

# Elementi di tossicologia degli Alimenti



# **Episodi di intossicazione collettiva alimentare nell'uomo**

<b>Luogo e anno</b>	<b>Sostanza</b>	<b>Effetti</b>	<b>n° morti o sogg. colpiti</b>
<b>Toyana (Giap) 1950</b>	<b>Cadmio (riso)</b>	<b>Gravi lesioni ossee e renali</b>	<b>200 (stima appross.)</b>
<b>Minamata (Giap) 1950</b>	<b>CH<sub>3</sub>Hg (pesce)</b>	<b>Gravi alterazioni neurologiche</b>	<b>200 (stima appross.)</b>
<b>Turchia 1956</b>	<b>HCB (grano)</b>	<b>Porfiria, alterazioni neuronali</b>	<b>4000</b>
<b>Irak 1981</b>	<b>“Toxic oil”</b>	<b>Sintomatologia variabile</b>	<b>340</b>
<b>Spagna 1989</b>	<b>Clembuterolo (fegato bovino)</b>	<b>Sintomi cardiaci e nervosi</b>	<b>43 famiglie</b>
<b>Francia 1990</b>	<b>Clembuterolo (fegato bovino)</b>	<b>Sintomi cardiaci e nervosi</b>	<b>13 famiglie</b>

# TOSSICOLOGIA

La tossicologia può definirsi come quella branca delle discipline mediche che studia la natura, gli effetti, le proprietà e le dosi delle sostanze tossiche.



## Definizione di tossico

Un tossico è una sostanza chimica che, una volta venuta a contatto con un sistema biologico, determina una alterazione dello stato fisiologico non desiderata

## Intossicazione

Per “intossicazione” s’intende una malattia acuta o cronica che si produce a seguito dell’esposizione dell’organismo ad una sostanza tossica. L’intossicazione è un fenomeno complesso ed è il risultato di processi che riguardano la sostanza, l’organismo e l’interazione tra sostanza ed organismo per la cui comprensione è necessario conoscere la chimica, la biochimica, la biologia, la fisiologia.

# Alcuni concetti di tossicologia

---

- Tossicità acuta, subacuta, cronica subcronica
- Tossicità immediata e ritardata
- Tossicità locale e sistemica
- Effetti tossici reversibili ed irreversibili

# Intossicazione

L'elemento che differenzia l'intossicazione da altre alterazioni dello stato fisiologico, causate da altra natura (traumatica, infettiva, degenerativa) è l'estraneità (in senso **qualitativo o quantitativo**) dell'agente eziologico, intendendo come estranea una sostanza chimica che non è normalmente presente in un organismo o presente a concentrazioni non fisiologiche.

Il concetto di estraneo (**quantità e qualità**) deve essere correlato sempre alla definizione di dose



- 
- **NESSUNA SOSTANZA E' UN VELENO DI PER SE STESSA, MA E' LA DOSE CHE FA DELLA SOSTANZA UN VELENO.**

**Filippo Aureolo Paracelso (1493-1541)**

$$\mathbf{ET}_s(\mathbf{i}/\mathbf{r}) = \mathbf{C}_s(\mathbf{b})_{(t)} * \mathbf{R}_{(n)} * \mathbf{AF}_{(sr)}$$



$$ET_s (i/r) = C_s (b)_{(t)} * R_{(n)} * AF_{(sr)}$$

**ET = Effetto Tossico**

**S = sostanza (chimica)**

**T = tempo**

**C = concentrazione**

**b = biofase**

**R = numero recettori**

**AF = Affinità S vs R (forza/tipo di legame/Costante di dissociazione, ecc.)**

$$ET_s (i/r) = C_s (b)_{(t)} * R_{(n)} * AF_{(sr)}$$

Tossicocinetica

Tossicodinamica

Soggetto/individuo/popolazione

# Fattori che influenzano la risposta tossicologica

- A) **Fattori relativi alla sostanza** (dose, caratteristiche molecolari, meccanismo d'azione)
- B) **Fattori relativi all'individuo** (tossicocinetica, variazioni individuali nella sensibilità al tossico)
- C) **Fattori relativi al tempo** di contatto con la sostanza tossica che permettono di distinguere la natura acuta o cronica dell'intossicazione



# **A) Fattori relativi alla sostanza**

**1) Dose**

**2) Struttura molecolare**

**3) Meccanismo d'azione**

# Cos'è la dose?

---

- è definita come quella **QUANTITA' DI SOSTANZA ESPRESSA IN UNITA' DI PESO O DI VOLUME PER UNITA' DI PESO CORPOREO**

**mg/kg o ml/kg**

# Unità di misura

---

- ◉ Dose
- ◉ Concentrazioni



**DL<sub>50</sub>**

**(Dose letale 50 o Dose letale media)**

**è definita come quella dose CHE  
SOMMINISTRATA IN UNA DETERMINATA  
SPECIE PER UNA DETERMINATA VIA E' IN  
GRADO DI DETERMINARE LA MORTE DEL  
50% DEGLI ANIMALI TRATTATI**

# ***Efficacia, Tossicità, Letalità***

---

**ED50 – Dose Efficace 50; la dose a cui il 50% della popolazione o del campione manifesta un determinato effetto; usato con curve dose risposta quantali**



**TD50 - Dose Tossica 50 - la dose a cui il 50% della popolazione o del campione manifesta un determinato effetto tossico**

**DL50 - Dose Letale 50 – la dose che porta a morte il 50% dei soggetti**

## **RELAZIONE DOSE - RISPOSTA**

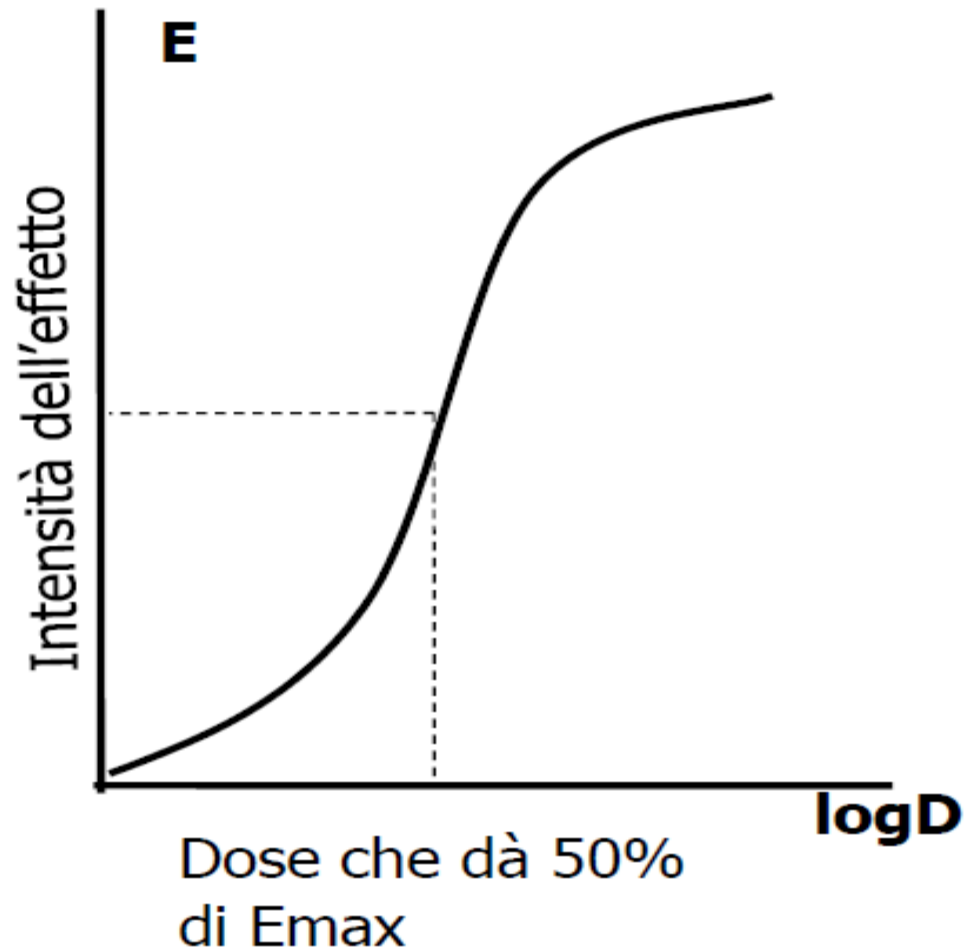
È essenziale che esista un bersaglio con cui l'agente tossico possa interagire perché la risposta tossica avvenga.

L'effetto tossico è strettamente correlato sia qualitativamente che quantitativamente alla **dose interna** (mg/kg p.c. dell'agente tossico e/o dei suoi metaboliti che raggiungono il bersaglio).

La concentrazione al bersaglio dell'agente tossico e/o dei suoi metaboliti (**dose interna**) è strettamente correlata alla **dose esterna** (mg/kg p.c. dell'agente tossico a cui l'organismo è esposto).

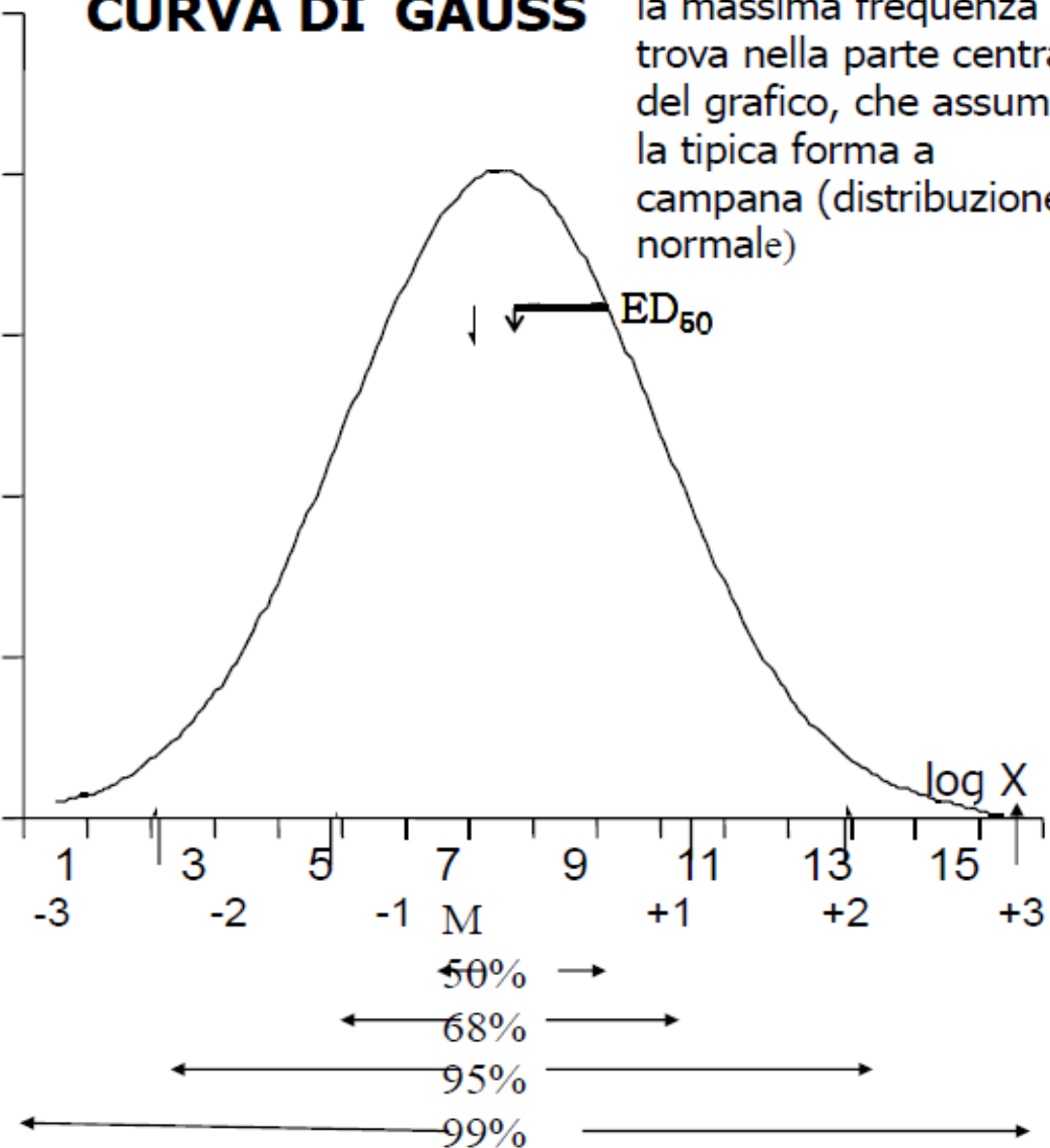


# CURVE DOSE - EFFETTO GRADUALE



## CURVA DI GAUSS

la massima frequenza si trova nella parte centrale del grafico, che assume la tipica forma a campana (distribuzione normale)

