



Università degli Studi di Bologna

Dipartimento di Farmacologia

Dottorato di Ricerca in
Farmacologia e Tossicologia

**MANIPOLAZIONE DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI
DA FRUTTI “BIOLOGICI” E “CONVENZIONALI” ED ATTIVITÀ
CHEMIOPREVENTIVA**

Coordinatore:
Prof. Giorgio Cantelli Forti

Tutore:
Prof. Moreno Paolini

Dottorando:
Dott. Alessandro Stradiotti

XIX CICLO

[2004-2006]

INDICE

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO I – COLTIVAZIONE TRADIZIONALE, BIOLOGICA E LOTTA INTEGRATA: QUALI DIFFERENZE?	4
1.1 I fitofarmaci	4
<i>1.1.1 Gli organismi di controllo</i>	6
1.2 La coltivazione “biologica”	9
<i>1.2.1 Gli organismi di controllo del metodo biologico</i>	11
1.3 La lotta integrata	12
1.4 Confronto fra i differenti metodi di coltivazione	13
1.5 I “phytochemicals”	15
Allegato II (reg.CEE 2092/91)	18
CAPITOLO II – ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI	28
2.1 Caratteristiche generali	28
2.2 Distribuzione degli enzimi	29
2.3 Reazioni di biotrasformazione degli xenobiotici	30
2.4 I microsomi	32
2.5 Il sistema monoossigenasico P450-dipendente	33
2.6 Reazioni catalizzate dal citocromo P450	39
2.7 Le isoforme del citocromo P450	40
2.8 Le biotrasformazioni di fase II o post-ossidative	41
2.9 Il ruolo dei “drug metabolizing enzymes”	47

CAPITOLO III – MODULAZIONE ATTIVITA’	
ENZIMATICA	48
3.1 Generalità	48
3.2 Modulazione da xenobiotici	49
3.2.1 Azioni di alcuni costituenti delle piante sugli enzimi <i>del metabolismo</i>	55
3.3 Polimorfismi metabolici	58
3.4 Applicazioni degli studi sulla modulazione enzimatica	59
CAPITOLO IV – CANCEROGENESI CHIMICA E	
RADICALI LIBERI	61
4.1 Cancerogenesi chimica	61
4.2 Radicali liberi dell’ossigeno	66
4.3 Azioni dei radicali liberi nell’organismo	67
4.4 Difese antiossidanti	70
CAPITOLO V – MATERIALI E METODI	73
5.1 Trattamento e sacrificio degli animali	73
5.2 Preparazione della frazione microsomiale	74
5.3 Determinazione della concentrazione delle proteine con il metodo di Lowry	75
5.4 Determinazione del contenuto di citocromo P450	76
5.5 Determinazione delle attività:	
Pentossiresorufina O-dealchilasi (PROD)	
Etossiresorufina O-deetilasi (EROD)	
Metossiresorufina O-demetilasi (MROD)	77

5.6 Determinazione della p-nitrofenolo idrossilasi (p-NFI)	78
5.7 Determinazione dell'amminopirina N-demetilasi (APND)	78
5.8 Determinazione della NADPH citocromo (P450) c-reduttasi	79
5.9 Determinazione della testosterone idrossilasi (TOH)	80
5.9.1 Preparazione del campione: estrazione con solventi	80
5.9.2 Analisi quantitativa e qualitativa	81
5.10 Analisi statistica ed espressione dei risultati	83
CAPITOLO VI – RISULTATI	84
6.1. FEGATO	85
6.1a Mela “biologica”	85
6.1b Mela “integrata”	86
6.2 RENE	95
6.2a Mela “biologica”	95
6.2b Mela “integrata”	96
6.3 POLMONE	104
6.3a Mela “biologica”	104
6.3b Mela “integrata”	105
CAPITOLO VII – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	113
CAPITOLO VIII – BIBLIOGRAFIA	117

INTRODUZIONE

Numerosi studi correlano la minore incidenza di cancro con una dieta ricca di frutta e verdura, e sono altrettanti quelli che si propongono di identificare i composti chimici responsabili di queste proprietà. Più di ottomila molecole derivanti da processi biochimici millenari sono presenti all'interno dei vegetali. Queste molecole nel loro complesso definite genericamente "phytochemicals", di concerto con vitamine e provitamine (vitamina C, vitamina E, β -carotene, etc.) giocano un ruolo potenzialmente chemiopreventivo per la loro attività antiossidante. Tale potenzialità chemiopreventiva può, però, trasformarsi in attività antichemiopreventiva nel momento in cui la dieta venga arricchita con una singola molecola, o addirittura, con una singola varietà di frutta o verdura. Basti ricordare il caso della supplementazione della dieta con β -carotene, dove è stato osservato come, rispetto al gruppo di controllo (non supplementato con tale molecola), non solo non c'è stata una riduzione dell'incidenza di cancro ma, addirittura, è stato osservato un incremento dell'incidenza di tumore al polmone nei fumatori o nei soggetti esposti ad asbesto. Questo fenomeno può essere ricondotto all'effetto che tale arricchimento della dieta ha determinato a livello degli enzimi del *drug metabolism*: è stata infatti osservata una forte induzione delle isoforme CYP1A1 da parte del β -carotene: tale isoenzima è deputato al metabolismo degli idrocarburi policiclici aromatici, presenti in elevate quantità nel fumo di sigaretta. Di conseguenza, questo fenomeno ha determinato, inevitabilmente, un aumento della produzione di metaboliti nucleofili e radicali dell'ossigeno, noti promotori della cancerogenesi.

Recenti meta analisi indicano come analoghi risultati, diametralmente opposti a quelli attesi, siano stati riscontrati anche con vitamina E, vitamina C ed altri antiossidanti naturali.

Da alcuni decenni, campagne pubblicitarie e riviste di ogni sorta suggeriscono sia “monodiete”, sia specifiche pillole contenenti estratti di frutta o verdura. Recentemente, negli Stati Uniti, stanno raggiungendo un elevato livello di diffusione le pillole di aceto di mela, pubblicizzate come sorta di “antibiotici naturali”, agenti in grado di favorire la digestione e la diminuzione della pressione sanguigna, per il mal di testa, contro l’acne ed altri problemi della pelle, contro le artriti e per migliorare la circolazione sanguigna. Oltre alle pillole vengono proposte anche le “diete sbilanciate”, un esempio delle quali è rappresentato dalla “dieta-terapia” a base di mela, che si ispira ad una dieta proposta da Edgar Cayce (autore di “the Cayce approach to health and healing”). Questa dieta prevede l’assunzione esclusiva di mele crude (soprattutto delle varietà Delicious e Johnatan), caffè nero e olio di oliva; è raccomandata a coloro i quali sono affetti da numerosi disturbi, inclusi l’anemia e la debolezza fisica.

Tuttavia, recenti *feeding trial* hanno messo in evidenza che arricchire la dieta con una singola famiglia (ad esempio crucifere) o addirittura con una singola specie di vegetali può essere dannoso per la salute dell’uomo. Non è senza significato che la campagna di informazione di massa “5 a day for better health” (già aggiornata a “5 to 9 for better health”), promossa dal National Cancer Institute statunitense, metta in evidenza l’importanza di introdurre almeno cinque tipi di frutta e verdura al giorno.

Scopo del presente lavoro è stato pertanto quello di studiare un meccanismo attraverso il quale l’arricchimento della dieta con un

singolo frutto possa essere dannoso per la salute dell'uomo. Sono stati studiati i possibili effetti della supplementazione della dieta del topo con un liofilizzato di mela sul metabolismo ossidativo degli enzimi appartenenti alla superfamiglia citocromo P450, la cui modulazione (up-regulation) è associata tra l'altro alla cancerogenesi non genotossica (co-cancerogenesi).

Parallelamente è stato effettuato un confronto tra due tipi di mela: un tipo proveniente da coltivazione di tipo lotta integrata, l'altro preoventivo da coltivazioni di tipo biologico. Quest'ultimo, sebbene molto pubblicizzato, non rivela al consumatore come il prodotto ottenuto non sia completamente "naturale", ma trattato con diversi tipi di sostanze, alcune delle quali potenzialmente tossiche. Va aggiunto che la lotta integrata rappresenta un sistema di coltivazione che, combinando l'impiego di fitofarmaci con tecniche proprie dell'agricoltura biologica, ha sostituito completamente il metodo "tradizionale" (che prevedeva l'utilizzo esclusivo di fitofarmaci) e che sottostà a precisi disciplinari regionali costantemente aggiornati in base alle ricerche effettuate.

CAPITOLO I

COLTIVAZIONE TRADIZIONALE, BIOLOGICA E LOTTA INTEGRATA: QUALI DIFFERENZE?

1.1 I FITOFARMACI

Il concetto di rischio alimentare è usualmente associato esclusivamente alla presenza di sostanze, quali additivi alimentari o residui di fitofarmaci nella dieta, particolarmente dannosi per la salute dell'uomo.

Questa associazione non considera, tuttavia, due importanti punti:

- La presenza di composti altamente reattivi anche tra le sostanze naturali;
- Gli studi tossicologici e agronomici effettuati sui fitofarmaci sia prima sia dopo l'immissione in commercio degli stessi.

In Italia ed in altri Paesi Europei, con il termine "fitofarmaci" vengono designati solo gli antiparassitari adoperati in agricoltura per aumentare la produzione o per mantenere inalterate le caratteristiche degli alimenti durante l'immagazzinamento e la distribuzione commerciale (Foschi S. et al., 1985).

La categoria dei fitofarmaci comprende oltre 3000 molecole, delle quali solo una piccola parte è adoperata in agricoltura. In Italia, infatti, sono autorizzati poco più di 300 principi attivi. I cosiddetti "fitofarmaci" sono una serie di sostanze che differiscono tra loro per:

- Caratteristiche chimiche e chimico-fisiche;
- Tessuti ed organi bersaglio;
- Meccanismi di azione.

A seconda degli organismi, animali o vegetali, che ne sono il bersaglio, essi vengono distinti in:

- Erbicidi;
- Insetticidi;
- Rodenticidi;
- Fungicidi;
- Acaricidi;
- Defoglianti;
- Battericidi;
- Nematodocidi;
- Alghicidi;
- Molluschicidi.

Tali sostanze sono state, e continuano ad essere, essenziali in agricoltura ed in molti altri ambiti (ad es. la sanità pubblica), in quanto in grado di danneggiare o di uccidere specifiche forme di vita dannose, che possano trasmettere malattie all'uomo o agli animali domestici, oppure diversamente nocive, come ad esempio, termiti, tarli funghi che aggrediscono il legname (Marquis J.K., 1986). Malattie quali la filariosi, la febbre gialla, l'encefalite virale, il tifo petecchiale, la peste bubbonica, la febbre delle Montagne Rocciose, la malaria, etc, in alcuni paesi sono state eradiccate, o perlomeno limitate, grazie all'uso di fitofarmaci. La malaria, ad esempio, fu eradicata dall'Italia grazie all'uso dell'ora tanto demonizzato DDT.

