminazione, di legame alle proteine plasmatiche e di passaggio transplacentare (Committee on Developmental Toxicology 2000, Nau 1986). Nella tabella 2 sono illustrate alcune delle differenze riscontrate relativamente all'emivita plasmatica di farmaci.

Tabella 2

Emivita plasmatica in ore di alcuni farmaci in diverse specie animali

Farmaco	Topo	Ratto	Coniglio	Criceto	Porcellino d'india	Cane	Primate non umano	Uomo
Acido retinoico 13-cis	0,3	1,0	-	-	-	3-6	-	10-30
Acido valproico	0,8	0,3			1,0	1-4	0,7-3	12,0
Antipirina	0,2-0,6	1,0-2,0	0,9	-	2,0	1-2	1-2	12
Caffeina	0,7	0,8	1,6	-	-	-	3,2	4,2
Ciclofosfamida	0,2	0,7	-	0,2	-	0,5	0,7	7,0
Diazepam	1,0	1,0	3,0	-	2,4	8,0	-	20-50
Difenilidantoina	-	3-5	-	-	-	2-6	10-15	10-60
Fenobarbitale	3,0	-	30-50	-	-	40-70	-	50-150

Modificata da Nau, 1986

Esiste ormai ampio consenso sul concetto che l'introduzione di valutazioni di tipo farmacocinetico nei test di screening potrebbe facilitare l'iter di estrapolazione dall'animale all'uomo (Committee on Developmental Toxicology 2000). Approcci sperimentali basati su conoscenze farmacocinetiche potrebbero, per esempio, permettere di stabilire quali sono i livelli plasmatici di farmaco nell'animale sperimentale quando l'effetto teratogeno viene indotto e come questi livelli sono correlabili con quelli riscontrabili nei pazienti esposti a dosi terapeutiche di farmaco (Brent 2004). L'organogenesi, con le sue differenze interspecifiche, è un altro fattore che può condizionare la risposta teratologica di una specie. È interessante notare che variazioni organogenetiche sono osservabili non solo tra specie differenti, ma anche all'interno di una medesima specie. È stato per esempio osservato che i processi organogenetici che portano alla chiusura del tubo neurale possono avvenire con modalità differenti in alcuni ceppi murini (Juriloff et al 1991). Queste differenze potrebbero

essere in parte responsabili della diversa vulnerabilità di questi ceppi ad alcuni teratogeni del tubo neurale, quali l'acido valproico e l'ipertermia.

La valutazione del rischio teratologico viene fatta estrapolando i risultati osservati su di un piccolo numero di animali trattati con dosi elevate di farmaci ad un numero elevato di esseri umani che sono esposti a (bassi) livelli farmacologici del composto. Gli elevati dosaggi che vengono impiegati nei test di screening potrebbero essere responsabili del numero eccessivo di farmaci che mostra effetti teratogeni. Infatti, l'esposizione a dosaggi elevati potrebbe attivare meccanismi di tossicità embrionale che non vengono innescati da esposizioni farmacologiche o indurre importanti variazioni del profilo farmacocinetico (ad esempio saturazione del metabolismo del farmaco). Da uno studio comparativo (Frankos 1985) è per esempio emerso che su 38 agenti con effetti teratogeni certi o sospetti nell'uomo, 37 di essi erano altrettanto teratogeni in almeno una specie animale. Di converso, su 165 agenti apparentemente privi di attività teratogena nell'uomo, ben 68 (41%) risultavano teratogeni in più di una specie animale. I modelli animali avrebbero quindi un'elevata sensibilità (sensibilità: capacità di evidenziare una risposta positiva vera per l'uomo), ma una bassa specificità (specificità: capacità di presentare una risposta negativa vera per l'uomo). Se questo tipo di risposta è per certi versi rassicurante (perché associata ad una ridotta probabilità di risultati falsamente negativi), esso d'altra parte comporta un aumento della probabilità che farmaci utili vengano esclusi dall'impiego terapeutico perché erroneamente sospettati di teratogenicità.