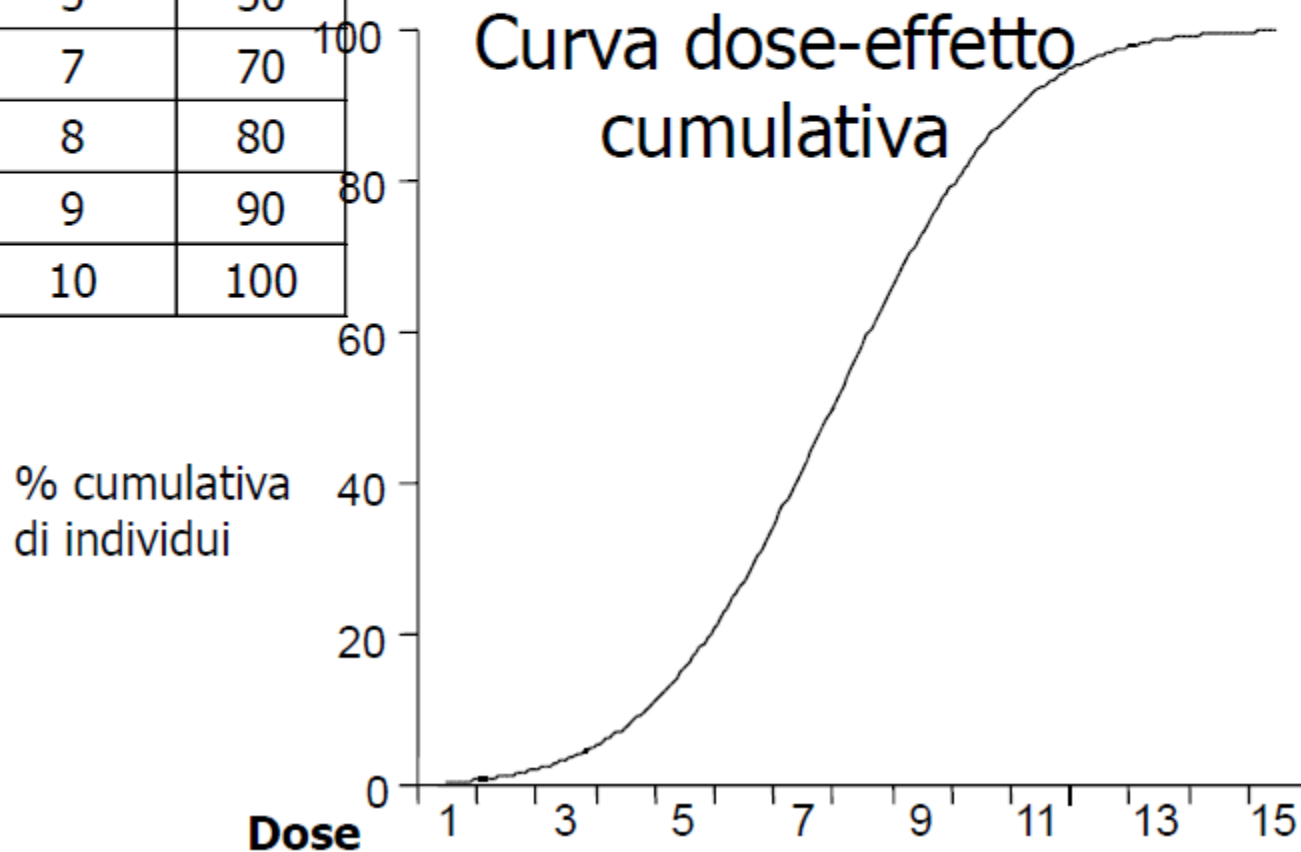


•Relazione dose-effetto in una popolazione di individui con un *endpoint* tutto-o-nulla o quantale. Aumentando progressivamente la dose in ciascun individuo della popolazione, viene identificata la dose minima efficace, che in quel soggetto determina la risposta tutto-o-nulla (dose soglia).

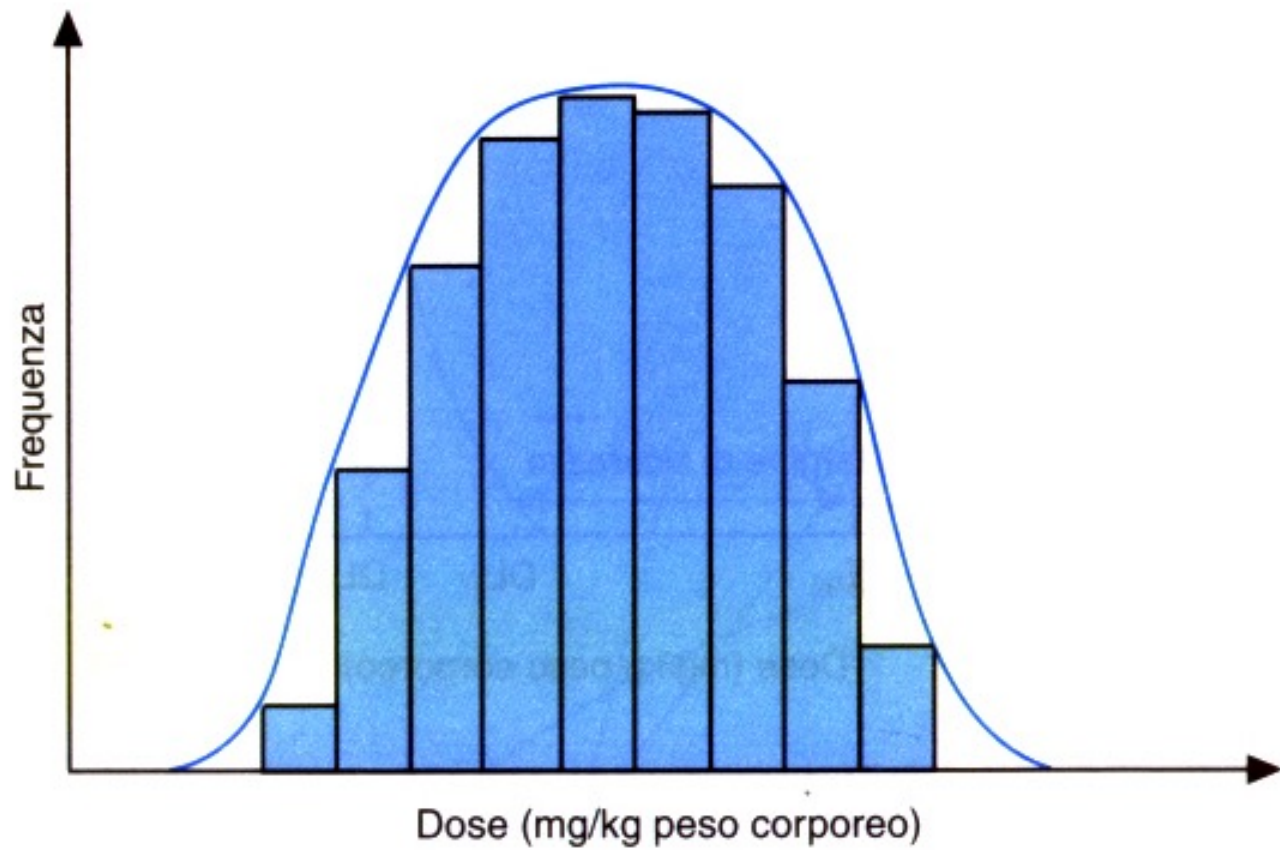
•Nel grafico si osserva la **distribuzione** della frequenza delle dosi soglia nella popolazione esaminata.

Dose	No. di individui	No. Rispondenti	% Risposta
1	10	0	0
2	10	1	10
3	10	3	30
4	10	5	50
5	10	7	70
6	10	8	80
7	10	9	90
8	10	10	100

- Un modo più conveniente di esprimere la relazione quantale dose-effetto è quello di mettere in grafico la dose vs. la percentuale cumulativa dei soggetti che rispondono ad una data dose. La distribuzione normale è così trasformata in una curva **sigmoide**.

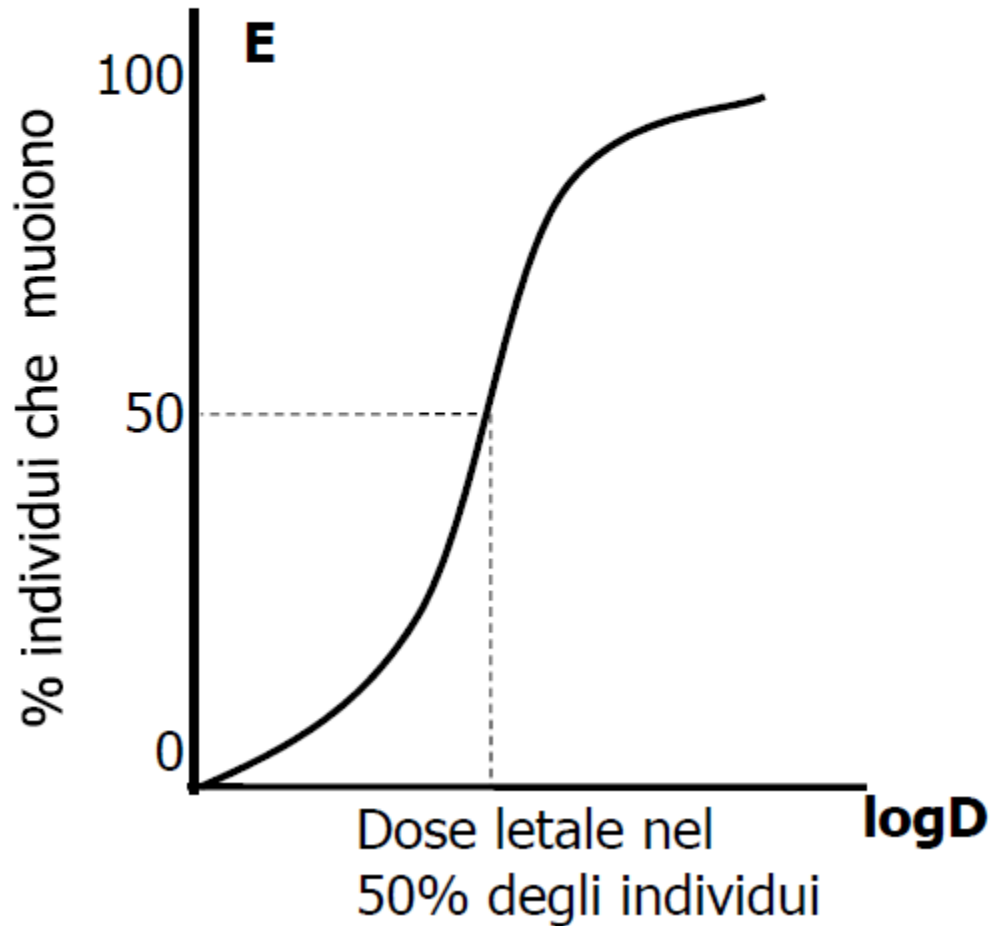




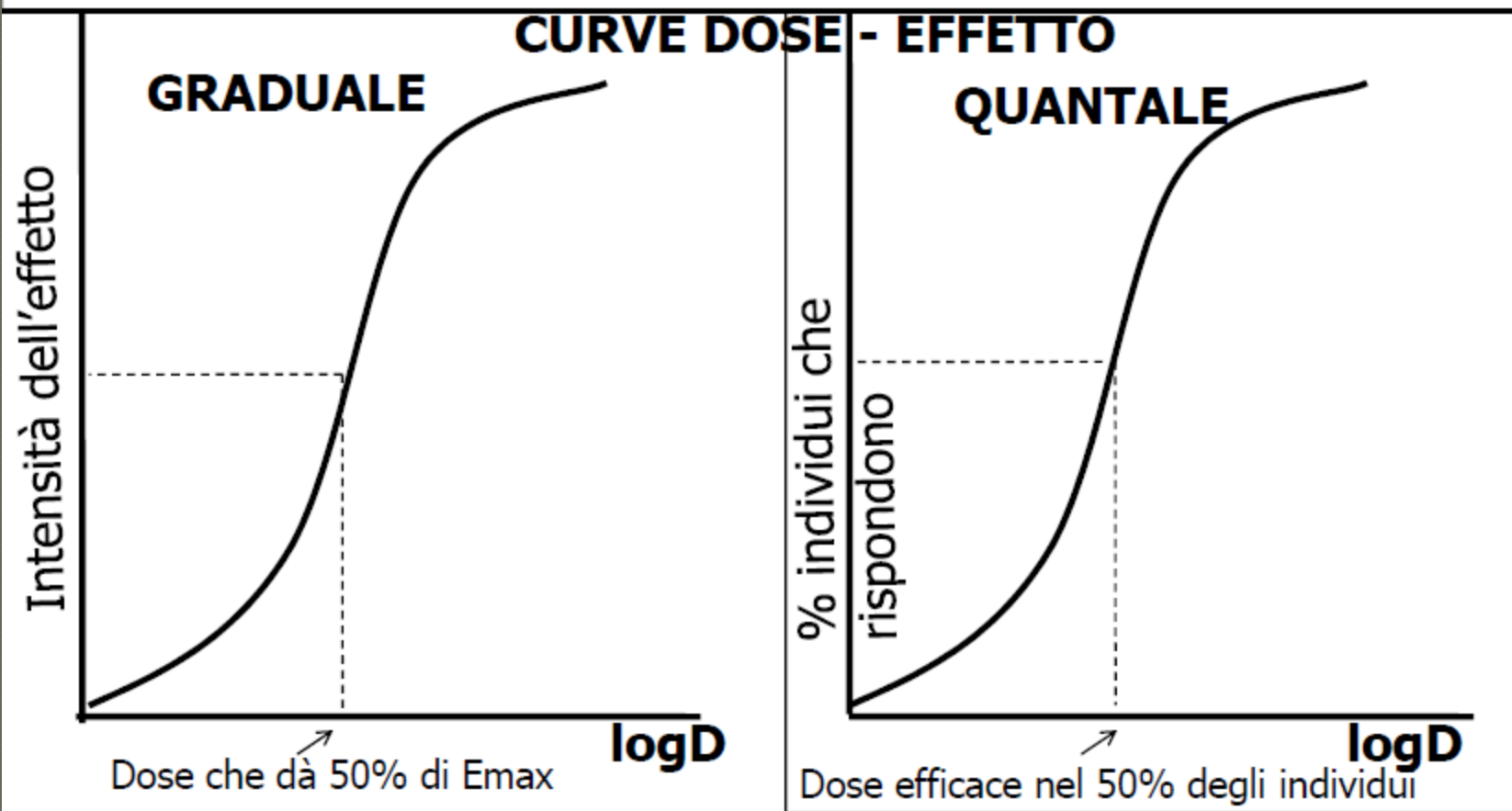


# CURVA QUANTALE

## Indice di letalità DL50



- Sebbene le curve dose-effetto quantale e graduale siano simili, esse hanno significati completamente diversi: la curva graduale esprime la relazione fra l'incremento della dose e la relativa variazione dell'effetto, mentre la curva quantale è la misura della **variazione della dose soglia necessaria per produrre un determinato effetto tutto-o-nulla** in un gruppo di individui.
- La dose efficace mediana ( $ED_{50}$ ) in una curva dose-effetto quantale è la dose a cui risponde il 50% della popolazione.