Tali sostanze, quindi, sono indubbiamente efficaci; infatti si è calcolato che in loro assenza si avrebbe un aumento delle perdite in prodotto di circa il 30%, e ciò è dal punto di vista economico e nutrizionale, inaccettabile (Velonà T., 1999).

1.1.1 Gli organismi di controllo

Affinchè l'uso dei fitofarmaci sia sicuro, è necessario che abbiano un'azione di tipo selettivo, quindi che abbiano una elevata specificità per l'organismo bersaglio. Inoltre, essi devono essere privi di effetti negativi per l'uomo, per gli animali domestici e per l'ambiente. Purtroppo però, ciò non avviene per la maggior parte dei fitofarmaci usati, i quali presentano conseguenti effetti tossici su altre forme di vita. Per tale motivo, insorge la necessità di una scrupolosa analisi tossicologica prima dell'immissione in commercio di tali sostanze.

Per valutare gli effetti potenzialmente dannosi per la salute dell'uomo, vengono effettuati studi agronomici e tossicologici “*in vivo*” ed “*in vitro*” che si basano su standard, linee guida e raccomandazioni redatte dai Codex Committees on Pesticide Residues (CCPR), organismi di natura inter-governativa che le sottoporrono al vaglio della Commissione per il Codex Alimentarius (CAC).

Tali organismi comprendono, per quanto concerne i fitofarmaci, il Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Esistono, inoltre, organismi al di fuori del sistema Codex che, in alcuni casi, vengono interpellati dai Codex stessi, come l'International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF). Oltre a tali organismi ne esistono altri all'interno della UE che valutano il potenziale tossicologico degli xenobiotici presenti negli alimenti, come lo Scientific Committee for Plantsa (SCP) Lo SCP ed il JMPR conducono studi tossicologici sui residui di fitofarmaci presenti negli alimenti che coincidono con i metodi adoperati nella sperimentazione preclinica dei farmaci. Questi comprendono studi di:

- Tossicità acuta;
- Tossicità sub-cronica;

- Tossicità cronica;
- Embriotossicità (teratogenesi, tossicità peri-post-natale, fertility);
- Genotossicità;
- Carcinogenesi;
- Tossicocinetica;
- Tossicità dei metaboliti;
- Tossicità da interazione tra principi attivi.

Dopo aver condotto tali analisi, viene calcolato un valore di ADI, cioè la dose giornaliera ammissibile (in mg/kg p.c. per die), il quale viene ricavato “abbattendo” il valore della NOEL, cioè della dose ottenuta dagli studi cronici in riferimento alla quale non vi è alcun effetto tossico osservabile (in mg/kg p.c. per die):

$$ADI=NOEL/SF$$

Dove SF= fattore di sicurezza (da 10 a 1000).

Oltre alla determinazione dell'ADI, il JMPR si occupa di proporre i Maximum Residue Limits (MRL) per i diversi fitofarmaci. Basandosi su tali limiti di quantità e sulla dieta globale, il GEMS/Food calcola il Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI), cioè effettua una stima dell'ingestione di prodotti e, di conseguenza, valuta l'esposizione individuale ai fitofarmaci.

Qualora il TMDI risultasse maggiore dell'ADI, si procede al calcolo dell' Estimated Maximum Daily Intake (EMDI), rendendo possibile l'introduzione di fattori di correzione per aumentare l'accuratezza delle stime di esposizione (Galli C., 1999).

Questa serie di studi viene effettuata in quanto la tossicologia insegna che nessuna sostanza è completamente priva di effetti tossici, quindi, per evitare ripercussioni sull'uomo, è necessaria un'accurata valutazione del rischio potenziale.

Grazie a tali metodiche è possibile ricavare utilissime informazioni sui rischi ed avere previsioni che possano essere trasferite all'uomo, sugli effetti delle sostanze in esame. Tuttavia, il principio di specificità di specie è sempre in agguato e non va mai trascurato: esemplare è stato il caso della Talidomide, risultata non teratogena nel ratto e nel topo, pertanto immessa sul mercato, per poi esservi ritirata in seguito alla scoperta della sua teratogenicità per l'uomo, successivamente osservata negli anni seguenti anche nel coniglio. Altri fattori di rischio da considerare sono le associazioni tra più principi attivi, e le interazioni tra impurezze. Per quanto riguarda il primo, la determinazione del rischio è molto complessa per problemi di natura quantitativa e qualitativa; per il secondo, invece, è possibile ottenere risultati soddisfacenti: sono molti i casi conosciuti di azione mutagena di fitofarmaci determinata dalle impurezze in esse presenti. Ad esempio, il tetracloruro di carbonio presente nei dicloro propani, oppure la dimetilnitrosammina (DMN) presente nei Sali dimetilamminici dell'acido 2,4-diclorofenossiacetico. Molte di esse vengono rapidamente degradate nell'ambiente sia per la loro volatilità, sia per l'ossidazione che subiscono. Dato che gli effetti di tali molecole sono conosciuti, come pure le loro concentrazioni limite, è possibile, a livello legislativo, fissarne i limiti. Già dal 1968 con il DPR 1255/68 fu istituita la Commissione Nazionale Fitofarmaci, mista tra il Ministero della Sanità e quello dell'Agricoltura, che fu incaricata della registrazione dei nuovi fitofarmaci. E' invece dal 1977 che la Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale (CCTN) ha

richiesto lo screening di mutagenesi per ogni fitofarmaco prima di approvarne l'immissione in commercio. Dal 1981 il vaglio tossicologico è diventato ancora più completo, come illustrato precedentemente.

Nonostante le attente analisi che vengono effettuate su tali molecole, tuttavia, non si conoscono ancora a fondo gli aspetti tossicologici di molti fitofarmaci tuttora adoperati, poiché in uso dagli anni '50, quando ancora non venivano sottoposti a controlli così approfonditi.

Da una revisione della IARC è risultata un'evidenza di cancerogenicità sufficiente o limitata nel 60% dei composti analizzati (63), la maggior parte dei quali, però, è stata ritirata dal commercio già negli anni '70 (Grilli S. et al., 1989).

1.2 LA COLTIVAZIONE “BIOLOGICA”

Recentemente l'interesse comune si sta orientando verso la cosiddetta “agricoltura biologica”. Essa è regolata dal Regolamento CEE 2092/91 e successive modifiche, in base al quale le aziende che vogliono essere definite “biologiche” devono:

- Essere sottoposte alle verifiche degli organismi di controllo del biologico autorizzati dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (d.lgs. 220/95);
- “transitare” in una fase preparatoria e di “bonifica” dei campi, detta “periodo di conversione”;
- Privilegiare le tecniche agronomiche rispetto all'utilizzo dei mezzi tecnici, in conformità con quanto previsto dall'allegato I;

- Utilizzare, per la difesa dalle malattie e per la fertilizzazione delle piante, solo i prodotti inclusi negli allegati II-A e B (vedi pagine seguenti).

Questo interesse nasce dal fatto che l'opinione pubblica reputa che l'agricoltura biologica non faccia uso di composti "chimici". In realtà sono leciti, in condizioni di necessità riconosciuta dall'organismo di controllo, sostanze quali **piretrine** e **rotenone**, due insetticidi vegetali non selettivi (per le sostanze ammesse nel metodo biologico si veda l'allegato al termine del capitolo). Vi è inoltre una mancanza di informazioni determinata da una carenza di vagli tossicologici sia sui composti adoperati, sia sul prodotto finito. Questo perché i prodotti usati e le sostanze normalmente presenti nelle piante sono considerati "naturali", e in quanto tali, più sani rispetto a quelli di sintesi. Ma non sempre ciò che la natura crea è da considerarsi "benigno". Infatti, è ben nota dalla letteratura l'elevata tossicità di tali molecole: le piretrine sono promotori della cancerogenesi ed "endocrine disruptors", mentre il rotenone è stato associato con il morbo di Parkinson (Brown T.P. et al., 2006). Per illustrare meglio il concetto è necessario aggiungere che alla base di tale metodo di coltivazione si trova il principio di favorire il potenziamento delle naturali difese dei vegetali nei confronti degli attacchi di parassiti e di insetti, che si estrinseca con un maggiore stress del vegetale stesso ed un conseguente aumento della produzione di fitofarmaci naturali (Ames B.N. et al., 1988). Questi sono rappresentati da decine di migliaia di molecole chimiche presenti all'interno dei vegetali, ad essi utili per la difesa nei confronti di stress causati dall'ambiente esterno (insulti meccanici, termici e biologici, come: attacchi da parte di parassiti, insetti, microbi oppure il gelo). Ad esempio, è stato dimostrato che i

semi di lima contengono 23 tossine naturali (quelle studiate possiedono attività biocida) che, sotto stress possono mostrare livelli che variano tra 0.2 fino a 33 p.p.m. di peso fresco (Harborne J.B., 1986). I livelli elevati di tossine naturali, infatti, possono essere ottenuti mediante selettocoltura, in modo tale da sostituirsi all'utilizzo di fitofarmaci di sintesi. Questo, però, può comportare seri problemi, come è avvenuto per nuove varietà di sedano e di patata studiate affinché fossero resistenti agli insetti, che vennero ritirate dal commercio in seguito all'intossicazione di numerose persone che avevano consumato tali prodotti (ottenuti per seletto-coltura e quindi in grado di produrre elevate quantità di fitofarmaci naturali). Mentre il sedano ha determinato numerosi casi di dermatite, la patata fu ritirata per la sua tossicità acuta responsabile di una insospettata intossicazione alimentare (Berkley S.F. et al., 1986).

1.2.1 organismi di controllo del metodo biologico

Per quanto concerne il sistema di controllo del metodo biologico, esso ha una struttura di tipo piramidale, dove al vertice si trova la Commissione Europea che svolge un'attività di super-controllo. Scendendo, si trova ogni singola azienda agricola (oppure ogni singolo trasformatore), la quale è obbligata a far controllare di propria iniziativa il proprio operato affinché i prodotti siano a norma di legge. L'azienda agricola provvede a notificare la propria attività all'Autorità Regionale di competenza e ad un organismo privato di controllo, riconosciuto dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali, i quali invieranno i loro Ispettori a verificare la corretta applicazione del metodo di coltivazione biologica tramite ispezioni periodiche in campo e verifica dei registri aziendali. Tali organismi sono a loro

volta controllati dalle Regioni e dal Ministero, ma anche da ispettori privati incaricati periodicamente dalla Commissione Europea.

1.3 LA LOTTA INTEGRATA

Spesso le molecole di sintesi (i fitofarmaci) uccidono, oltre che gli insetti dannosi, anche quelli “utili”, cioè quelli che si nutrono delle specie fitofaghe limitandone quindi la distribuzione. Il risultato finale è, conseguentemente, un incremento, invece che una diminuzione, delle infestazioni.

Il metodo tradizionale, attraverso l’uso di fitofarmaci, spesso viene condotto tramite una “lotta chimica cieca”, ossia effettuata in periodi dell’anno prestabiliti ed in quantità già note, a prescindere dal bisogno effettivo della coltivazione.