Uso dei dati animali nella consulenza teratologica

Per alcuni farmaci, soprattutto per quelli introdotti di recente nell'uso clinico, i dati forniti dalla sperimentazione animale rappresentano le uniche informazioni disponibili sulla potenziale teratogenicità del composto. Accade quindi che queste informazioni siano basilari per stimare la probabilità che l'esposizione di una gestante ad un farmaco durante un determinato periodo della gravidanza possa esitare in un effetto teratogeno. Le informazioni scaturite dalla sperimentazione animale vengono prese in considerazione dal sistema di classificazione dei farmaci emanato dalla Food and Drug Administration nel 1979 e basato su cinque lettere (A, B, C, D, o X) che vengono assegnate al farmaco principalmente sulla base della possibile teratogenicità o tossicità riproduttiva. Questo dovrebbe rendere più agevole il compito al medico che deve formulare una stima del rischio esclusivamente sulla base dei dati animali. Sfortunatamente il sistema della FDA viene ritenuto insoddisfacente per l'ambiguità e l'incompletezza delle informazioni che fornisce (Addis et al 2000). A fronte di questo stato delle cose, è evidente la necessità per chi esegue consulenze teratologiche di saper interpretare ed utilizzare nel modo corretto i dati animali. Uno recente studio ha posto in luce la necessità di iniziative formative rivolte a questo fine (Scialli et al 2004). Clinici con grande esperienza in teratologia, interpretavano i dati animali in modo inadeguato. È emersa per esempio la tendenza a

considerare i risultati di studi animali come probanti di specifici effetti per l'uomo, vale a dire che il riscontro di una specifica malformazione nell'animale (per esempio palatoschisi) veniva considerata indicativa dello stesso tipo di rischio malformativo nell'uomo. Notoriamente, invece, il riscontro di un effetto teratogeno farmacologico indotto nell'animale viene interpretato dalle agenzie preposte alla regolamentazione dell'uso dei farmaci come indicativo del fatto che quel farmaco in quelle specifiche condizioni sperimentali ha la potenzialità di perturbare lo sviluppo prenatale. I dati forniti dagli studi animali sono riconducibili principalmente a tre tipi di scenario (Webster e Freeman 2001).

Assenza di effetti

Nelle specie trattate non sono stati identificati effetti teratogeni. I dati suggeriscono un basso rischio soprattutto quando: 1) il profilo farmacocinetico del farmaco è simile nell'uomo e nell'animale; 2) le concentrazioni farmacologiche embrionali, estrapolate in genere sulla base delle concentrazioni materne, hanno mostrato valori superiori rispetto a quelle attese nell'embrione umano.

Presenza di effetti embriotossici ma non di malformazioni

In questo caso l'esposizione ha prodotto un aumento della letalità embrionale e fetale, ritardato accrescimento intrauterino e aumentata prevalenza di anomalie strutturali minori, ma non delle malformazioni maggiori. Questo spettro di effetti suggerisce che la tossicità embrionale sia subordinata ad effetti tossici sull'organismo materno (confermata frequentemente da calo ponderale durante la gestazione). Il riscontro nel sangue dell'animale gravido di livelli farmacologici decisamente superiori rispetto a quelli identificabili nell'uomo suffraga ulteriormente questa ipotesi. Di converso, il rischio di teratogenicità diviene maggiore quando gli effetti sono comparsi in presenza di concentrazioni ematiche comparabili o vicine a quelle umane.

Il farmaco ha indotto malformazioni maggiori

Il rischio per l'uomo diviene elevato soprattutto se sono state riscontrate una o più malformazioni in tutte e due le specie animali e se esiste prova che l'effetto malformativo sia stato-dose dipendente.

Modelli animali nello studio del meccanismo d'azione degli agenti teratogeni

L'uso degli animali in campo teratologico non si limita ai test di screening. Modelli animali in vivo ed in vitro trovano infatti largo impiego in ricerche mirate all'identificazione dei meccanismi attraverso cui gli agenti chimici e farmacologici inducono teratogenicità. Il termine meccanismo viene riferito in senso stretto agli eventi molecolari iniziali responsabili di un effetto teratogeno. Più di recente, questo termine

è stato usato per identificare l'insieme degli eventi che conducono ad un anormale sviluppo embrionale (Committee on Developmental Toxicology 2000). Sono quindi di rilievo meccanicistico tutte le informazioni relative: 1) alla farmacocinetica del composto teratogeno (assorbimento, distribuzione, metabolismo, ed eliminazione); 2) al processo di interazione del farmaco o di un suo metabolita con specifiche componenti molecolari; 3) alle conseguenze cellulari e tissutali di questa interazione; 4) agli effetti dell'alterazione cellulare e tissutale sull'organogenesi.