# Classificazione delle sostanze in categorie correlate alla loro tossicità

Indice di tossicità	Terminologia di uso corrente	Probabile dose letale in uomo di 70 kg
6	supertossiche	<5mg/kg
5	altamente tossiche	5-50 mg/kg
4	molto tossiche	50-500 mg/kg
3	moderatamente tossiche	0,5-5 g/kg
2	leggermente tossiche	5-15 g/kg
1	praticamente atossiche	>15 g/kg

Le dosi sono estrapolate da osservazioni cliniche e dai valori delle DL<sub>50</sub> ottenute in varie specie animali

## Classificazione delle sostanze tossiche in relazione al loro potenziale tossico

<b>Livello di Tossicità</b>	<b>Esempio</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg/kg)</b>
<b>Leggermente tossico (5-15 g/kg)</b>	<b>Etanolo</b>	<b>8.000</b>
<b>Moderatamente tossico (0,5-5 g/kg)</b>	<b>Cloruro di sodio</b>	<b>4.000</b>
	<b>Solfato ferroso</b>	<b>1.500</b>
	<b>Malathion</b>	<b>1.300</b>
	<b>Metanolo</b>	<b>1.000</b>
<b>Molto tossico (50-500 mg/kg)</b>	<b>Acido acetilsalicilico</b>	<b>300</b>
	<b>Acetaminofene</b>	<b>300</b>
	<b>Diazinone</b>	<b>200</b>
	<b>Fenobarbitale</b>	<b>150</b>
	<b>Imipramina</b>	<b>65</b>
<b>Estremamente tossico (5-50 mg/kg)</b>	<b>Teofillina</b>	<b>50</b>
	<b>Difenidramina</b>	<b>25</b>
<b>Super tossico (&lt;5 mg/kg)</b>	<b>Cianuro di potassio</b>	<b>3</b>
	<b>Metotressato</b>	<b>3</b>
	<b>Stricnina</b>	<b>2</b>
	<b>Nicotina</b>	<b>1</b>
	<b>Digossina</b>	<b>0.2</b>
	<b>d-Tubocurarina</b>	<b>0.05</b>
	<b>Tetrodossina</b>	<b>0.01</b>
	<b>TCDD (diossina)</b>	<b>0.001</b>
	<b>Tossina botulinica</b>	<b>0.00001</b>

$$\mathbf{ET}_s(\mathbf{i}/\mathbf{r}) = \mathbf{C}_s(\mathbf{b})_{(t)} * \mathbf{R}_{(n)} * \mathbf{AF}_{(sr)}$$



## 2) La struttura molecolare

La struttura molecolare e quindi le caratteristiche chimico-fisiche condizionano la **tossicocinetica** e la **tossicodinamica**

Per **Tossicocinetica** si intende le variazioni delle concentrazioni tissutali nel tempo della sostanza (tossico). Queste variazioni sono il risultato dei processi di assorbimento, distribuzione, metabolizzazione ed eliminazione della sostanza dall'organismo.

Per **Tossicodinamia** si intendono le modifiche di tipo biochimico che la sostanza tossica determina nell'organismo.

# TOSSICOCINETICA

- Descrive i processi di **assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME)** delle sostanze potenzialmente tossiche.
- L'assorbimento è il processo tramite cui la sostanza penetra nell' organismo dal sito di esposizione (via orale) al sangue (circolazione sistemica).
- La distribuzione è il processo di passaggio dal sangue ai vari organi e tessuti.

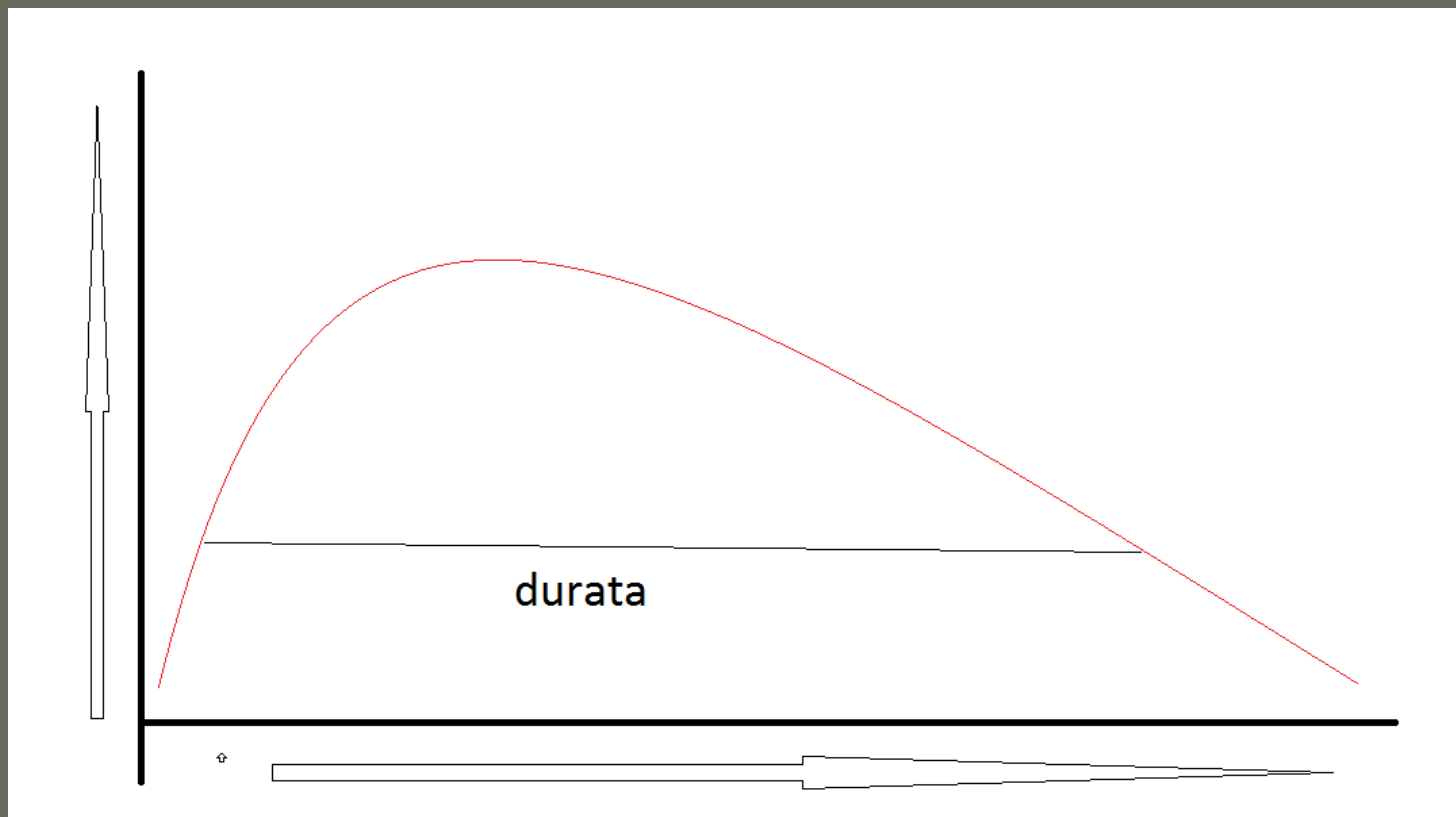
# Relazione tra concentrazione, tempo ed effetto

In genere l'effetto di una sostanza potenzialmente tossica è proporzionale alla sua concentrazione nel sito o nei siti in cui sono presenti "Recettori" (Biofase). Anche il tempo di permanenza nella Biofase è correlabile all'effetto tossico.

- Dato che la concentrazione in un organo è in genere proporzionale alla concentrazione plasmatica, l'effetto tossico è proporzionale a quest'ultima (in genere **misurabile**).
- Per quasi tutti i tossici esiste una concentrazione minima (misurabile), al di sotto della quale non si ha effetto (**osservabile**).



# Il fattore tempo



- Il fattore tempo: la relazione tra la durata dell'effetto di un tossico e la sua permanenza nell'organismo dipende dal meccanismo d'azione.
- Per tossici che agiscono legandosi **reversibilmente** a recettori, l'effetto è condizionato alla presenza nell'organismo (N.B. il danno 'secondario' prodotto può essere irreversibile).
- Per tossici che si legano o alterano **irreversibilmente** i recettori e altre macromolecole biologiche (es. inibitori suicidi; metaboliti reattivi), l'effetto si mantiene anche dopo che il tossico non legato è stato eliminato; l'effetto può essere irreversibile  $\Rightarrow$  meccanismi di riparazione.
- Sostanze che modulano l'espressione genica (legandosi ai recettori per i fattori di crescita e i recettori intracellulari): il loro effetto perdura anche dopo che la sostanza è stata eliminata.

# Diffusione degli xenobiotici nell'organismo

- Il movimento degli **xenobiotici** nei fluidi biologici e attraverso le membrane biologiche avviene **principalmente** per diffusione (passiva).
- Il passaggio attraverso le membrane è il passaggio limitante la velocità di diffusione globale. La diffusione avviene secondo la **legge di Fick**:
  - Flusso molare (moli/sec) =  $(c_1 - c_2) \times D \times A/d$
  - $c_1 - c_2$  = gradiente di concentrazione (moli/l)
  - $D$  = coefficiente di diffusione ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )
  - $A$  = area (della membrana) ( $\text{cm}^2$ )
  - $d$  = spessore (della membrana) (cm)



# Lipofilia

- Essendo le membrane biologiche composte principalmente da lipidi, esse sono attraversate tanto più velocemente tanto più elevato è il coefficiente di ripartizione lipidi/acqua, ovvero tanto più elevata è la 'lipofilia'.
- Dato che non è sperimentalmente attuabile determinare il coefficiente di ripartizione membrana/acqua, si è cercato di utilizzare, per predire la velocità relativa di passaggio attraverso le membrane, i coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua o olio di oliva/acqua.
- In pratica, è possibile solo descrivere in modo qualitativo, e approssimativo, la dipendenza della velocità di passaggio dalla 'lipofilia' del composto.

- Molecole ‘molto poco lipofile’ (con coefficiente di ripartizione ‘molto’ basso) hanno una capacità ‘trascurabile’ di attraversare le membrane. Questi composti possono essere ‘altamente’ idrofili (es. sali, polioli) oppure essere ‘praticamente’ insolubili sia nei lipidi che in soluzioni acquose (es. molti **peptidi e proteine**).
- Per molecole estremamente lipofile il fattore limitante è la solubilità nelle soluzioni acquose; queste molecole possono accumularsi nello strato lipidico delle membrane.
- In definitiva, la maggiore velocità di passaggio attraverso le membrane si ha con molecole lipofile ma con un certo grado di idrofilia (es. paracetamolo).

# DISTRIBUZIONE

---

- La distribuzione è quel processo che permette alla sostanza una volta assorbita di raggiungere i vari distretti dell'organismo in concentrazioni e in tempi diversi.



# Fattori che condizionano la distribuzione

- peso molecolare
- caratteristiche chimico-fisiche della sostanza
- legame alle proteine plasmatiche
- perfusione tissutale
- composizione dei tessuti
- presenza di barriere
- condizioni del soggetto

# Perfusione tissutale

- **Alta**

polmoni

reni

fegato

cuore

cervello

- **Media**

cute

muscolo (a riposo)

- **Minima**

adipe

connettivo

## Legame alle proteine (debole, prontamente reversibile) \*

- Albumina

Composti debolmente acidi

- Globuline

Composti debolmente basici

Transcortina **ad es.** corticosteroidi, tiroxina, vit. B<sub>12</sub>

- Lipoproteine **ad es.** steroidi, vit. A e D, ciclosporina, chinidina, alcuni pesticidi

\* eccezionalmente addotti covalenti (es per alcuni farmaci betalattamici, captoprile, e penicillamina; legami disolfuro).

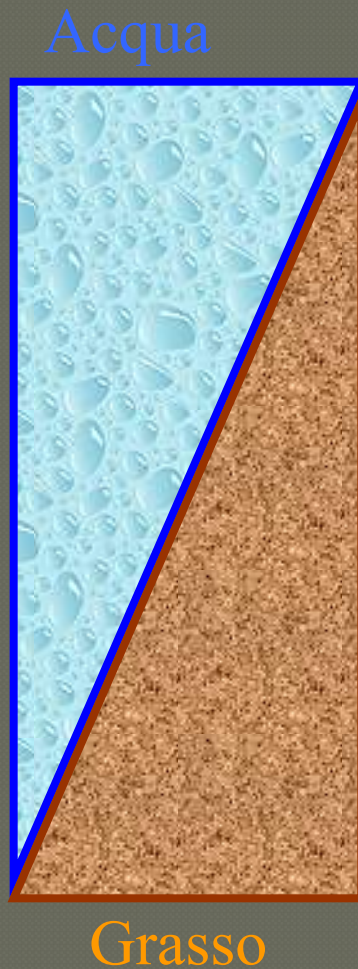


**Sostanze altamente liposolubili sono presenti in concentrazioni maggiori a tessuti meno irrorati ma a maggiore capacità ritentiva**

### Siti di accumulo

- Cheratina (griseofulvina, arsenico)
- Fegato (metalli pesanti, vit. B<sub>12</sub>)
- Rene (metalli pesanti, aminoglicosidi)
- Adipe (steroidi, pesticidi)
- Tessuto osseo (bifosfonati, piombo, stronzio)

# Composizione dei tessuti



Neonato

Bambino

Adolescente

Adulto

Anziano

Anziano-anziano

$$\mathbf{ET}_s(\mathbf{i}/\mathbf{r}) = \mathbf{C}_s(\mathbf{b})_{(t)} * \mathbf{R}_{(n)} * \mathbf{AF}_{(sr)}$$



## **XENOBIOTICI**

**Composti estranei all'organismo:** Contaminanti ambientali assorbiti attraverso la pelle, i polmoni o **introdotti con l'alimentazione**

Prodotti chimici industriali (pesticidi, inquinanti)

Prodotti di pirolisi della cottura dei cibi

Alcaloidi (sostanze azotate prodotte nelle piante a partire da aminoacidi aromatici)  
metaboliti secondari delle piante

Tossine prodotte da funghi, piante, animali

Farmaci

**Gli xenobiotici sono spesso SOSTANZE LIPOFILICHE**

# Il metabolismo

- Per **metabolismo** intendiamo le trasformazioni (chimiche) a cui va incontro lo xenobiota, una volta assorbito, ad opera di enzimi appartenenti al corredo genico dell'organismo.
- La **degradazione** (o **metabolismo presistemico**) è invece una trasformazione chimica operata e da enzimi non appartenenti al corredo genico dell'organismo oppure operata da agenti chimico-fisici.