Quanto si propone la lotta integrata è una “lotta chimica guidata”, dove il fitofarmaco non venga adoperato fino a quando il danno arrecato da fitofagi e da erbe infestanti non superi il costo dell’irrorazione del diserbante o dell’insetticida (“danno tollerabile”). Essa combina quindi i metodi di coltivazione biologico e tradizionale. Questo metodo venne introdotto (in Emilia Romagna già dal 1973) per limitare la contaminazione ecosistemica determinata dai fitofarmaci e, di conseguenza, adoperarli esclusivamente in caso di effettiva necessità. Infatti, il termine “integrata” è riferito al fatto che tale metodo scaturisce da una ricerca continua di integrazione e di sostituzione progressiva delle “vecchie” tecniche utilizzate nell’agricoltura convenzionale con i metodi che combinano l’impiego razionale di fitofarmaci con l’implementazione di tecniche proprie dell’agricoltura biologica.

I disciplinari che regolano la produzione integrata sono differenti tra le diverse Regioni e periodicamente vengono rivisti in base ai risultati della ricerca e della sperimentazione.

Oggi tale metodo è seguito da tutti i produttori, ad eccezione di quelli che seguono il metodo biologico, ed ha quindi sostituito integralmente il metodo “convenzionale”.

Sono numerosi i marchi presenti in commercio che producono mele seguendo i criteri previsti dalla lotta integrata; in Trentino, infatti, il 90% delle mele presenti in commercio è stato coltivato secondo tale metodo.

1.4 CONFRONTO TRA I DIFFERENTI METODI DI COLTIVAZIONE

Analizzando le differenti tecniche di coltivazione, si vuole porre l'attenzione su alcuni punti sostanziali.

Il primo è riassumibile nella famosa frase di Paracelso, secondo il quale è la dose a fare il veleno (“*portio facit venenum*”); infatti, considerando le quantità di fitofarmaci presenti nei vegetali coltivati con i diversi metodi, si nota una sostanziale differenza: nella coltivazione con il metodo integrato si tratta di residui misurabili in parti per miliardo (ppb) o in alcuni casi in parti per milione (ppm), mentre nel caso della coltivazione biologica si parla anche di parti per migliaia (Ames B.N. et al., 1987). Nonostante il fatto che nel secondo caso si tratti di sostanze di origine naturale, si può verificare una non commestibilità per l'uomo, come nei due casi citati in precedenza.

Il secondo è rappresentato dal diverso vaglio tossicologico cui sono sottoposte le due metodiche di coltivazione: infatti, per quanto concerne i fitofarmaci di sintesi essi sono sottoposti ad un vaglio

tossicologico pari a quello riservato ai farmaci (studi pre-clinici) Al contrario, per l'agricoltura biologica, trattandosi di sostanze "naturali" gli studi tossicologici sono più "blandi", ed i controlli cui vengono sottoposti meno rigorosi e di recente istituzione (1991). Per quanto riguarda l'esito su alcune tossine naturali sottoposte a test di cancerogenesi nell'animale, risulta che circa la metà (20 su 40) è cancerogena (Ames B.N. et al., 1989; Gold et al, 1984, 1986, 1987, 1989). Da uno studio effettuato su tali sostanze (Beier, 1989) è stato osservato che i seguenti alimenti contengono pesticidi naturali che, se purificati, causano cancro nei topi o nei ratti, e che si trovano naturalmente in quantità che vanno da poche p.p.b. a 4 milioni di p.p.b.: anice, banane, basilico, broccoli, cavoletti di bruxelles, cavolo, melone, carote, cavolfiore, sedano, cannella, chiodi di garofano, cacao, caffè, finocchio, pompelmo, mielebarbabetola, funghi, senape, noce moscata, arancio, prezzemolo, pesche, pepe nero, ananas, ravanelli, lamponi, rape. In pratica, la letteratura scientifica mette chiaramente in evidenza come ben il 99,9% dei pesticidi che introduciamo giornalmente con la dieta è di origine naturale. Infatti, ne ingeriamo più di 1g al giorno, e rappresentano i principali composti chimici tossici ingeriti dall'uomo. Addirittura, i cancerogeni naturali oggi conosciuti, presenti all'interno dei vegetali suddetti, sono tra i primi, come potenza, nella lista dei cancerogeni (Ames B.N. et al., 1983, 1987; Ames B.N., Gold, 1988; Beier, 1989). Di conseguenza è necessario trattarli almeno al pari dei fitofarmaci di sintesi.

Le mele Golden delicious, provenienti dal Trentino (Valsugana), oggetto di studio della presente tesi, sono state coltivate con l'uso di sostanze presenti in Tabella 1.1

MELE DA LOTTA INTEGRATA	MELE DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA
<ul style="list-style-type: none"> • Dithianon (organo fosforico) • Mancozeb (ditiocarbammato) • Acephate (organofosforato) • Ziram (ditiocarbammato) • Carbaryl (carbammato) • Clorpyrifos (organofosforato) • Ormoni vegetali (BA, NA, GA4, GA7) • Zolfo • Olii minerali • Cyanamid (fungicida) • Captan (anticrittogamico) • Dimethylcarbamate (insetticida) • Imidacloprid (insetticida) • Flusilazole (fungicida) • Kresoxim methyl 	<ul style="list-style-type: none"> • Rame • Zolfo • Calce • Olio di niem • Sapone di potassio • Aronim • Alghe • Amminoacidi • Aglio • Agrobioprop • Segatura

Tabella 1.1

1.5 I “PHYTOCHEMICALS”

Nella frutta e nella verdura sono presenti numerose sostanze, tra cui distinguiamo i cosiddetti “*nutrienti*” e gli “*antinutrienti*”; questi ultimi sono, appunto, i “*phytochemicals*”. Le piante rappresentano un’importante fonte di cibo occorrente all’uomo per la sua sopravvivenza. Storicamente, oltre ad esserne state la principale fonte di alimentazione, sono state utilizzate come: medicine, pozioni, amuleti, veleni, e a tutt’oggi restano una costante risorsa di agenti

terapeutici. Tra i nutrienti si trovano vitamine, minerali, fibre e molte altre classi di componenti biologicamente attivi. Il regno vegetale costituisce, inoltre, una enorme riserva di varietà chimiche: è stato stimato che le piante possono sintetizzare milioni di phytochemicals, come risultato di processi biochimici avvenuti in milioni di anni, che hanno selezionato tale diversità. Tali molecole possono essere suddivise nelle seguenti classi principali:

- Composti fenolici (sostanze aromatiche derivanti dalla via dell'acido scichimico oppure da quella dell'acido malonico; comprendono la famiglia dei flavonoli);
- Terpeni (derivano dall'acido mevalonico; comprendono citochine, gibberelline, coenzima Q e ubiquinone);
- Alcaloidi (composti azotati; comprendono cocaina, caffeina, nicotina, morfina);
- Altri composti azotati (tra cui: glucosinolati, glucosidi cianogenetici).

I metaboliti primari delle piante comprendono: clorofilla, aminoacidi, nucleotidi e carboidrati semplici. Questi sono presenti in tutto il regno vegetale, e sono coinvolti nei processi di base delle piante, come ad esempio: assimilazione, respirazione trasporto e differenziamento.

I phytochemicals invece sono i metaboliti secondari dei vegetali. Essi si differenziano dai primari per la loro distribuzione nel regno vegetale, in quanto presenti tipicamente in una sola specie vegetale o in un gruppo di specie tassonomicamente imparentate, e per il loro ruolo, in quanto adoperati dalla pianta per scopi diversi, come attrarre gli insetti per l'impollinazione o per uccidere i parassiti. Per questo secondo scopo, ad esempio esistono molecole volatili liberate dalle piante nel momento in cui le loro foglie vengono danneggiate. Queste

possono servire anche come messaggeri tra le diverse piante: vengono perciò definite “semiochemicals” (dal greco *semeion*, traccia o segnale). (Parè P.W. et al, 1999).

Considerando il frutto di cui abbiamo studiato alcune caratteristiche tossicologiche, la mela, si nota che è ricco in flavonoli (epicatechine), acidi cinnamici (90% dei composti fenolici presenti) e quercetina (3,3', 4', 5, 7-pentaidrossi flavone; 21-72 mg/kg). 100g di mele contengono circa 438mg di phytochemicals, di cui circa 290mg di composti fenolici, circa 142mg di flavonoidi e 5,7mg di vitamina C (Eberhardt M.V. et al., 2000).

Sono state analizzate alcune componenti di entrambi i tipi di mela: in particolare è stata riscontrata una non significativa differenza tra il contenuto totale di polifenoli valutato alla raccolta del frutto (prof. Brigati S. comunicazione personale).

I phytochemicals agiscono all'interno dell'organismo con azioni che possono essere complementari o sovrapposte. Queste comprendono la stimolazione del sistema immunitario, la riduzione dell'aggregazione piastrinica, la modulazione della sintesi del colesterolo e del metabolismo ormonale, la riduzione della pressione sanguigna, effetti anti-ossidanti, anti-virali e antibatterici, e la modulazione del metabolismo degli xenobiotici (per la trattazione di tale argomento si veda il cap. III).

**PRODOTTI CONSENTITI
DALL'AGRICOLTURA BIOLOGICA
(dal Regolamento CEE 2092/91, Allegato II)**

Nome	Descrizione, requisiti di composizione, condizioni per l'uso.
Letame	<p>Prodotto costituito dal miscuglio di escrementi animali ed a materiali vegetali (lettiera).</p> <p>Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.</p> <p>Indicazione delle specie animali.</p> <p>Proveniente unicamente da allevamenti estensivi ai sensi dell'art. 6, paragrafo 4 del Regolamento (CEE) n. 2328/91 del Consiglio, modificato da ultimo dal Regolamento (C.E.) n. 3669/93.</p>
Letame essiccato e deiezioni avicole disidratate	<p>Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.</p> <p>Indicazione delle specie animali.</p> <p>Proveniente unicamente da allevamenti estensivi ai sensi dell'art. 6, paragrafo 5, del Regolamento (CEE) n. 2328/91</p>
Deiezioni animali, composte, inclusa la pollina ed il letame	<p>Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.</p> <p>Indicazione delle specie animali.</p> <p>Proibiti se provenienti da allevamenti industriali.</p>
Escrementi liquidi di animali (liquame, urina, ecc.)	<p>Impiego previa fermentazione controllata e/o diluizione adeguata.</p> <p>Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.</p> <p>Indicazione delle specie animali.</p> <p>Proibiti se provenienti da allevamenti industriali.</p>

Rifiuti domestici trasformati in compost	<p>Compost di rifiuti domestici separati selettivamente all'origine</p> <p>Solo rifiuti vegetali e animali</p> <p>Prodotto in sistema di raccolta chiuso e sorvegliato approvato dallo Stato membro</p> <p>Concentrazioni massime in mg/kg di materia secca:</p> <p>cadmio 0.7; rame 70; nickel 25; piombo 45; zinco 200; mercurio 0.4; cromo (totale) 70; cromo (VI) 0 *</p> <p>Solo per un periodo che termina il 31 marzo 2002</p> <p>Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo</p> <p>*= (limite di determinazione)</p>
Torba	Impiego limitato all'orticoltura (colture orticole, floricole, arboricole, vivai).
Argille (perlite, vermiculite, ecc.)	
Residui di fungaie	La composizione iniziale del substrato dev'essere limitata ai prodotti del presente elenco.
Deiezioni di vermi (Vermicompost) e di insetti	
Guano	Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Miscela composta di materiali vegetali	Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.
<p>I prodotti o sottoprodotti di origine animale citati di seguito:</p> <p>-farina di sangue</p> <p>-polvere di zoccoli</p> <p>-polvere di corna</p> <p>-polvere di ossa, anche degelatinata</p> <p>-farina di pesce</p> <p>-farina di carne</p>	Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.