Lo studio del meccanismo d'azione dei teratogeni non è un processo disgiunto dalla valutazione del rischio teratologico. Lo sviluppo di efficaci strategie preventive è infatti notoriamente subordinata alla conoscenza dei meccanismi che governano un fenomeno avverso. Facciamo un esempio. Secondo una linea di ricerca, gli effetti teratogeni dell'antiepilettico fenitoina sarebbero indotti da un metabolita (un episodio) del farmaco generato in seguito ad un processo di biotrasformazione mediato dal sistema del citocromo P450 (Buehler et al 1994). La fenitoina sarebbe quindi un proteratogeno incapace di indurre effetti nocivi sull'embrione in assenza di un processo di bioattivazione. Secondo un'altra linea di ricerca gli effetti teratogeni sarebbero indotti dal farmaco non metabolizzato dal P450 (Tiboni et al 1999). L'identificazione della specie chimica responsabile degli effetti teratogeni potrebbe aiutare a definire i fattori che condizionano la vulnerabilità embrionale alla fenitoina. Qualora fosse il farmaco stesso e non il suo metabolita generato dal sistema del citocromo P450 ad attivare la teratogenesi, dovrebbero essere considerate come fattori favorevoli il rischio tutte quelle le condizioni che aumentano il passaggio transplacentare di fenitoina non metabolizzata. Tra queste, l'inibizione del metabolismo della fenitoina ad opera di altri farmaci, le disfunzioni epatiche, i difetti genetici del metabolismo della fenitoina, l'ipoalbuminemia, o lo spiazzamento della fenitoina dal legame con l'albumina ad opera di altri farmaci. Ovviamente questi fattori giocherebbero un ruolo diverso qualora la biotrasformazione della fenitoina ad opera del sistema del citocromo P450 rappresentasse il prerequisito per l'induzione degli effetti malformativi.

Bibliografia

- Addis A, Magrini N, Mastroiacovo P. Drug use during pregnancy. *Lancet* 2001; 35 (9258): 800.
- Addis A, Sharabi S, Bonati M. Risk classification system for drug use during pregnancy. Are they a reliable source of information? *Drug Saf* 2000; 23: 245-53.
- Barrow PC. Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. *Toxicology* 2003; 1; 185: 205-12.
- Brent RL. Utilization of animal studies to determine the effects and human risks of environmental toxicants (drugs, chemicals, and physical agents). *Pediatrics*. 2004; 113 (4 Suppl); 984-95.

- Buehler BA, Rao V, Finnell RH. Biochemical and molecular teratology of fetal hydantoin syndrome. *Neurol Clin* 1994; 12: 741-8.
- Committee on Developmental Toxicology. *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment*, National Research Council. The National Academies Press 2000.
- Frankos VH. FDA perspectives on the use of teratology data for human risk assessment. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5: 615-25.
- Holson JF, Desesso JM, Jacobson CF et al. Appropriate use of animal models in the assessment of risk during prenatal development: an illustration using inorganic arsenic. *Teratology* 2000; 62: 51-71.
- ICH. Step 4 tripartite harmonised guidelines. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products. In: D'Arey PF and Harron DWG, eds. *Proceedings of The Second International Conference on Harmonisation Orlando*. Belfast: Queen's University, 1994: 557-578.
- Juriloff DM, Harris MJ, Tom C, et al. Normal mouse strains differ in the site of initiation of closure of the cranial neural tube. *Teratology* 1991; 44: 225-33.
- Nau H. Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis. *Environ Health Perspect* 1986; 70: 113-29.
- Riecke K, Stahlmann R. Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia* 2000; 32: 209-18.
- Scialli AR, Buelke-Sam JL, Chambers CD, et al. Communicating risk during Pregnancy: a workshop on the use of data from animal developmental toxicity studies in pregnancy labels for drug. *Birth Defects Research (Part A)* 2004; 70: 7-12.
- Tiboni GM, Giampietro F, Angelucci S, et al. Additional investigation on the potentiation of phenytoin teratogenicity by fluconazole. *Toxicol Lett* 2003; 145: 219-29.
- Tiboni GM, Iammarrone E, Giampietro F, et al. Teratological interaction between the bis-triazole antifungal agent fluconazole and the anticonvulsant drug phenytoin. *Teratology* 1999; 59: 81-7.
- Webster WS, Freeman JA. Is this drug safe in pregnancy? *Reprod Toxicol* 2001; 15: 619-29.