## Perché vengono metabolizzati?

- Il metabolismo fa sì che i prodotti del metabolismo (metaboliti) siano idrosolubili (eliminabili con l'urina).
- Gli enzimi metabolizzanti sono in genere poco specifici, metabolizzano cioè molti substrati diversi (ma con un dominio strutturale comune).
- Alcuni enzimi sono deputati solo al metabolismo dei xenobiotici, altri sono coinvolti anche nella sintesi o metabolismo di composti endogeni.
- L'organo più ricco di enzimi metabolizzanti è il fegato. Altri organi o tessuti con significativa capacità metabolica sono i polmoni, i reni, il sangue.
- Alcuni tessuti hanno un'elevata concentrazione di enzimi metabolizzanti (mucosa nasale, cristallino), ma il loro contributo al metabolismo sistemico è pressoché nullo dato il loro piccolo volume.



# Principali reazioni metaboliche

Principio attivo

Reazioni di fase I  
OSSIDAZIONE  
RIDUZIONE  
IDROLISI

Metaboliti di fase I

-OH  
-COOH  
-NH<sub>2</sub>  
-SH

Reazioni di fase II  
CONIUGAZIONE

Metaboliti coniugati

ELIMINAZIONE

ELIMINAZIONE

# BIOTRASFORMAZIONE degli XENOBIOTICI

**ASSORBIMENTO**

**METABOLISMO**

**E  
L  
I  
M  
I  
N  
A  
Z  
I  
O  
N  
E**

**Fase I**

**Fase II**

Xenobiotico

Coniugato

Xenobiotico

Metabolita  
con attività diversa

Coniugato

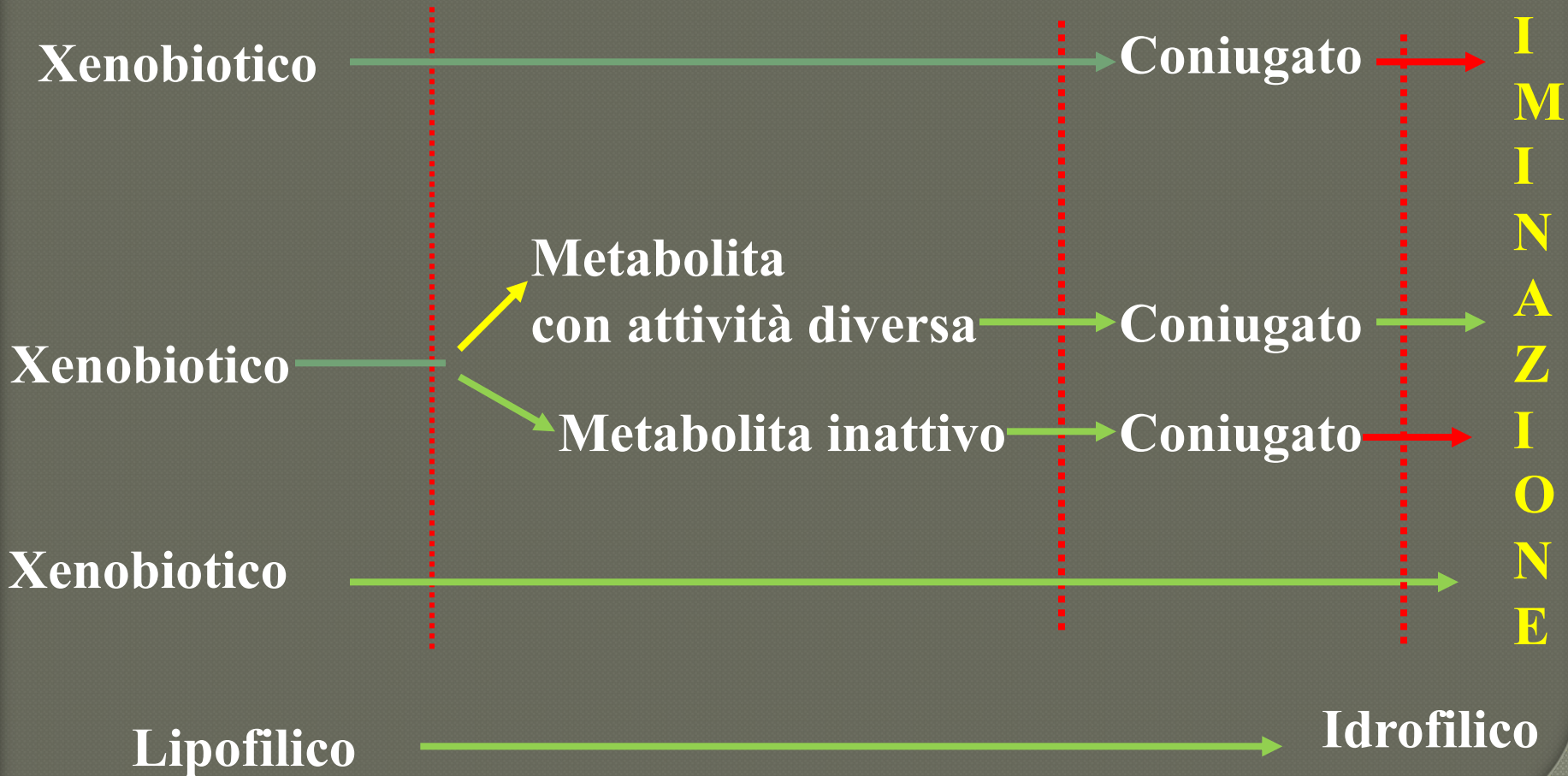
Metabolita inattivo

Coniugato

Xenobiotico

Lipofilico

Idrofilico



# Reazioni di fase I o di funzionalizzazione

- Sono le reazioni di idrolisi, riduzione, **ossidazione**.
- Portano in genere all'introduzione o smascheramento di un gruppo nucleofilo (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH).
- Ciò causa solo un modesto aumento dell'idrofilia. Tuttavia, il gruppo funzionale nucleofilo fornisce un punto di attacco per le reazioni di fase II.
- Le reazioni di fase I determinano **in genere** perdita dell'attività tossicologica (modificazione della struttura chimica e della capacità di interagire con il recettore). In alcuni casi, tuttavia, i prodotti delle reazioni di fase I sono biologicamente attivi. **I pro-farmaci sono attivati dalle reazioni di fase I.**
- Nelle reazioni di fase I, soprattutto le reazioni di ossidazione, si possono formare metaboliti tossici.



Molti xenobiotici (dotati o meno di attività propria) sono trasformati in composti potenzialmente tossici dal metabolismo  $\Rightarrow$  **bioattivazione**; es.: benzene, IPA, idrocarburi alogenati, aflatossine.

- ① I metaboliti tossici possono essere ulteriormente metabolizzati, con formazione di composti non tossici (detossificazione)

- Il metabolismo degli xenobiotici è estremamente importante in Tossicologia, poiché può avere sia un effetto protettivo (eliminazione e/o detossificazione dello xenobiotico) sia un effetto dannoso (formazione di metaboliti tossici).

# **Metabolizzazione e/o detossificazione**

**La detossificazione esprime il concetto di difesa endogena sia verso gli xenobiotici sia verso i farmaci (la stragrande maggioranza xenobioti)**



## **c<sub>1</sub>) Detossificazione delle sostanze xenobiotiche**

**La metabolizzazione di uno xenobiotico avviene in 2 fasi:**

**1) Enzimi della fase I**

**2) Enzimi della fase II**

**1) Gli enzimi della fase I producono una biotrasformazione, alterando la fisionomia chimico-fisica del composto attraverso l'aggiunta o l'eliminazione di gruppi funzionali (funzionalizzazione), in modo che il metabolita sia piu' idoneo a reagire con gli enzimi di coniugazione della fase II**

# Enzimi del metabolismo degli xenobiotici

<b>Tipi di reazioni</b>	<b>Enzima</b>
<b>Fase I</b> <b>Ossidazione</b>	<b>Citocromo P450</b> <b>Alcol deidrogenasi</b> <b>Aldeide deidrogenasi</b> <b>Monossigenasi flaviniche</b> <b>Monoaminossidasi</b>
<b>Riduzione</b>	<b>Chinone reductasi (DT diaforasi)</b> <b>Citocromo P450 reductasi</b>
<b>Idrolisi</b>	<b>Epossido idrolasi</b>
<b>Fase II</b> <b>Coniugazione</b>	<b>UDP glucuronil transferasi</b> <b>Solfotransferasi</b> <b>N-acetil transferasi</b> <b>Metiltransferasi</b> <b>Coniugazione con amminoacidi</b> <b>Glutathione transferasi</b>

# **METABOLISMO O BIOTRASFORMAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE (XENOBIOTI)**

- Le reazioni chimiche con le quali si attua il metabolismo delle sostanze tossiche esogene sono:

**OSSIDAZIONE**

**RIDUZIONE**

**IDROLISI**

**FASE I (Citocromo P450)**

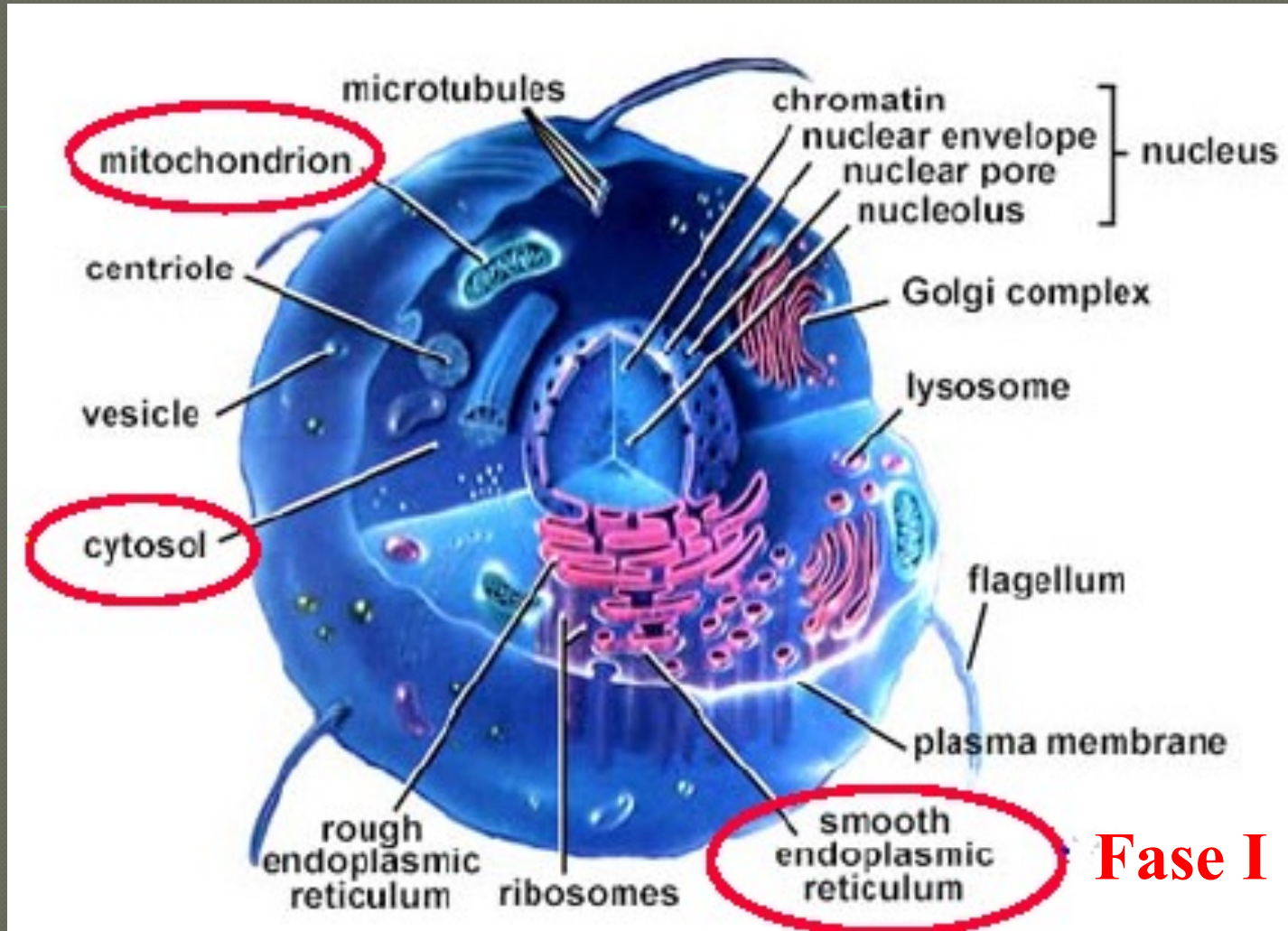
**CONIUGAZIONE**

**FASE II**

- Individui con patologie epatiche possono avere dei problemi di metabolizzazione.