-pennone -lana - pelli e crini - prodotti lattiero caseari	
Pellami	Concentrazione massima in mg/kg di materia secca di cromo (VI): 0 * *= (limite di determinazione)
Borlande ed estratti da borlande	Escluse le borlande estratte con sali ammoniacali.
Prodotti e sottoprodotti organici di origine vegetale per la fertilizzazione(ad es: farina di panelli di semi oleosi, guscio di cacao, radichette di malto, ecc.)	
Alghe e prodotti a base di alghe	Se ottenuti direttamente mediante: processi fisici comprendenti disidratazione, congelamento e macinazione estrazione con acqua o con soluzione acide e/o alcalina fermentazione Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Segatura e trucioli di legno	Legname non trattato chimicamente dopo l'abbattimento
Cortecce compostate	Legname non trattato chimicamente dopo l'abbattimento
Cenere di legno	Legname non trattato chimicamente dopo l'abbattimento
Fosfato naturale tenero	Prodotto definito dalla direttiva 76/116 CEE del Consiglio, modificata dalla direttiva 89/284 CEE. Tenore di Cadmio inferiore o pari a 90 mg/kg di P2O5
Fosfato alluminio-calcico	Prodotto definito dalla direttiva 76/116 CEE modificata dalla direttiva 89/284 CEE Tenore di Cadmio inferiore o pari a 90 mg/kg di P2O5 Impiego limitato ai terreni basici (pH>7.5)

Scorie di defosforazione	Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Sale grezzo di potassio (ad es. kainite, silvinite, ecc.)	Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Solfato di potassio, che può contenere sale di magnesio	Prodotto ottenuto da sale grezzo di potassio mediante un processo di estrazione fisica e che può contenere anche sali di magnesio Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Carbonato di calcio di origine naturale	(ad es. creta, marna, calcare macinato, litotamnio, knaerl, creta fosfatica, ecc.)
Carbonato di calcio e magnesio di origine naturale (ad es. creta magnesiaca, calcare magnesiaco macinato, ecc.)	
Solfato di magnesio (ad es. kieserite)	Unicamente di origine naturale Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Soluzione di cloruro di calcio	Trattamento fogliare su melo, dopo che sia stata messa in evidenza una carenza di calcio Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Solfato di calcio (gesso)	Prodotto definito dalla direttiva 76/116/CEE modificata dalla direttiva 89/284/CEE Unicamente di origine naturale
Fanghi industriali provenienti da zuccherifici	Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo. Solo per un periodo che termina il 31 marzo 2002
Zolfo elementare	Prodotto definito dalla direttiva 76/116/CEE modificata dalla direttiva 89/284/CEE. Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.

Oligoelementi	Oligoelementi inclusi nella direttiva 89/530/CEE [6] Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Cloruro di sodio	Unicamente salgemma Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
Farina di roccia	

B - ANTIPARASSITARI

1. Prodotti fitosanitari

(Reg. CE 1488/97) Condizioni generali applicabili per tutti i prodotti composti o contenenti le sostanze attive appresso indicate:

- impiego in conformità ai requisiti dell'allegato I
- soltanto in conformità delle disposizioni specifiche della normativa sui prodotti fitosanitari applicabile nello Stato membro in cui il prodotto è utilizzato (ove pertinente) *

I - Sostanze di origine vegetale o animale

NOME	DESCRIZIONE, REQUISITI DI COMPOSIZIONE, CONDIZIONI PER L'USO
<u><i>Azadiractina estratta da Azadirachta indica (albero del Neem)</i></u>	Insetticida Da utilizzare soltanto su piante madri per la produzione di sementi e in piante genitrici per la produzione di altro materiale vegetativo di riproduzione e su piante ornamentali. Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo.
<u><i>(*) Cera d'api</i></u>	Protezione potature
<u><i>Gelatina</i></u>	Insetticida
<u><i>(*) Proteine idrolizzate</i></u>	Sostanze attrattive Solo in applicazioni autorizzate in combinazione con altri prodotti adeguati del presente allegato II, parte II
<u><i>Lecitina</i></u>	Fungicida
<u><i>Estratto (soluzione acquosa) di Nicotiana tabacum</i></u>	Insetticida Solo contro gli afidi in albero da frutti subtropicali (ad es. aranci, limoni) e in colture tropicali (ad es. banani) Utilizzabile solo all'inizio del periodo vegetativo Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo

	Utilizzabile soltanto durante un periodo che termina il 31 marzo 2002.
<u>Oli vegetali (ad es. olio di menta, olio di pino, olio di carvi)</u>	Insetticida, acaricida, fungicida e inibitore della germinazione
<u>Piretrine estratte da Chrysanthemum cinerariaefolium</u>	Insetticida
<u>Quassia estratta da Quassia amara</u>	Insetticida, repellente
<u>Rotenone estratto da Derris spp, Loncho carpus spp e Thephrosia spp.</u>	Insetticida Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo

* = in alcuni Stati membri i prodotti contrassegnati con asterisco non sono considerati prodotti fitosanitari e non sono soggetti alle disposizioni della legislazione in materia di prodotti fitosanitari.

II - Microrganismi utilizzati nella lotta biologica contro i parassiti

NOME	DESCRIZIONE, REQUISITI DI COMPOSIZIONE, CONDIZIONI PER L'USO
<u>Microrganismi (batteri, virus e funghi)</u> , ad es. Bacillus thuringiensis, Granulosis virus	Solo prodotti non geneticamente modificati ai sensi della Direttiva 90/220/CEE del Consiglio *

*= GU n. L 117 del 8.5.1990

III - Sostanze da utilizzare solo in trappole e/o distributori automatici

Condizioni generali:

- le trappole e/o i distributori automatici devono impedire la penetrazione delle sostanze nell'ambiente e il contatto delle stesse con le coltivazioni in atto;
- le trappole devono essere raccolte dopo l'utilizzazione e riposte al sicuro

NOME	DESCRIZIONE, REQUISITI DI COMPOSIZIONE, CONDIZIONI PER L'USO
<u>(*) Fosfato di diammonio</u>	Sostanza attrattiva Soltanto in trappole
<u>Metaldeide</u>	Molluschicida

	Soltanto in trappole contenenti un repellente per specie animali superiori
<u>Feromoni</u>	Insetticida, sostanza nutritiva In trappole e distributori automatici sostanze attrattive; sostanze che alterano il comportamento sessuale; solo in trappole e distributori automatici
<u>Piretroidi (solo deltametrina o lambdacialotrina)</u>	Insetticida Solo in trappole con sostanze specifiche attrattive Solo contro Bactroceca oleae e Ceratitis capitata wied Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo Solo per un periodo che termina il 31 marzo 2002

* = in alcuni Stati membri i prodotti contrassegnati con asterisco non sono considerati prodotti fitosanitari e non sono soggetti alle disposizioni della legislazione in materia di prodotti fitosanitari.

IV - Altre sostanze di uso tradizionale in agricoltura biologica

Nome	Descrizione, requisiti di composizione, condizioni per l'uso
<u>Rame</u> , nella forma di idrossido di rame, ossicloruro di rame, solfato di rame (tribasico), ossido rameoso	Fungicida Solo per un periodo che termina il 31 marzo 2002 Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
<u>(*) Etilene</u>	Sverdimento delle banane
<u>Sale di potassio di acidi grassi (sapone molle)</u>	Insetticida
<u>(*) Allume di potassio (Kalinite)</u>	Prevenzione della maturazione delle banane

<u>Zolfo calcico (polisolfuro di calcio)</u>	Fungicida, insetticida, acaricida Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo Solo per trattamenti invernali di alberi da frutta, ulivi e viti
Olio di paraffina	Insetticida, acaricida
<u>Oli minerali</u>	Insetticida, fungicida Solo in alberi da frutta, viti, olivi e colture tropicali (ad esempio banani) Solo per un periodo che termina il 31 marzo 2002 Necessità riconosciuta dall'organismo di controllo o dall'autorità di controllo
<u>Permanganato di potassio</u>	Fungicida, insetticida Solo in alberi da frutta, ulivi e viti
<u>(*) Sabbia di quarzo</u>	Repellente
<u>Zolfo</u>	Fungicida, acaricida, repellente

CAPITOLO II

ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI

2.1 CARATTERISTICHE GENERALI

L'uomo è costantemente esposto ad una grande varietà di composti che, genericamente, sono definiti *xenobiotici* (dal greco *xenos* = estraneo). Tra essi si trovano molecole di sintesi, ma anche molecole di origine naturale; alcuni esempi sono: pesticidi, farmaci, metaboliti secondari delle piante, inquinanti ambientali. Queste sostanze possono venire assunte volontariamente oppure introdotte in maniera accidentale, involontaria e, a volte, inevitabile.

A seconda delle loro caratteristiche chimiche subiranno, nell'organismo, un differente processo metabolico. Le sostanze di natura idrosolubile, infatti, verranno eliminate immutate soprattutto con le urine e con le feci, ma anche attraverso la bile, l'apparato respiratorio (se si tratta di molecole volatili) oppure tramite il sudore. Se invece si tratta di molecole liposolubili, sarà semplice il loro assorbimento, ma più complessa la loro escrezione. Dovranno, infatti, intervenire opportuni processi di biotrasformazione, che consentiranno la modificazione della natura di queste sostanze da liposolubili a idrosolubili. In tal modo l'escrezione sarà resa più semplice e rapida, tramite i mezzi sopra descritti, evitando così un'eccessiva loro permanenza all'interno dell'organismo, che potrebbe risultare dannosa.

Gli enzimi implicati in tali processi sono estremamente importanti; vengono genericamente definiti "enzimi del *drug metabolism*": essi svolgono un ruolo fondamentale nella detossificazione di molecole

potenzialmente pericolose, tuttavia possono anche determinare la bioattivazione di sostanze che, pur non presentando inizialmente dei rischi, verrebbero trasformate in molecole tossiche, mutagene o cancerogene.

Questo avviene per due motivi particolari:

- la bassa specificità di substrato;
- la variabilità del processo catalitico.