**Fase I**



**Fase II**

**Gli enzimi della fase I predominano nel reticolo endoplasmatico liscio (microsomi), quelli della fase II nel citosol**

# **METABOLISMO O BIOTRASFORMAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE (XENOBIOTI)**

- **Le caratteristiche lipofile, che promuovono il passaggio di queste sostanze attraverso le membrane biologiche e il conseguente accesso ai siti d'azione, ostacolano la loro eliminazione dall'organismo.**
- **La biotrasformazione degli xenobioti ha un'importanza fondamentale per la cessazione della loro attività biologica e per l'eliminazione dall'organismo.**
- **Generalmente le reazioni di biotrasformazione danno origine a composti più polari, metaboliti inattivi che vengono più facilmente escreti dall'organismo.**



## **Reazione di fase I**

**Molti xenobiotici di interesse tossicologico sono composti lipofili, assorbiti dal tratto gastroenterico, dal tratto respiratorio e dalla cute che tendono a depositarsi nei tessuti, specialmente ricchi di lipidi**

**Le principali reazioni di fase I sono:**

- 1) Ossidazione**
- 2) Riduzione**
- 3) Idrolisi**
- 4) Idratazione**

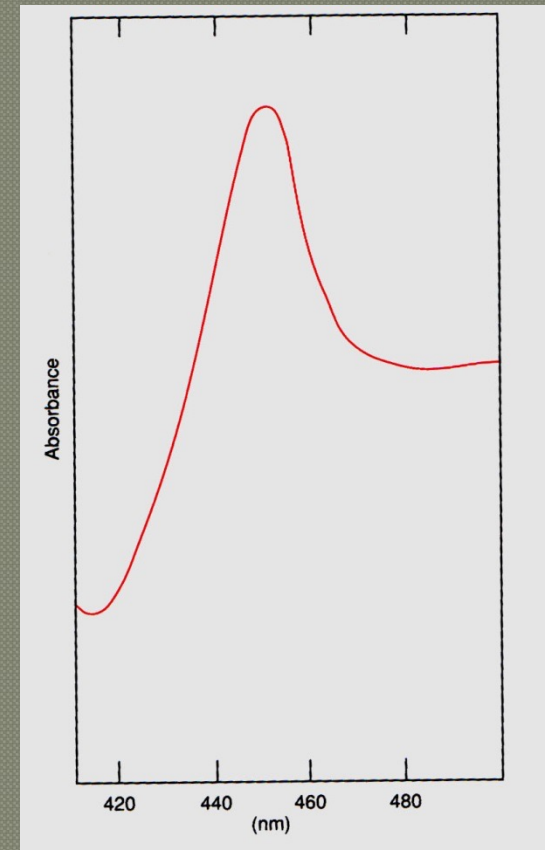


# SISTEMA CITOCROMO P450 MONOOSSIGENASI

- E' costituito da proteine di membrana, contenenti un gruppo **eme**, localizzate nel reticolo endoplasmatico liscio, prevalentemente a livello epatico. Producono una caratteristica banda di assorbimento spettrofotometrico a **450 nM**.



Il Cyt P450  
assorbe a 450 nm  
quando il Ferro è  
nello stato  
ridotto (Fe<sup>2+</sup>)  
e legato al CO  
(monossido di  
carbonio)



# SISTEMA CITOCROMO P450 MONOOSSIGENASI

---

- La famiglia del gene P450 (CYP) si è differenziata (in miliardi di anni) garantendo il metabolismo di un numero sempre crescente di composti chimici ambientali, tossine alimentari, farmaci.
- La superfamiglia di enzimi che ne è derivata catalizza una varietà enorme di reazioni (ossidazione, riduzione) nei confronti di diversi substrati, differenti dal punto di vista chimico.
- A seconda della somiglianza nella catena di aminoacidi gli isoenzimi sono raggruppati in famiglie e subfamiglie. Attualmente nell'uomo conosciamo 18 famiglie di CYP450, con 42 sottofamiglie e 57 geni codificanti.

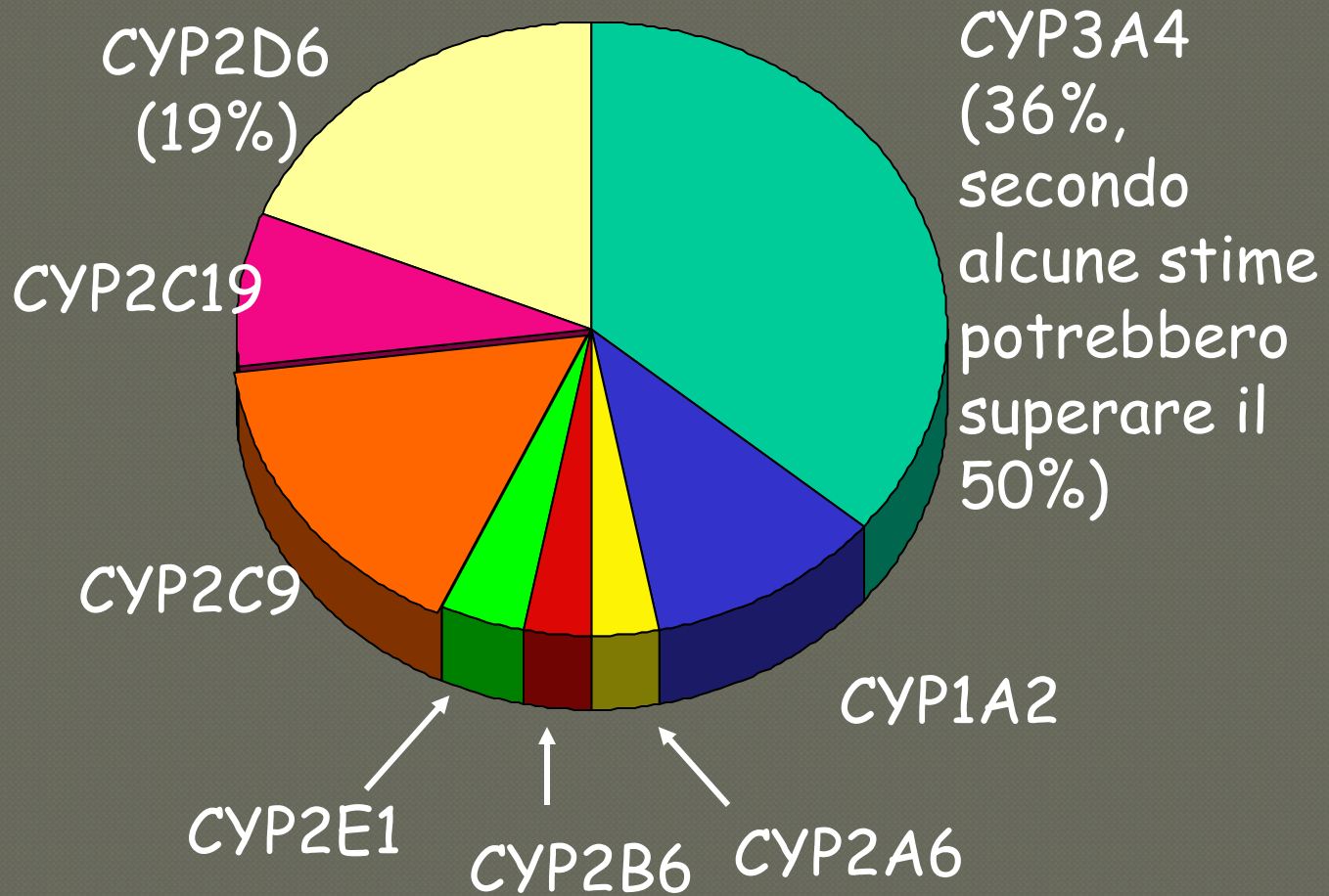
# Nomenclatura dei citocromi P450, esempio: CYP2D6

- **CYP** = citocromo P450
- **2** = famiglia
- **D** = sub-famiglia
- **6** = specifico isoenzima (specifico gene)

La nomenclatura è basata sui geni e non ha implicazioni funzionali



# Percentuale dei farmaci metabolizzati dagli enzimi appartenenti alla classe del citocromo P450



# Reazione catalizzata dal P450

Il citocromo P450 è una ossidasi a funzione mista (monossigenasi)



**X = Substrato**

# SUBSTRATI DEL CITOCROMO P450

---

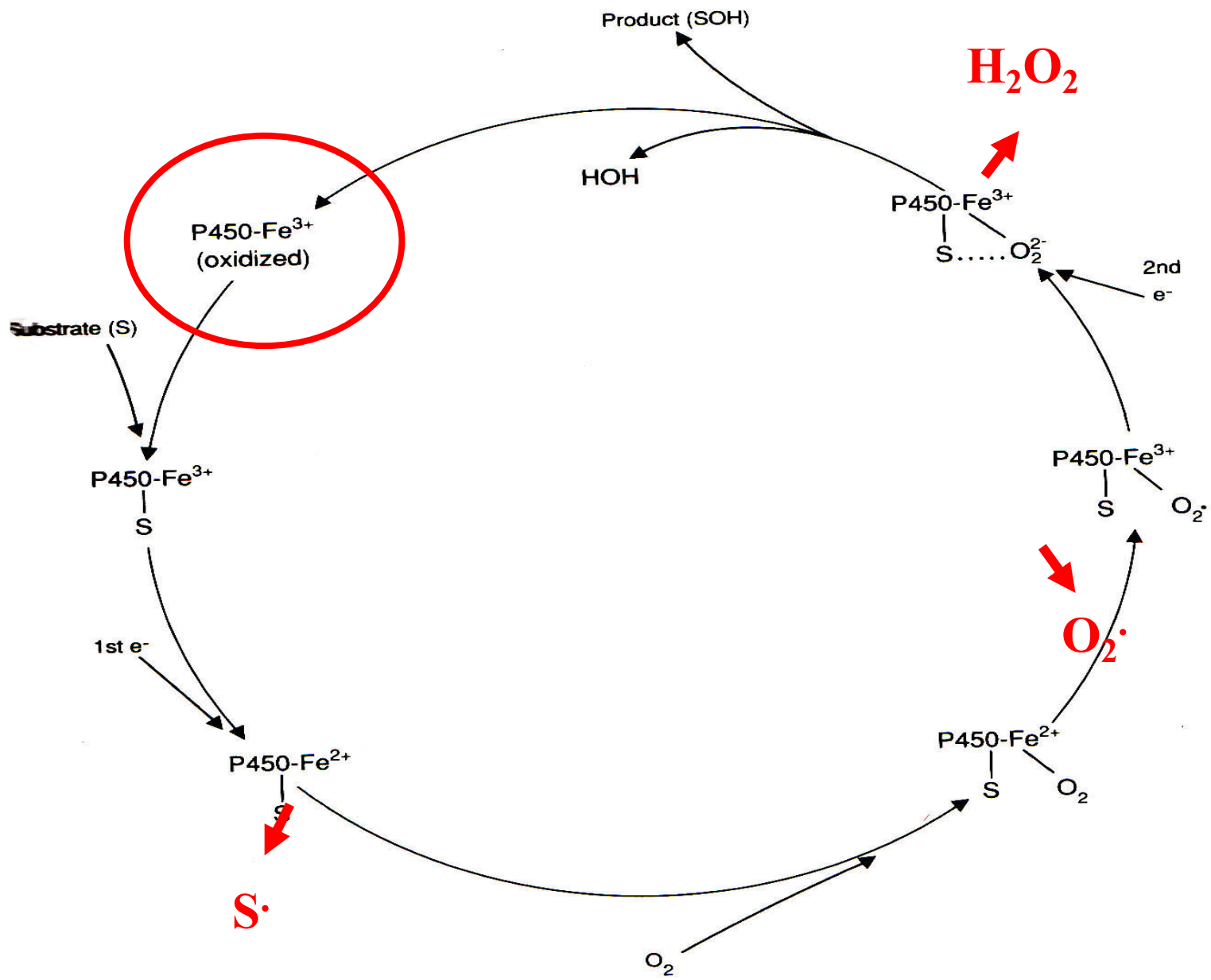
## Xenobiotici

Farmaci, inclusi antibiotici  
Carcinogeni  
Antiossidanti  
Solventi  
Anestetici  
Coloranti  
Pesticidi  
Derivanti del petrolio  
Alcol  
Odori

## Composti di origine fisiologica

Colesterolo, Steroidi  
Eicosanoidi (leucotrieni, prostaglandine)  
Acidi grassi  
Idroperossidi dei lipidi  
Retinoidi (vitamina A)  
Acetone



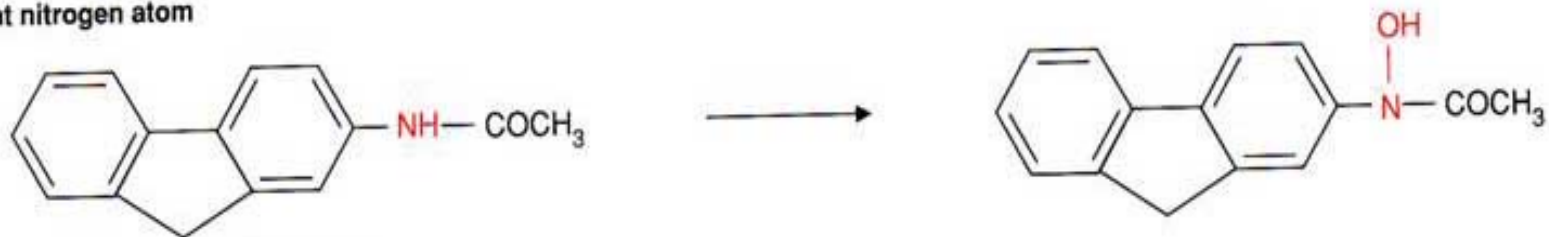


## Xenobiotici metabolizzati dal citocromo P450

<b><i>Reazione</i></b>	<b><i>Esempi</i></b>
<b>Ossidrilazione comp. alifatici</b> <b>Ossidrilazione comp. aromatici</b> <b>Formazione di epossidi</b> <b>Dealchilazioni ossidative</b> <b>Deaminazione ossidativa</b> <b>Ossidazione di N o S o P</b> <b>Rimozione di alogeni</b> <b>Ossidazione di alcoli</b>	<b>Acido valproico, pentobarbital</b> <b>Benzopirene, fenobarbital</b> <b>Benzene, benzopirene</b> <b>Fenacetina, morfina, caffeina</b> <b>Anfetamina</b> <b>Cloropromazina, paracetamolo</b> <b>Alotano</b> <b>Alcol etilico</b>
<b>Riduzione (bassa [O<sub>2</sub>])</b>	<b>Alotano, CCl<sub>4</sub></b>