Per quanto concerne quest'ultimo punto, è opportuno precisare che esistono numerose sostanze che hanno la capacità di modulare l'attività di questo complesso enzimatico determinandone una stimolazione (*induzione enzimatica*) oppure una *inibizione*.

2.2 DISTRIBUZIONE DEGLI ENZIMI

Gli enzimi che metabolizzano gli xenobiotici sono presenti in numerosi distretti dell'organismo, ma soprattutto a livello del fegato. E' qui, infatti, che confluisce gran parte della circolazione derivante dal tratto gastrointestinale e dalla milza facendo sì che si abbia una eliminazione di "primo passaggio" o "presistemica".

Oltre al fegato, questi enzimi si trovano anche in altri compartimenti, quali: mucosa nasale, cute, polmoni, occhio, tratto gastrointestinale, reni, ghiandole surrenali, milza, pancreas, cuore, cervello, testicoli, ovaie (Orellana et al., 2004). In particolare, il sistema citocromo P450-dipendente, le monoossigenasi flaviniche, le glutatione-S-trasferasi, e le carbossilesterasi si trovano nella mucosa nasale in quantità simili a quelle del fegato.

A livello subcellulare, li ritroviamo soprattutto nel reticolo endoplasmatico liscio o nel citosol (frazione solubile del citoplasma),

ma anche nei mitocondri, nei nuclei e nei lisosomi. La loro elevata presenza all'interno del reticolo endoplasmatico è da imputarsi al fatto che le sostanze che essi metabolizzano sono di natura lipofila e, in quanto tali, facilmente solubili nei componenti lipidici di questo organulo cellulare.

2.3 REAZIONI DI BIOTRASFORMAZIONE DEGLI XENOBIOTICI

Gli xenobiotici liposolubili possono subire diversi tipi di reazioni di biotrasformazione. Queste si suddividono in reazioni di fase I, di fase II e di fase III.

Reazioni di fase I: l'effetto di tali reazioni è quello di trasformare il composto iniziale in un metabolita più polare tramite l'introduzione o lo smascheramento di un gruppo funzionale polare, come i gruppi ossidrilico (-OH), carbossilico (-COOH) e amminico (-NH₂).

A seconda dello xenobiotico, quindi, si avranno reazioni di:

- ossidazione (la più importante; ad opera di: alcool deidrogenasi, aldeide deidrogenasi, aldeide ossidasi, carbonil reductasi, monoossigenasi)
- idrolisi (ad opera di: carbossilesterasi, epossido idrolasi, peptidasi);
- riduzione (di alcuni elementi inorganici e di xenobiotici contenenti un'aldeide, un chetone, un chinone);
- dealogenazione (di tre tipi: riduttiva, ossidativa oppure quella che porta alla formazione di doppi legami C-C);
- aromatizzazione (non molto frequente);
- co-ossidazione (reazioni catalizzate dalle perossidasi che uniscono la riduzione di acqua ossigenata e di idroperossidi lipidici all'ossidazione di altri substrati);

- monoossigenazione.

Per l'esposizione di gruppi funzionali già esistenti nella molecola, si ha l'intervento di enzimi idrolitici, quali: esterasi ed amidasi. Questi enzimi fanno sì che si liberi un acido carbossilico e un'ammina (dall'ammide) oppure un acido carbossilico e un alcool (dall'estere).

I metaboliti derivanti da tali reazioni possono subire due differenti destini: l'escrezione (se sono sufficientemente polari) oppure un'ulteriore trasformazione ad opera degli enzimi di fase II.

Reazioni di fase II: si tratta generalmente di reazioni di coniugazione; la maggior parte degli enzimi che le catalizza si trova nel citosol.

Sono reazioni di:

- glucuronazione (coniugazione con l'acido glucuronico, è una delle principali);
- solfatazione (coniugazione con solfato ad opera delle solfotransferasi);
- metilazione (poco frequente);
- acetilazione (l'acetilazione all'azoto è subita praticamente sempre dagli xenobiotici che contengono un'ammina aromatica);
- coniugazione con glutazione (i substrati possono essere di due tipi: molecole sufficientemente elettrofile per essere coniugate direttamente e molecole che prima devono essere trasformate in un metabolita elettrofilo per poi essere coniugate).

Quindi, i metaboliti derivanti dalle reazioni di fase I vengono coniugati, nelle reazioni di fase II, con molecole endogene affinché sia possibile la loro escrezione.

In alcuni casi può accadere che le reazioni di fase II avvengano senza che precedentemente siano avvenute quelle di fase I. Non è indispensabile la sequenzialità dei due tipi di reazione.

Reazioni di fase III: sono processi che avvengono a livello intestinale e comprendono reazioni di:

- idrolisi di glucuronidi (ad opera della β -glucuronidasi della flora batterica intestinale);
- idrolisi di acidi mercapturici;
- aromatizzazioni;
- riduzione di composti precedentemente ossidati nel fegato.

Tali reazioni possono capovolgere la situazione creata in seguito ai processi avvenuti nel fegato. A volte, addirittura, fanno sì che i metaboliti delle reazioni di fase I o di fase II, pronti per essere escreti, vengano riimmessi nel circolo enteroepatico. Queste reazioni, inoltre, possono produrre metaboliti tossici o cancerogeni.

Fa parte di questo sistema anche la glicoproteina P (Pgp), una pompa di “efflusso” che estrude gli xenobiotici dalle cellule, diminuendone così la concentrazione.

2.4 I MICROSOMI

Per poter isolare gli enzimi del *drug metabolism* legati al reticolo

endoplasmatico, viene effettuata una omogeneizzazione dei tessuti e un successivo frazionamento dei costituenti cellulari.

L'omogenato del fegato subisce una centrifugazione differenziale della durata di 20 min. a 9000 x g affinché vengano eliminati i nuclei,

i mitocondri, i lisosomi, le cellule ancora integre e frammenti di membrana.

Il soprannatante che ne deriva viene centrifugato a 105000 x g ed il precipitato che ne deriva risulta fortemente arricchito in microsomi, che spesso vengono usati per gli studi sul metabolismo in quanto conservano la maggior parte delle caratteristiche morfologiche e funzionali delle membrane intatte.

La rimanente frazione (soprannatante), se centrifugata, contiene invece numerosi enzimi solubili e prende il nome di *citosol*. Gli enzimi di biotrasformazione vengono quindi definiti *citoplasmatici* o *microsomiali* per indicare la loro specifica localizzazione subcellulare. Nel citosol, ad esempio sono presenti molti degli enzimi che intervengono nella fase II di biotrasformazione.

2.5 IL SISTEMA MONOOSSIGENASICO CITOCROMO P450-DIPENDENTE

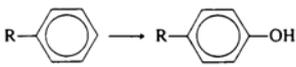
I microsomi sono ricchi di enzimi che partecipano al metabolismo ossidativo degli xenobiotici e, in particolare, contengono un'importante classe di enzimi chiamati “ossidasi a funzione mista” (MFO) o “monoossigenasi”. A questa classe appartiene anche il sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente.

I più importanti sistemi enzimatici, implicati nelle reazioni di fase I, sono le monoossigenasi contenenti il citocromo P450. Il nome “citocromo” è riferito alla sua capacità di incorporare un atomo di ossigeno nel substrato (xenobiotico) e di ridurre l'altro atomo di ossigeno ad acqua. Per quanto riguarda, invece, la definizione “P450” bisogna rifarsi ad una sua caratteristica spettrale. Infatti, nella forma ridotta (ferrosa, Fe^{2+}) il citocromo P450 forma un complesso inattivo con il monossido di carbonio (CO) che, rispetto a quello non legato,

determina uno spettro differenziale con un picco di assorbanza a 450 nm (P450). Questa proprietà spettrale è rilevabile solo quando il citocromo P450 è intatto e cataliticamente funzionante, in quanto è attribuibile alla presenza di una cisteina-tiolato legata al gruppo eme. L'enzima denaturato, infatti, perde il suo caratteristico picco a 450 nm e acquista un massimo di assorbanza a 420 nm (citocromo P420), come le altre emoproteine.

Il complesso multienzimatico monoossigenasico P450 è presente nella

Tabella 2.1 ESEMPI DI PROCESSI DI OSSIDAZIONE CATALIZZATI DALLE MONOOSSIGENASI CITOCROMO P-450 DIPENDENTI*

REAZIONE	ESEMPIO
Idrossilazione alifatica	$R-CH_2-CH_2-CH_3 \rightarrow R-CH_2-CHOH-CH_3$
Idrossilazione aromatica	
Epossidazione	$R-CH=CH-R' \rightarrow R-\overset{\text{O}}{\text{C}}-CH-CH-R'$
N-O-, o S-dealchilazione	$R-(N, O, S)-CH_3 \xrightarrow{H} R-(NH_2, OH, SH) + CH_2O$
Deaminazione	$R-CH_2-NH_2 \rightarrow R-\overset{\text{O}}{\text{C}}-H + NH_3$
N-idrossilazione	$R-NH-\overset{\text{O}}{\text{C}}-CH_3 \rightarrow R-NOH-\overset{\text{O}}{\text{C}}-CH_3$
Solfossidazione	$R-S-R \rightarrow R-\overset{\text{O}}{\text{S}}-R'$
Desolforazione	$R_1R_2\overset{\text{S}}{\text{P}}-X \rightarrow R_1R_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-X + S$
Dealogenazione ossidativa	$R-\overset{\text{X}}{\text{C}}-H \rightarrow R-\overset{\text{X}}{\text{C}}-OH \rightarrow R-\overset{\text{O}}{\text{C}}-H + HX$

*.X = alogeno.

quasi totalità degli organismi viventi, inferiori e superiori, procarioti e eucarioti, vegetali e animali e svolge un ruolo di importanza fondamentale nel metabolismo degli xenobiotici. Esso catalizza diversi tipi di reazione, la più importante delle quali è rappresentata dalla monoossigenazione (Tab.2.1), attraverso la quale esplica un'azione detossificante, trasformando una sostanza tossica o farmacologicamente attiva in un prodotto innocuo per l'organismo.

D'altra parte, può catalizzare reazioni attivanti (metabolismo ossidativo, monoossigenasico, riduttivo, desaturativo, perossidativo, di xenobiotici) nelle quali un substrato, originariamente inattivo, può venire attivato e diventare tossico o, addirittura, mutageno o cancerogeno. Questa superfamiglia, inoltre, interviene in numerose reazioni endogene, quali:

- biosintesi di acidi biliari;
- biosintesi e metabolismo di: corticosteroidi, steroidi, vitamina D;
- sintesi del trombossano;
- metabolismo di: acidi grassi, prostaglandine e leucotrieni;

Inoltre, interviene in molti processi cellulari:

- apoptosi;
- differenziamento;
- funzioni neuroendocrine.

Il sistema particolato multienzimatico monoossigenasico consiste di due diversi enzimi incorporati nella matrice fosfolipidica del reticolo endoplasmatico: la **NADPH-citocromo P450-reduttasi** ed il **citocromo**.