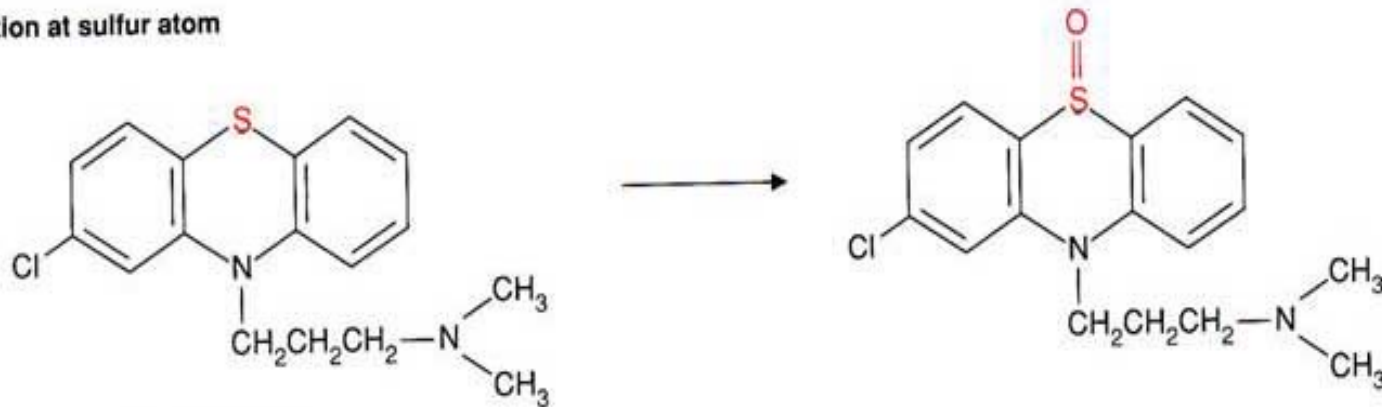
# REAZIONI DI OSSIDAZIONE

Oxidation at nitrogen atom



2-Acetylaminofluorene

Oxidation at sulfur atom



Chlorpromazine

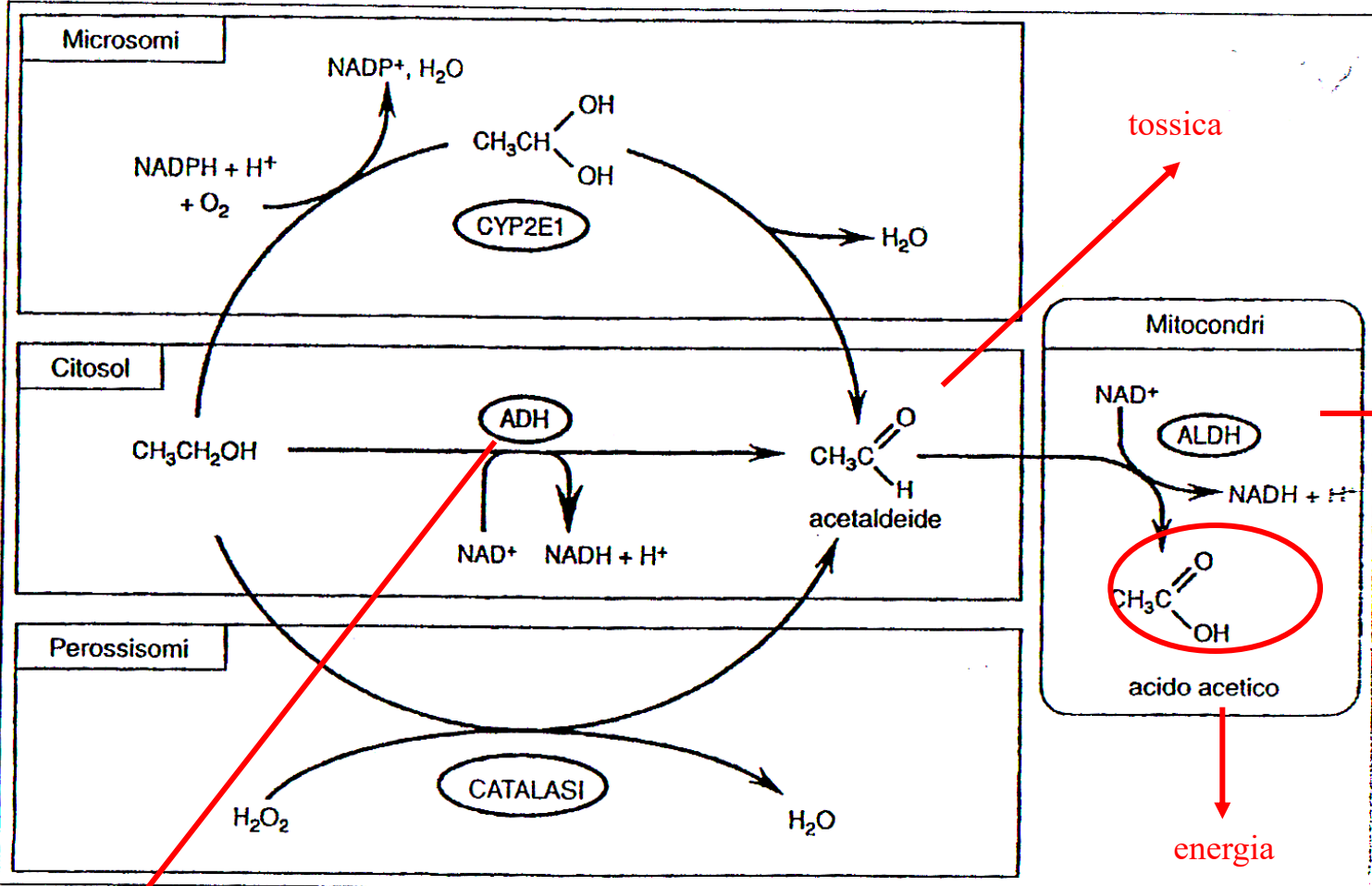
Oxidation at phosphorus atom



Parathion

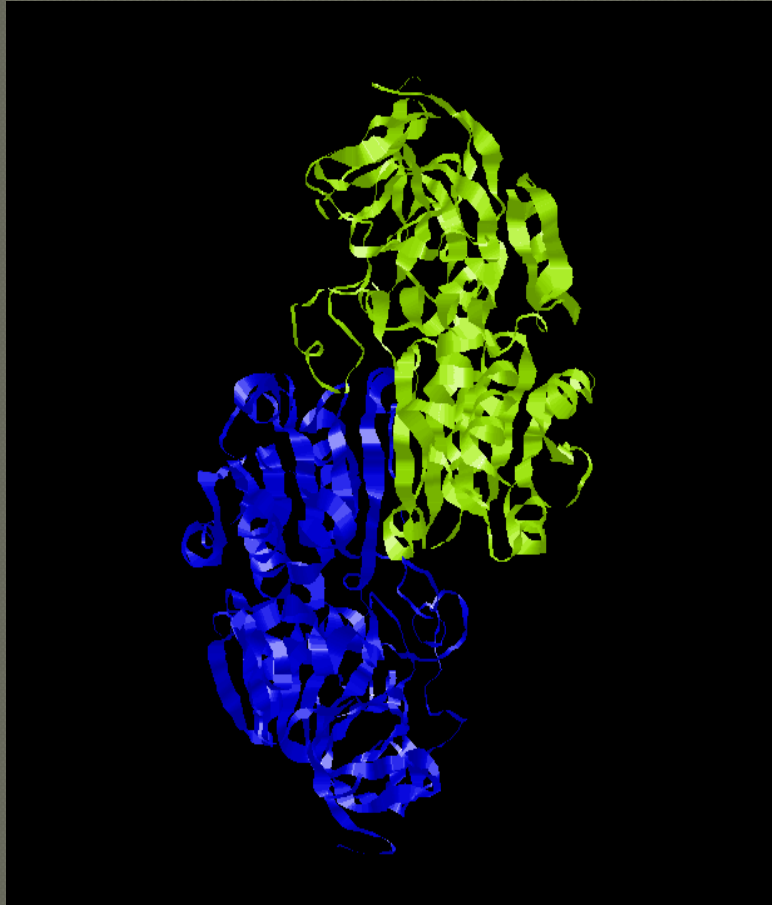


# Metabolismo dell'etanolo



Alcol deidrogenasi

Aldeide deidrogen



### **Alcol deidrogenasi:**

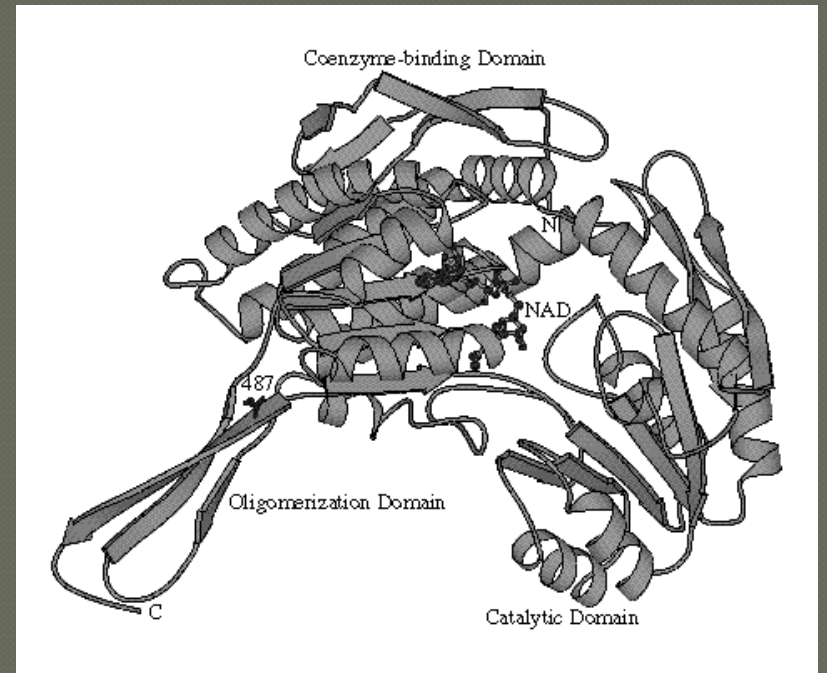
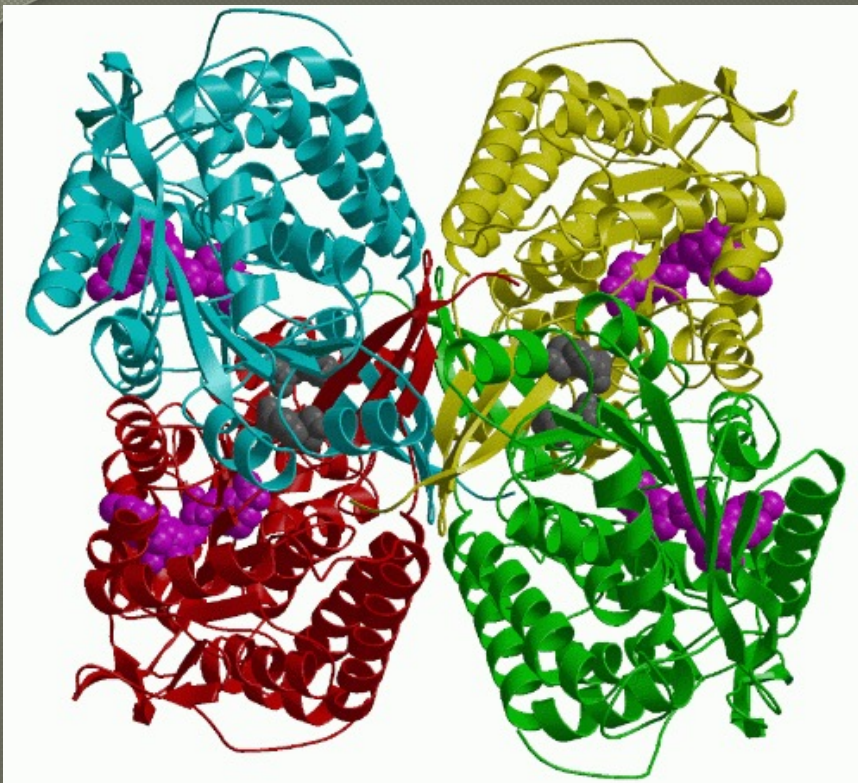
enzima dimerico, citosolico,  
contenente Zn

5 geni ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\pi$ ,  $\kappa$ ).  $\beta$  ha 3  
alleli,  $\gamma$  2 alleli

Quindi 8 subunità diverse che  
si combinano  
a formare isoenzimi con  
diversa efficienza  
catalitica. La subunità  $\beta$  è  
molto attiva.

**Gli isoenzimi presenti nelle popolazioni  
asiatiche sono molto efficienti.**





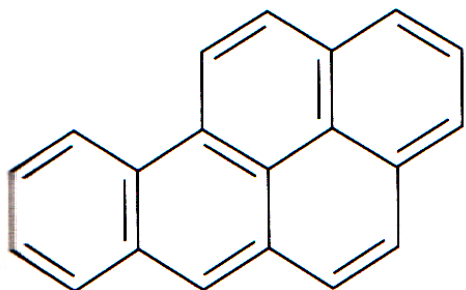
**Aldeide deidrogenasi (16 geni, famiglia di proteine)**

**Allele di classe 2: basso metabolismo delle aldeide,  
fattore di rischio per il cancro indotto da alcol**

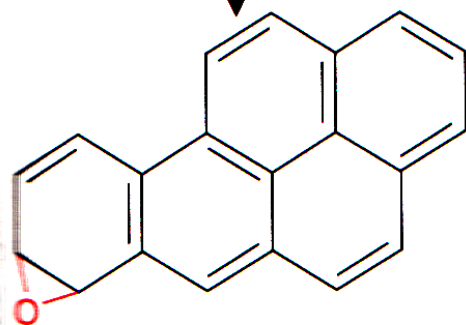
**Nelle popolazioni orientali: intolleranza all'alcol (vasodilatazione,  
“flushing syndrome”).**



Benzo[a]pyrene

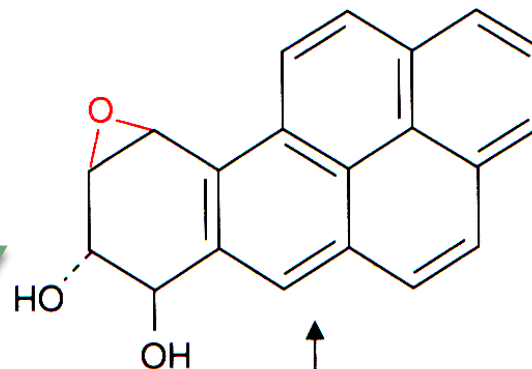


P450  
 $O_2$

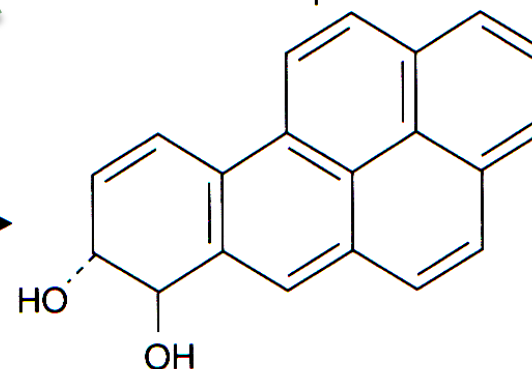


Benzo[a]pyrene-7,8-epoxide

Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide



P450  
 $O_2$



Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol

epoxide  
hydrolase

**cancerogeno**



## Induttori del P450: appartengono a 5 classi, con diverso meccanismo d'azione

- 3-metilcolantrene, benzopirene, diossina, fumo, alimenti cotti a carbone, crocifere → CYP1A1, CYP1A2
- Fenobarbital, DTT → CYP2B1, CYP2B2
- Isoniazide, etanolo → CYP2E1
- Steroidi, antibiotici → CYP3A1, CYP3A2
- Clofibrato, plastificanti → CYP4A1, CYP 4A2, CYP4A3