I fosfolipidi hanno un ruolo cruciale nelle reazioni catalizzate dal sistema del citocromo P450, in quanto facilitano le interazioni fra i due sistemi.

Il citocromo P450, l'enzima terminale e la chiave del sistema monoossigenasico, è una

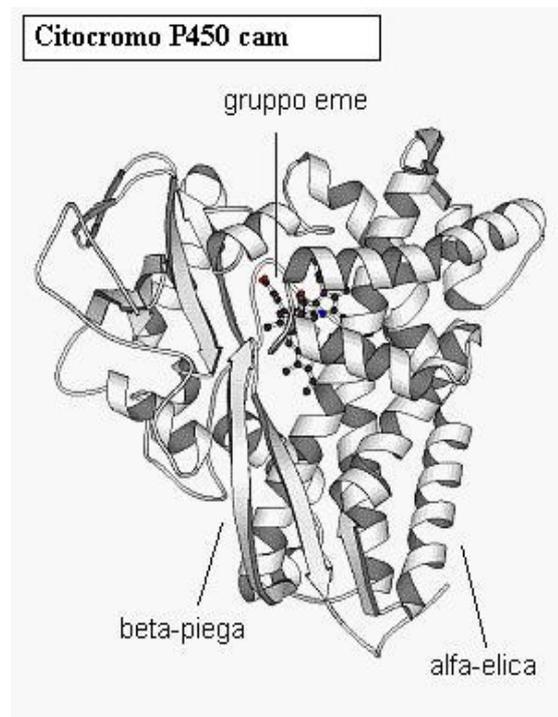


Fig.2.1: struttura molecolare del citocromo P450 di Pseudomonas putida. Come le altre emoproteine, il citocromo P450 è costituito da una parte proteica

emoproteina transmembrana (Fig.2.1). Da recenti studi di biologia molecolare sono stati scoperti, clonati e sequenziati oltre 100 diversi tipi di citocromi P450 con peso molecolare compreso tra 45 e 60 KDa. Le diverse forme di citocromo P450 differiscono sia per la struttura della catena peptidica sia nella specificità delle reazioni catalizzate. Il contenuto relativo e la quantità delle singole forme di citocromo P450 variano con la specie, il tipo di tessuto, l'età, lo stato di salute, il sesso e l'esposizione del soggetto a composti chimici (induzione enzimatica).

Il citocromo P450 è dotato di un gruppo prostetico: una ferriprotoporfirina IX inserita in una tasca idrofobica relativamente aperta o in una depressione sulla superficie dell'apoproteina.

Associata al citocromo P450 si trova una flavoproteina, la NADPH-citocromo P450 reduttasi che catalizza il trasferimento di elettroni dal coenzima ridotto (NADPH) al citocromo P450 attraverso i coenzimi flavinici FAD e FMN (rispettivamente: flavinadenindinucleotide flavinmononucleotide) (Fig.2.2).

Inoltre, un secondo elettrone può essere trasferito, almeno in

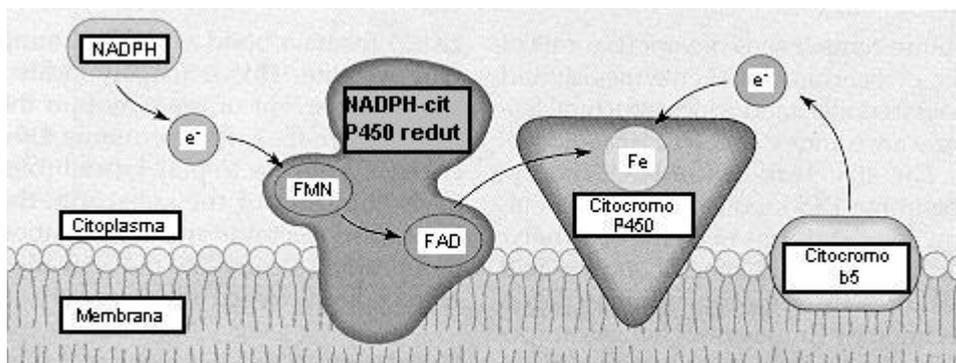
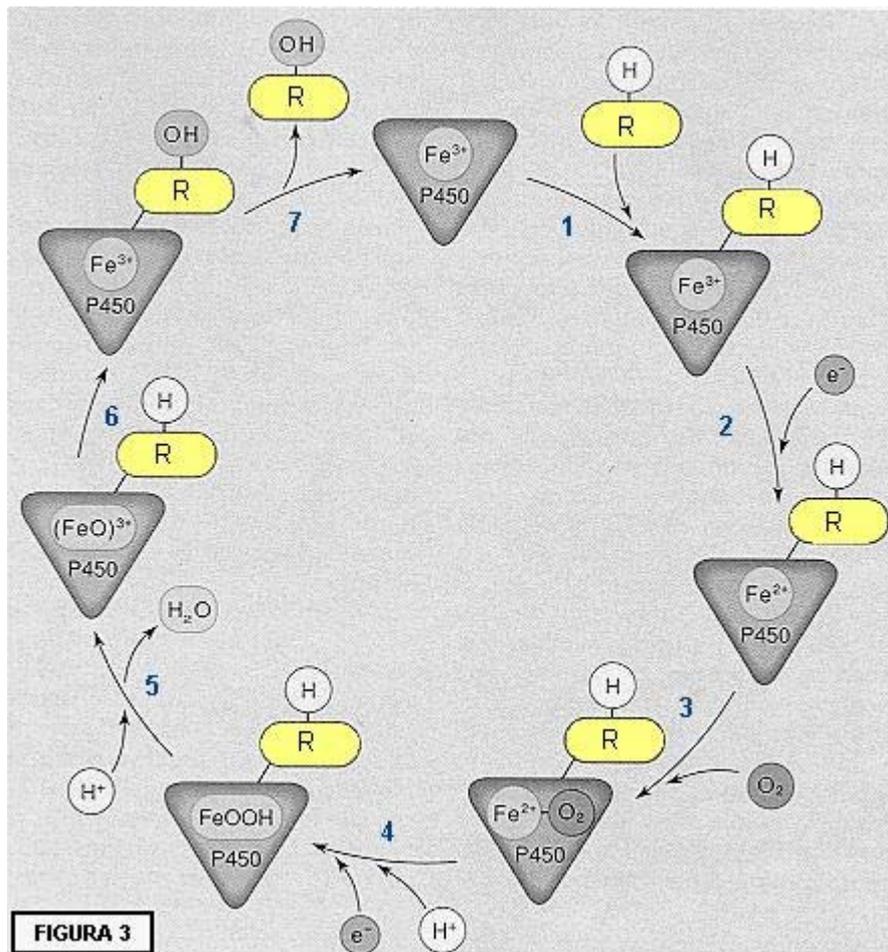


Fig.2: componenti molecolari del sistema citocromo P450 cellulare nella membrana del reticolo plasmatico (abbrev.: NADPH-cit P450 reduttasi, NADPH-citocromo P450 reduttasi)

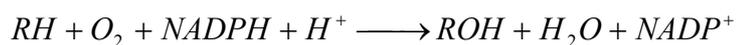
alcune forme di citocromo P450, tramite NADPH-citocromo b₅ reduttasi e citocromo b₅, la cui esatta funzione nei processi mediati dal citocromo P450 non è stata ancora chiarita.

Nonostante l'esistenza di forme multiple di citocromo P450, il meccanismo d'azione della reazione di ossidazione del substrato sembra essere lo stesso in tutti i sistemi. Per quanto riguarda invece la NADPH-citocromo P450-reduttasi, è stata evidenziata una singola forma e, essendo la sua concentrazione 10-30 volte inferiore a quella del citocromo P450, si ritiene che questo enzima intervenga a mediare la riduzione di più forme del citocromo P450. Uno schema semplificato del processo ossidativo è rappresentato nella Figura 3. Il citocromo P450 nella forma ossidata (Fe^{3+}) si combina con il substrato (**RH**) dando luogo ad un complesso binario. Il primo elettrone della coppia fornita dal NADPH, mediante l'azione della NADPH citocromo P450 reduttasi, riduce il ferro del citocromo (Fe^{2+}). A



questo punto l'ossigeno molecolare si lega al ferro, con un passaggio elettronico mediato dallo zolfo della cisteina, che costituisce il V

legame di coordinazione, caratteristico di questo citocromo. Il ferro ritorna nella forma ossidata trivalente e l'ossigeno molecolare viene trasformato in ione superossido ($O_2^{\cdot-}$). Agisce, quindi, il secondo elettrone che arriva nella catena di trasporto microsomale e si forma lo ione perossido (sempre legato al citocromo) che, con i protoni provenienti dalle flavoproteine, forma una molecola d'acqua ed un atomo d'ossigeno attivo in grado di inserirsi nei più svariati legami dando luogo alla monoossigenazione (idrossilazione, epossidazione, etc...) con formazione del prodotto ossidato (**ROH**). La potente attività ossidativa di questo ossigeno attivato permette l'ossidazione di una vasta gamma di substrati. Tale ciclo si può così riassumere:



L'aspetto più caratteristico della reazione catalizzata dal citocromo P450 è la capacità del ferro dell'eme di prendere parte ad una reazione ciclica di ossidazione/riduzione, in relazione al legame con il substrato e all'attività dell'ossigeno.

Possono essere presi in considerazione due tipi di meccanismi per il trasferimento elettronico: il primo è dovuto a collisioni casuali tra proteine in diffusione laterale e rotazionale (urti dovuti al moto traslatorio delle molecole proteiche, a quello rotatorio e alla combinazione dei due), infatti i due tipi di proteine pur essendo associate alle membrane del reticolo endoplasmatico, possono, seppur limitatamente, avere dei movimenti rotatori e spostarsi lateralmente (diffusione); mentre il secondo meccanismo ipotizzabile, prevede la formazione di un complesso stabile e l'incanalamento (*tunneling*) degli elettroni all'interno di tale complesso.

2.6 REAZIONI CATALIZZATE DAL CITOCROMO P450

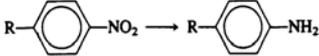
Il sistema del citocromo P450 catalizza una serie di reazioni che determinano la metabolizzazione di diversi composti.

Queste sono reazioni di:

- *monoossigenazione*,
- *ossidazione*,
- *riduzione*,
- *perossidazione*,
- *desaturazione*.

Il citocromo P450 catalizza anche la trasformazione riduttiva di alcuni xenobiotici, soprattutto a bassa tensione di ossigeno (Tab.2.2). Con il trasferimento di equivalenti di riduzione nei processi mediati dal citocromo P450, alcuni substrati accettano uno o due di questi elettroni. L'ossigeno agisce come inibitore di queste reazioni in quanto compete con gli equivalenti di riduzione. Il sistema monoossigenasico non riduce solo molecole organiche, ma anche inorganiche, come l'SO₂. (Guengerich, 2001).

Tabella 2.2 BIOTRASFORMAZIONE RIDUTTIVA CATALIZZATA DAL CITOCROMO P-450

REAZIONE	ESEMPIO
Riduzione degli azo-composti	$R-N=N-R' \longrightarrow R-NH_2 + R'NH_2$
Riduzione di nitro composti aromatici	
Dealogenazione riduttiva	$\begin{array}{c} X \\ \\ R-C-X \\ \\ X \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} X \\ \\ R-C-H \\ \\ X \end{array} + HX$

2.7 LE ISOFORME DEL CITOCROMO P450

I microsomi epatici contengono molti enzimi P450 (nell'uomo 15 o più), ognuno dei quali è in grado di catalizzare tutti i diversi tipi di reazione visti in precedenza.

E' la specificità di substrato, quindi, che li caratterizza.

Attraverso tecniche di DNA ricombinante, sono state determinate le sequenze amminoacidiche di molti enzimi P450 e, quindi, è stato possibile fare una distinzione in famiglie e sottofamiglie, a seconda del grado di omologia:

- meno del 40%: famiglie di geni differenti (p.es.: famiglie di geni I, II, III,...; nei mammiferi ne sono state identificate 8 principali, di cui le prime quattro comprendono citocromi epatici ed extra-epatici coinvolti nelle reazioni di fase I, mentre le altre quattro comprendono particolari citocromi P450 coinvolti nella biosintesi degli ormoni steroidei);
- tra il 40 e il 55%: membri di diverse sottofamiglie (p.es.: CYP2A, CYP2B, CYP2C,...);
- più del 55%: membri della stessa sottofamiglia (CYP2A1, CYP2A2, CYP2A3,...).

Nonostante nell'ambito delle differenti famiglie e sottofamiglie ci sia una sovrapposizione nella specificità di substrato, in linea generale è possibile affermare che ogni famiglia è in grado di metabolizzare classi diverse di composti chimici (Tab.2.3).

GENE P450 FAMIGLIE E SOTTOFAMIGLIE	INDUTTORE	REAZIONE
1A	Idrocarburi aromatici policiclici	Idrossilazione del benzo[a]pirene
2A		Idrossilazione degli steroidi
2B1/2	Barbiturici	Demetilazione della benzfetamina
2C		Idrossilazione degli steroidi
2D		Idrossilazione della debrisoquina
2E1	Etanolo, acetone	Ossidazione dell'etanolo
3A	Steroidi	Idrossilazione degli steroidi
4A	Farmaci ipolipidemici	Idrossilazione dell'acido laurico
5B		
11A		Distacco della catena laterale del colesterolo
11B		11 β - idrossilazione del deossicortisolo
15H		17 α - idrossilazione del pregnenolone
19		Trasformazione degli androgeni in estrogeni
21		21 -idrossilazione del progesterone

Tabella 2.3: principali famiglie geniche del citocromo P450 nei mammiferi.

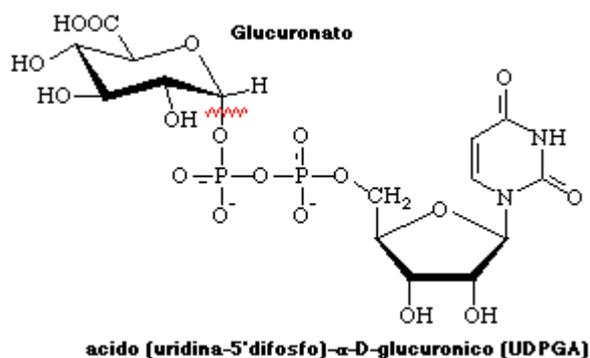
2.8 BIOTRASFORMAZIONI DI FASE II O POST-OSSIDATIVE

Le biotrasformazioni di fase II sono essenzialmente biosintetiche ed avvengono in seguito all'attivazione di cofattori (o di substrati), i quali vengono trasformati in intermedi ad alto contenuto energetico. Quindi, sono reazioni che avvengono con grande dispendio energetico, dato che i cofattori vengono attivati, direttamente o indirettamente, dall'ATP e perciò la loro disponibilità è sostanzialmente legata allo stato energetico degli organi e dei tessuti.

Una delle principali reazioni di fase II, che consente la conversione di sostanze sia esogene che endogene in metaboliti polari e idrosolubili,

è la coniugazione con acido glucuronico (in questo caso i metaboliti sono detti glucuronidi). I metaboliti verranno successivamente eliminati con le urine oppure con la bile (a seconda delle dimensioni del coniugato che è stato formato). L'enzima che catalizza la reazione è la *uridin difosfato glucuroniltransferasi* (UDP glucuroniltransferasi). Esso consente l'interazione tra un nucleotide ad alta energia, l'acido-UDP-glucuronico (UDP-GA), ed il gruppo funzionale della molecola accettrice (substrato o aglicone).

L'attività di tale enzima risiede nel reticolo endoplasmatico di numerosi tessuti e questa è un'eccezione rispetto a quanto avviene per la maggior parte degli enzimi di fase II, i quali sono localizzati principalmente nel citosol. La localizzazione a livello delle membrane microsomiali è importante dal punto di vista fisiologico, in quanto consente all'enzima di avere accesso diretto ai prodotti che si formano nella fase I per azione del citocromo P450 microsomiale. Il fegato è il principale organo in cui ha sede



questa reazione, ma una discreta attività si ritrova anche nel rene, nell'intestino, nella cute, nel cervello e nella milza. Esistono forme diverse di UDP-glucuroniltransferasi e ciò può spiegare in parte le differenze dell'attività enzimatica nei confronti di vari agliconi e le differenti risposte al trattamento con induttori e inibitori microsomiali. Non è ancora noto quante siano esattamente le diverse forme dell'enzima. Mediante studi di purificazione, separazione cromatografica o elettroforetica e caratterizzazione immunoistochimica, si è dimostrata l'esistenza di almeno 11 forme. Quattro di esse sono state clonate, sequenziate ed espresse in colture

di cellule di mammifero: si è visto che rispondono a stimoli inducenti diversi e che mostrano selettività per certe classi di substrati.

Gruppi funzionali presenti in sostanze esogene o endogene che possono essere coniugati con l'acido glucuronico sono: *alcoli alifatici e aromatici, acidi carbossilici, amine aromatiche e alifatiche primarie e secondarie, e gruppi sulfidrilici liberi*. Da queste sostanze si formano rispettivamente O-, N- e S- glucuronidi. Inoltre si è visto che anche certi atomi di carbonio nucleofili sono in grado di formare C-glucuronidi. Durante questo processo si forma un gruppo carbossilico, che si trova per la maggior parte in forma ionizzata a pH fisiologico, il quale è in grado di promuovere l'eliminazione della molecola coniugata perché conferisce ad essa maggiore idrosolubilità, ma anche perché viene riconosciuto dal sistema di trasporto degli anioni organici che opera a livello renale e biliare

Un altro importante processo di coniugazione dei gruppi idrossilici è rappresentato dalla solfoconiugazione, reazione catalizzata dalle solfotransferasi, enzimi contenuti principalmente nel fegato, nel rene, nel tratto gastrointestinale e nei polmoni. Questi enzimi trasferiscono un solfato inorganico al gruppo idrossilico di fenoli e alcoli alifatici formando degli esteri solforici. E' stata anche osservata la solfoconiugazione di amine aromatiche e di idrossilamine con formazione di solfamati e N-O-solfati. Se i substrati di questa reazione sono costituiti da amine, si formano dei solfati organici ionizzati che vengono escreti più facilmente del composto di origine o del metabolita idrossilato. Inoltre se la sostanza ha un gruppo amminico o idrossilico responsabile di tossicità, la solfoconiugazione maschera questo gruppo funzionale ed impedisce la sua interazione con i componenti cellulari bersaglio.

Le solfotransferasi possono essere distinte in quattro classi:

1. la aril solfotransferasi (essa coniuga: fenoli, catecolamine e idrossilamine);
2. un secondo tipo di solfotransferasi (questa coniuga gli idrossisteroidi ed alcuni alcoli primari e secondari);
3. la estroso solfotransferasi (agisce sui gruppi fenolici dell'anello aromatico degli steroidi);
4. una solfotransferasi specifica che catalizza il trasferimento di radicali solforici agli acidi biliari. L'attività di questi enzimi varia considerevolmente con l'età e con il sesso.

L'elemento donatore di solfati in queste reazioni è la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (PAPS), cofattore che viene sintetizzato a partire da solfato inorganico e ATP. La principale fonte di solfati per la sintesi del PAPS è la cisteina, da cui prende il via una complessa serie di reazioni ossidative. Dato che la concentrazione di cisteina libera è limitata, la disponibilità del cofattore PAPS è importante nel determinare l'entità della solfatazione dei composti esogeni. Nelle reazioni catalizzate dalle solfotransferasi il gruppo SO_3^- del PAPS viene trasferito durante un processo che comporta l'attacco nucleofilo dell'ossigeno fenolico o dell'azoto aminico allo zolfo, con distacco dell'adenosina-3'-5'-difosfato.

La metilazione, invece, è un processo comune nel metabolismo dei composti endogeni che, però, ha scarsa rilevanza nel metabolismo degli xenobiotici. Questa reazione maschera i gruppi funzionali della molecola del substrato e, quindi, può ridurre l'idrosolubilità del composto ed impedire che esso partecipi ad altre reazioni di coniugazione.

La principale via di biotrasformazione delle arilamine è invece l'acetilazione della funzione aminica, reazione catalizzata dalle N-acetil transferasi, enzimi presenti nel citosol. I substrati per questi

enzimi possono essere le amine aromatiche primarie, le idrazine, le idrazidi, le sulfonamidi e alcune alifatiche primarie. Il cofattore in queste reazioni è l'acetil coenzima A (acetil coA). Per quanto riguarda l'acetilazione, è stato dimostrato l'esistenza di un polimorfismo di origine genetica nell'uomo e in altre specie animali. Si possono, infatti, distinguere acetilatori "lenti" o "rapidi" in base alla capacità di acetilare l'isoniazide (farmaco antitubercolare). L'esistenza di questo polimorfismo è stata messa in relazione con alcune forme di tossicità e da essa può, inoltre, dipendere la diversa suscettibilità all'effetto oncogeno delle amine aromatiche. Infatti, da studi epidemiologici e sperimentali è stato dimostrato che negli acetilatori lenti è più frequente il riscontro di neoplasie vescicali in seguito alla esposizione alla benzidina. La reazione di acetilazione delle arilamine avviene in due tappe successive:

1. il gruppo acetilico dell'acetil-coA viene trasferito alla N-acetil transferasi, con formazione dell'intermedio acetil-N-acetil transferasi,
2. successivamente si ha l'acetilazione del substrato arilaminico con rigenerazione dell'enzima.

Gli xenobiotici, invece, che contengono un gruppo carbossilico possono essere metabolizzati tramite coniugazione con un aminoacido, con formazione di un legame amidico. Una reazione molto frequente è quella con la glicina, ma si può avere anche frequentemente, nell'uomo, quella con la glutamina. Gli aminoacidi coniugati sono eliminati principalmente con le urine. La combinazione di un aminoacido endogeno con uno xenobiotico può facilitarne l'eliminazione in quanto aumenta la sua capacità di interagire con il sistema di trasporto degli anioni organici nei tubuli renali.