**2) Gli enzimi della fase II catalizzano reazioni biosintetiche che richiedono energia per essere espletate e sono situati nel citoplasma**

**Queste reazioni convertono sostanze esogene o endogene in composti di PM piu' elevato, provvisti di gruppi idrofili e piu' facilmente eliminabili con le urine, la bile ed altri meccanismi.**

**Composti endogeni usati per le reazioni di coniugazione sono:**

**1) l' acido glucuronico**

**2) i solfati**

**3) gli aminoacidi**

**4) i gruppi acetili**

**5) il glutatione**



**Il glutathione ridotto (GSH) ha un ruolo di primaria importanza nella detossificazione**

**E' un tripeptide endogeno presente nel citoplasma e nei mitocondri (concentrazioni millimolari) composto da 3 AA:**

**1) acido glutammico**

**2) cisteina**

**3) glicina**

**G S H**



**Il GSH intracellulare interviene nella neutralizzazione di composti di origine endogena ed esogena in reazioni catalizzate dalla GSH-S-transferasi coniugati corrispondenti**

**La GSH-S-transferasi catalizza la reazione del sulfidrilico nucleofilo del glutatione con il composto contenente un atomo di carbonio elettrofilo**

**La GSH-S-transferasi è ubiquitaria con massima attività nel fegato, rene, surrene, intestino e testicoli**

## **GSH**

**I coniugati vengono trasportati fuori dalla cellula e diventano substrati delle gamma-glutamyl-transpeptidasi (GGTP) che sono sulla porzione esterna della membrana cellulare e che distaccano l'acido glutammico**

**Si forma così un dipeptide legato alla sostanza xenobiotica che ritorna nella cellula legata alla cisteina**

**Nella cellula la sostanza viene acetilata (sintesi mercapturica) e definitivamente allontanata dall'organismo per l'ultima escrezione con le feci e le urine**



Attraverso l'azione della GSH-S-trasferasi, il GSH interviene nella neutralizzazione di composti elettrofilici generati dal metabolismo di sostanze a larga diffusione (idrocarburi alogenati, paraquat, paracetamolo, morfina) che, a dosi non tossiche, producono una quantità di metabolita che può essere detossificata dal sistema GSH → addotti inerti

Quando la dose dei suddetti campioni è elevata, o quando c'è una forte induzione delle monoossigenasi epatiche, il GSH si consuma ed il metabolita non più sufficientemente neutralizzato, è libero di compiere l'arilazione delle proteine cellulari → effetti citotossici

**Altri sistemi enzimatici che operano “sintesi protettive”:**

- 1) la glicuronil transferasi che catalizza le reazioni di glucurono-coniugazione legando l' acido glicuronico a gruppi funzionali di solito alcoolici o carbossilici**
- 2) la metil-transferasi che opera la metilazione**
- 3) gli enzimi coniuganti la glicina, la glutammina e la taurina con la formazione di peptidi**
- 4) le solfo e acetil transferasi: generano rispettivamente solfati e composti acetilati**
- 5) la rodanasi: detossifica il cianuro catalizzando la sintesi di tiocianati a partire dal tiosolfato**

## **c<sub>2</sub>) Detossificazione dei radicali liberi**

### **I sistemi enzimatici**

**Gli effetti biologici dei radicali liberi sono controllati da un vasto schieramento di meccanismi biologici di difesa di tipo enzimatico e non enzimatico**

**Le cellule eucariote hanno due distinte superossido-dismutasi (SOD):**

- 1) una contenente zinco e rame situata nel citoplasma**
- 2) una contenente manganese situata nei mitocondri**



**Questi enzimi neutralizzano l' anione superossido ( $O_2^-$ ) operando la dismutazione di 2 molecole di superossido con la formazione di perossido di idrogeno e una molecola di ossigeno**



**Il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) è successivamente detossificato, per intervento della catalasi e della glutazione prossidasi, ad  $H_2O$**

**La definizione della tossicità di una sostanza risulta da una somma di informazioni che riguardano il suo profilo tossicologico integrato**

**Numerose sono le variabili capaci di modificare la reattività farmaco-tossicologica per cui valutare l'effetto tossico di una sostanza in un organismo partendo da dati sperimentali tossicologici può essere difficile e rischioso**

**Da qui deriva la necessità di estrapolare dai dati sperimentali il livello o il tipo di tossicità nell'uomo**

**Sui dati estrapolati, si basano le autorità sanitarie per fissare i limiti d' accettazione dell'esposizione ad un tossico nella popolazione**

# Capacità metaboliche in funzione della specie

---

○ Topo	66
○ Ratto	40
○ Coniglio	34
○ Gatto	27
○ Quaglia	25
○ Cane	23
○ Ovino	22
○ Suino	15
○ Bovino	12
○ Trota	10

Grammi di fegato/kg p.c.



● Ratto	223
● Cane	212
● Gatto	209
● Quaglia	205
● Topo	200
● Coniglio	185
● Trota	174
● Ovino	128
● Suino	113
● Bovino	98

Proteine in mg/g di fegato

- **Topo** **801**
- **Coniglio** **565**
- **Ratto** **528**
- **Gatto** **449**
- **Cane** **184**
- **Ovino** **165**
- **Trota** **103**
- **Quaglia** **84**
- **Bovino** **72**
- **Suino** **58**

**Citocromo P-450 nmoli/mg di proteina**

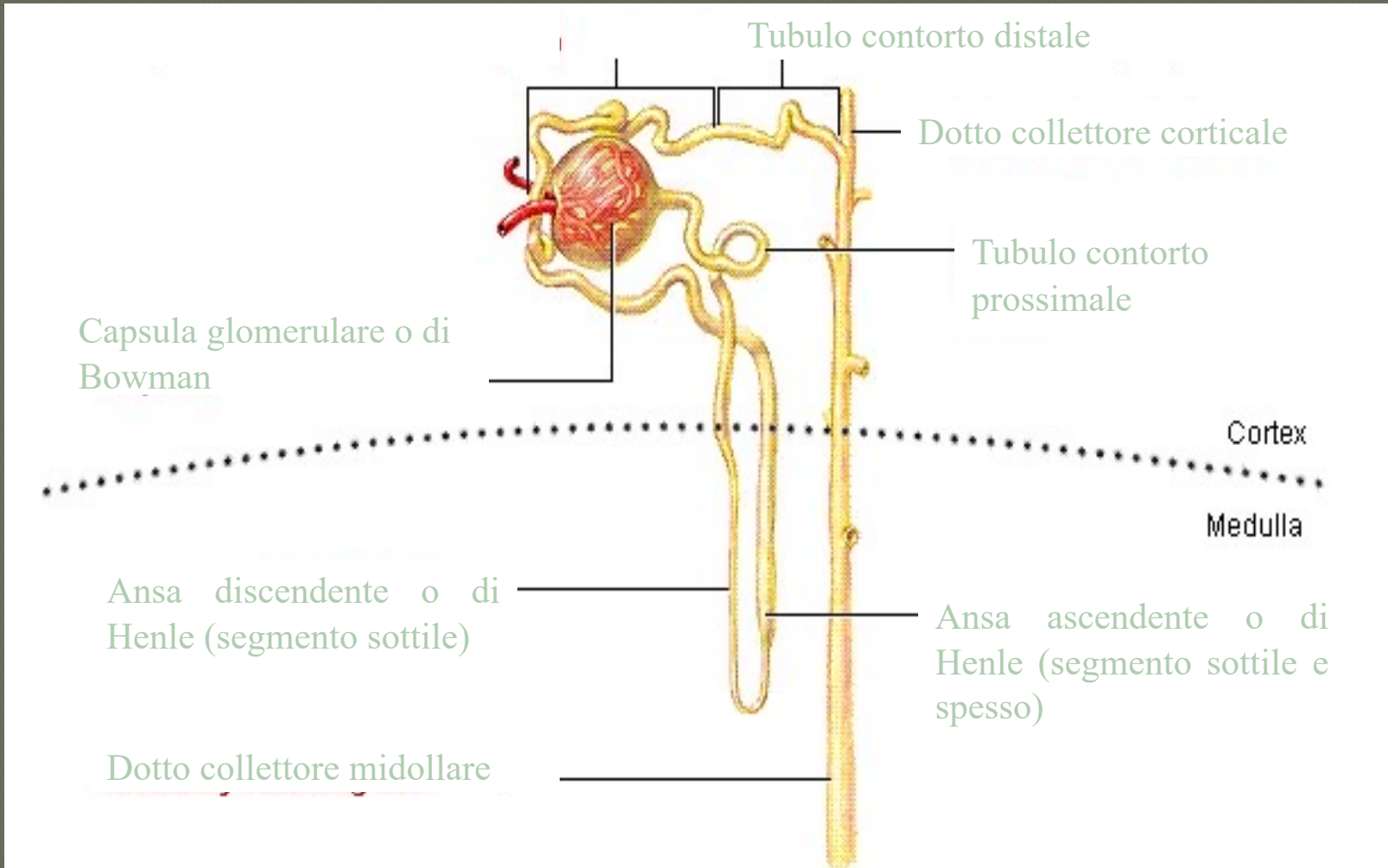
## Citocromo P-450 $\mu\text{moli/kg p.c.}$

- **Topo** **10.537**
- **Ratto** **4.757**
- **Coniglio** **3.606**
- **Gatto** **2.533**
- **Cane** **905**
- **Ovino** **477**
- **Quaglia** **444**
- **Trota** **192**
- **Suino** **101**
- **Bovino** **88**

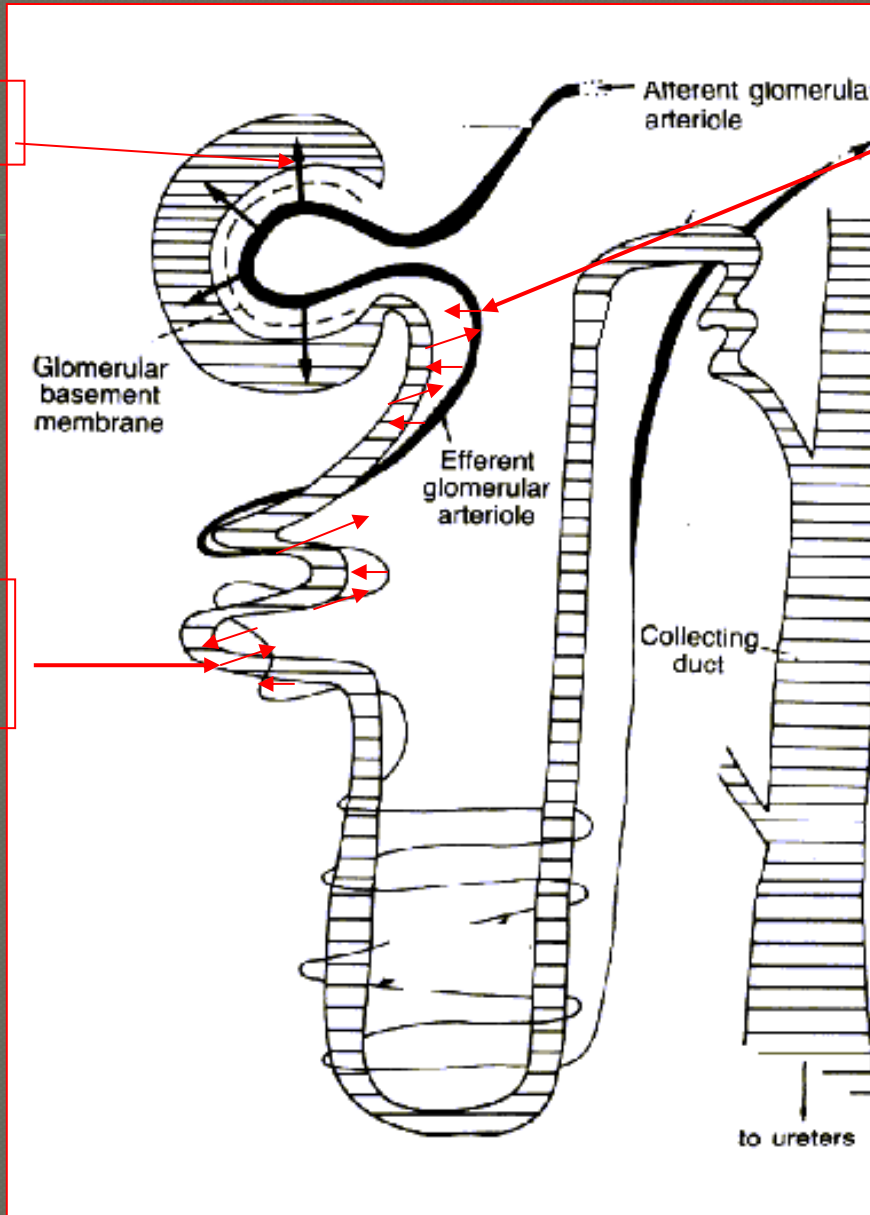


# **Vie di eliminazione degli xenobioti**

# Il Nefrone



Xenobiota filtrato



Secrezione attiva  
alcuni tossici

Riassorbimento  
di alcuni xenobioti

Flusso sangue nel rene  
normale: 1500ml/min

Filtrazione  
glomerulare  
normale: 100ml/min



# ELIMINAZIONE DEGLI XENOBIOTI PER VIA RENALE

- 1) Le sostanze **liposolubili** tendono ad essere escreti a concentrazioni simili a quelle presenti nel plasma. La loro concentrazione dipende soprattutto dal volume delle urine
- 2) Le sostanze **polari** tendono ad essere escreti nelle urine a concentrazioni superiori a quelle presenti nel plasma , quindi la loro escrezione dipende più dal volume del filtrato glomerulare che dal volume delle urine
- 3) I composti **coniugati** si comportano in maniera simile alle sostanze polari, ma possono essere escreti in misura maggiore perché soggetti a meccanismi di secrezione attiva
- 4) I composti che **si ionizzano** facilmente, cioè acidi e basi, vengono escreti in maniera pH dipendente

# CLEARANCE

Quantità di plasma che in un minuto viene depurata da una sostanza

$$\text{CLEARANCE (ml/min)} = \frac{U \times V}{P}$$

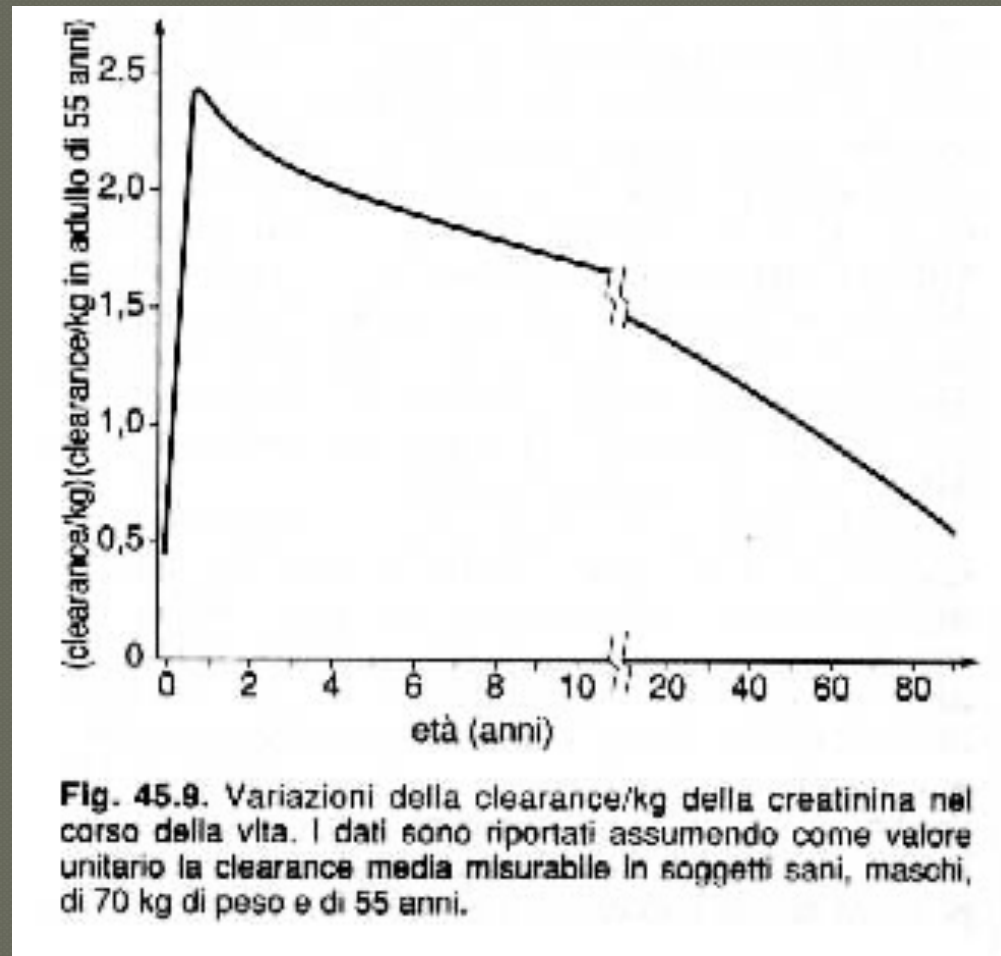
U = Concentrazione della sostanza nell'urina

V = Volume urina in 1 min.

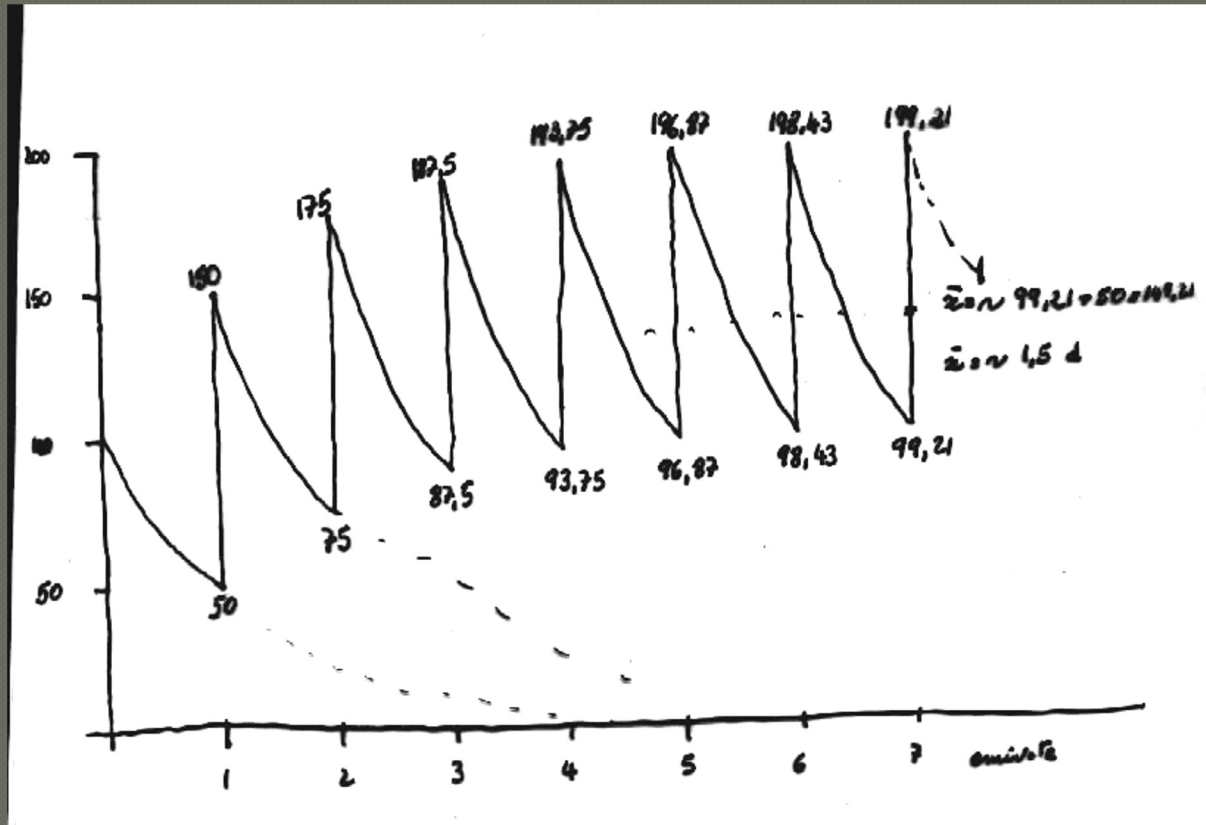
P = Concentrazione della sostanza nel plasma

## Variazioni della clearance renale

La capacità di eliminazione (clearance) del rene varia con l'età. E' bassissima alla nascita ma è poi molto alta nella prima infanzia fino a scendere gradualmente nell'età adulta. (vedi figura)

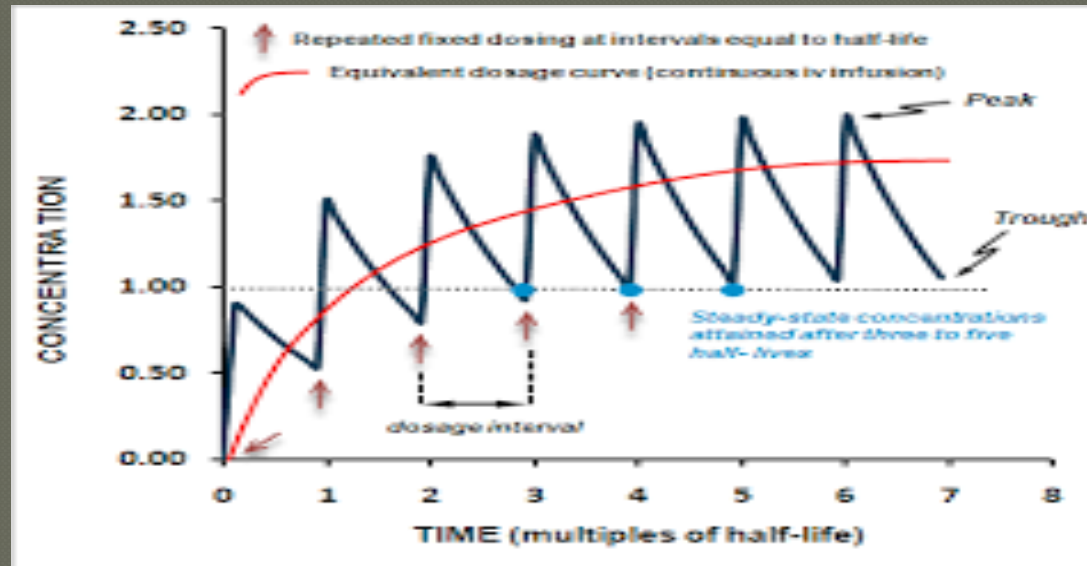


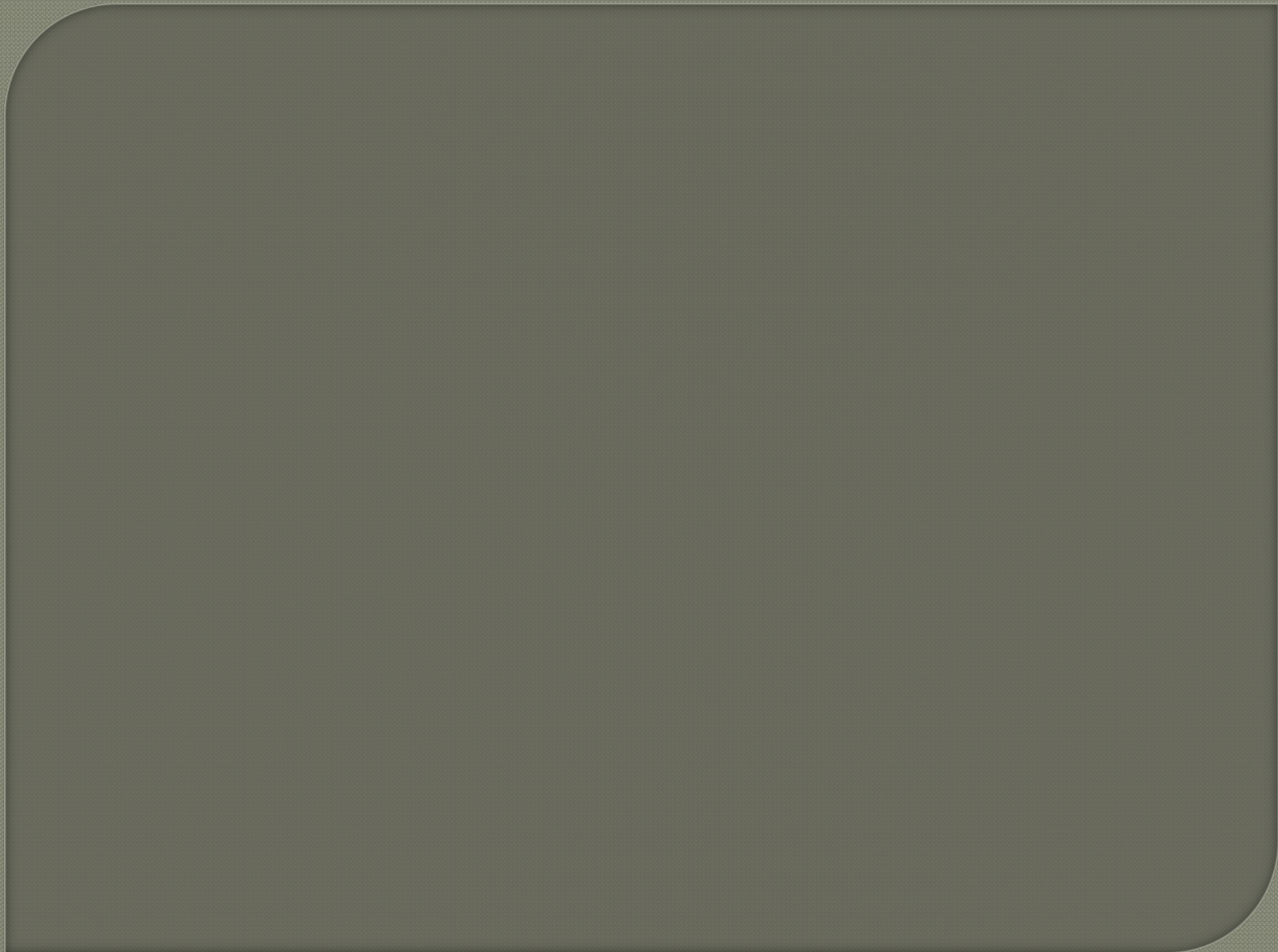




E' importante ricordare che l'eliminazione delle sostanze prevede che sia eliminata una percentuale (e non una quantità) fissa nell'unità di tempo. Quindi man mano che le dosi e gli avanzi delle precedenti si sommano tra loro, aumenta la quantità di sostanza che viene eliminata.

In situazioni di assunzioni costanti (dose e tempo) si può dimostrare che avremo un momento in cui la quantità di sostanza che viene eliminata è pari alla quantità della stessa che viene assunta.







L'accumulo che si ha assumendo ripetutamente una sostanza residuale dipende da quanto ne rimane dopo una singola assunzione (quindi dall'emivita), alterazioni dei processi di eliminazione/metabolizzazione della sostanza dovuti ad età, condizioni fisiologiche o parafisiologiche, patologiche, genetiche ecc.

Casarett and Doull's

Tossicologia: I fondamenti dell'azione delle sostanze  
tossiche - Ed. EMSI, 2010

Principi di tossicologia pag 5 -17

Biocinetica dei composti tossici

pag 57 – 61

pag71 - 96