Altra reazione importante è la coniugazione con acido mercapturico operata dalle glutazione S-transferasi, enzimi presenti nel citoplasma e, in minor misura, nella frazione microsomiale.

Esistono numerosi isoenzimi, ciascuno dei quali è un dimero che differisce per la composizione delle subunità, e mostrano diversa selettività di substrato, anche se parzialmente sovrapponibile. Il cofattore di questi enzimi è il glutatione (GSH), il quale è costituito da glicina, acido glutammico e cisteina. Le glutatione transferasi catalizzano la reazione tra il sulfidril nucleofilo del glutatione e composti contenenti atomi di carbonio elettrofili. La reazione dell'anione tiolato del glutatione (GS^-) porta alla formazione di un legame tioetere tra il carbonio ed il gruppo sulfidrilico (Fig.2.4).

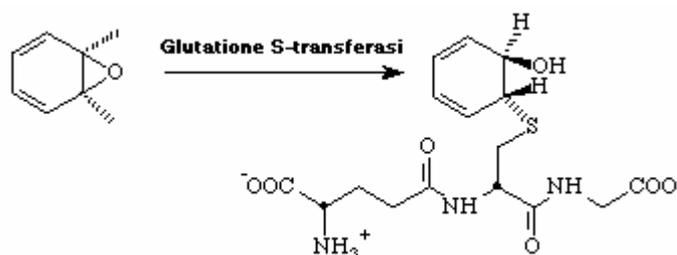


Figura 2.4: reazione di coniugazione di un substrato nucleofilo con il GSH, catalizzata dalla glutatione-S-trasferasi.

Inoltre le glutatione transferasi si comportano anche da accettori di numerosi composti che non sono substrato delle reazioni enzimatiche, in quanto le regioni lipofile dell'enzima fungono da sito di legame, quindi queste transferasi fungono sia da proteine di trasporto che da enzimi. Questi enzimi consentono ad innumerevoli xenobiotici elettrofili di combinarsi con un nucleofilo endogeno, il *glutathione*, impedendo o almeno attenuando l'interazione di questi composti con i costituenti essenziali della cellula. In particolare, questi enzimi intervengono nella detossificazione degli intermedi reattivi prodotti dal sistema del citocromo P450. Pertanto esiste all'interno delle cellule un delicato equilibrio tra la formazione di metaboliti reattivi e

la loro inattivazione da parte del GSH e ogni fattore che possa alterare questo equilibrio può modificare drasticamente il potenziale tossico di quelle sostanze che agiscono attraverso intermedi reattivi. Essi possono rendere carenti le riserve cellulari di GSH e inoltre, dato che il GSH è il cofattore della glutatione perossidasi, ciò può portare alla promozione della perossidazione lipidica con conseguenze deleterie per l'integrità cellulare.

2.9 IL RUOLO TOSSICOLOGICO DEI “DRUG METABOLIZING ENZYMES”

Da come si è potuto evincere dai precedenti paragrafi, gli enzimi di fase I e II determinano un aumento della idrosolubilità delle molecole metabolizzate rendendo possibile la loro escrezione e diminuendo il loro effetto all'interno dell'organismo. Esiste una relazione generale tra la concentrazione di una sostanza e l'intensità del suo effetto, nonché la sua attività biologica (inclusa la sua tossicità). Quindi, tali reazioni vengono chiamate di “bioinattivazione” o di “detossificazione”.

Bisogna però sottolineare la duplice valenza attivante/inattivante di questo complesso enzimatico in quanto, a seconda di qual è il substrato di partenza, si formerà un metabolita che potrà essere più o meno attivo rispetto a quello di partenza. In tal modo si potranno anche trasformare xenobiotici inattivi in metaboliti reattivi, tossici o, addirittura, cancerogeni (bioattivazione). Se una sostanza così formata potrà reagire con un componente di un sistema biologico potrà dare origine a situazioni di tossicità. Un esempio paradigmatico di tale situazione è quello rappresentato dalla metabolizzazione del benzene. Questa sostanza, infatti, viene trasformata in fenolo con produzione di un intermedio reattivo nucleofilo, un epossido, in grado di formare addotti con macromolecole, quali DNA e proteine.

CAPITOLO III

MODULAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA

3.1 GENERALITA'

I livelli e le attività del citocromo P450 sono influenzati da una varietà di fattori, inclusa la dieta. Infatti, l'organismo è costantemente esposto alle molecole presenti nell'ambiente e, come conseguenza, si adatta alle condizioni esterne variando la sua attività metabolica. Le piante sintetizzano sostanze chimiche per la propria protezione, mentre gli animali hanno sviluppato degli enzimi adatti a metabolizzare gli xenobiotici per detossificare tali sostanze chimiche (Yang C.S. et al., 1992).

Nell'epatocita, in condizioni basali (cioè in assenza di qualsiasi contatto con sostanze ad azione inducente) è possibile ritrovare circa 12 isoforme differenti di citocromo P450, ma sono molte di più quelle che compaiono in seguito alla semplice esposizione del soggetto nell'ambiente.

Anche se i diversi isoenzimi sono dotati di una certa specificità nei confronti dei differenti substrati, non si può dire altrettanto della risposta dell'organismo alle sostanze inducenti. Infatti, accade spesso che l'azione di un induttore sia su interi gruppi di isoforme.

La modulazione di tali enzimi si può tradurre in due situazioni:

1. aumento dell'attività metabolica (modulazione positiva o induzione);
2. diminuzione dell'attività metabolica (modulazione negativa o inattivazione).

Le conseguenze di ciò sono l'alterazione del metabolismo endogeno (sintesi di steroidi, corticosteroidi, leucotrieni, prostaglandine, vitamina D, acidi grassi), di quello degli xenobiotici (attivazione dei profarmaci, inattivazione dei farmaci diretti, formazione di intermedi reattivi) e di funzioni cellulari (alterazione del differenziamento, apoptosi).

Sembra che substrati diversi inducano isoforme di citocromo P450 che differiscono tra loro per peso molecolare, specificità di substrato, caratteristiche immunochimiche e spettro di assorbimento.

3.2 MODULAZIONE DA XENOBIOTICI

Negli ultimi 30 anni si è cercato di stabilire gli effetti dei differenti fattori dietetici sul metabolismo dei farmaci, delle sostanze chimiche ambientali e di alcuni substrati endogeni.

A seconda della natura e della dose dello xenobiotico, dell'organo considerato, della specie e del sesso dell'animale varieranno: la rapidità di insorgenza della modulazione, l'entità e la durata della stessa. Le sostanze chimiche possono determinare la modulazione dell'attività del

citocromo P450 agendo a differenti livelli:

1. trascrizione;
2. mRNA;
3. traduzione;
4. enzima (Fig.1).

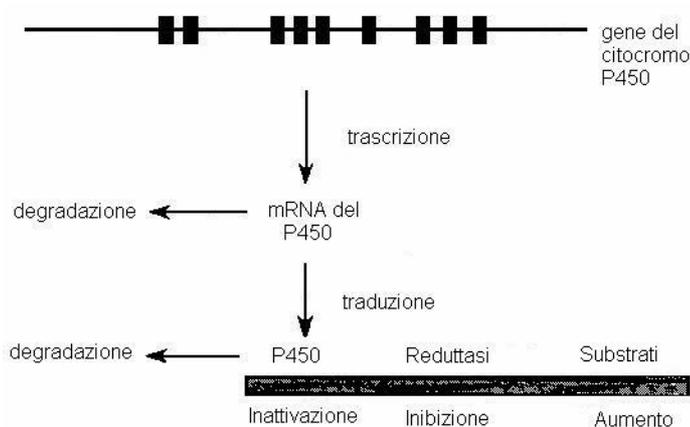
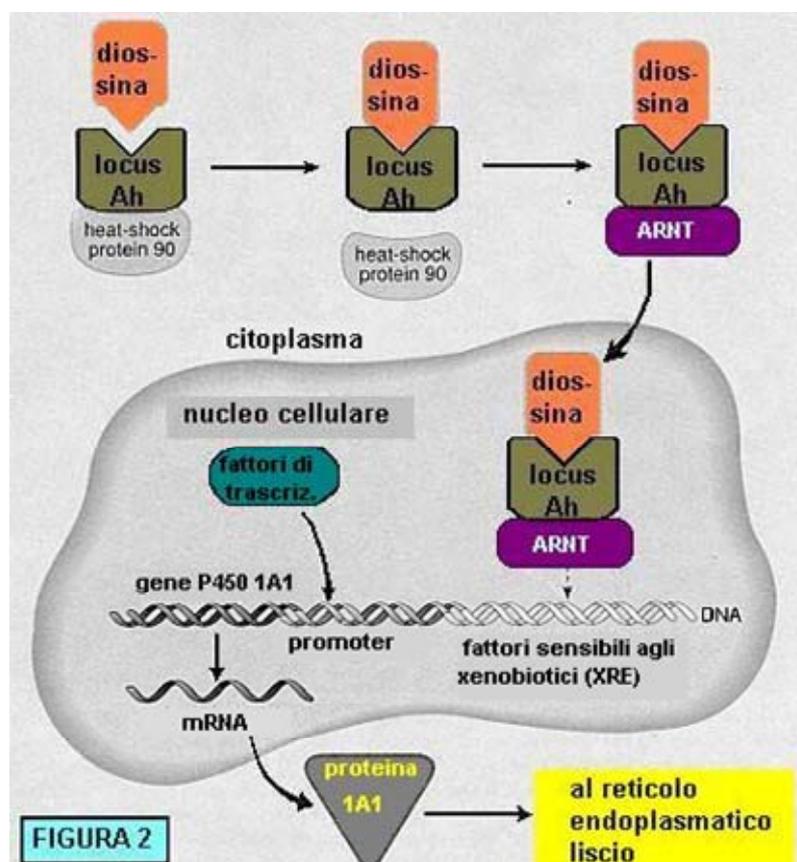


Fig.1. Possibili siti d'azione dei componenti della dieta sul citocromo P450. In figura è mostrato il gene dell'isoforma 2E1. Oltre ad influire sulla trascrizione e sulla traduzione, i componenti della dieta possono agire sulla degradazione dell'mRNA e delle proteine. Tali molecole possono fungere da substrati. Esse possono anche interagire con gli enzimi e con la reduttasi-P450-NADPH-dipendente, determinando una inattivazione del P450 oppure un aumento dell'attività monoossigenasica (da Chung S. Yang et al., 1992, modificato).

La 2,3,7,8-tetraclorodibenzoparadiossina (o più semplicemente nota come la diossina di Seveso) ci fornisce un esempio di xenobiotico che agisce a livello della trascrizione del citocromo P450, in particolare dell'isoforma CYP1A1 (Fig.2). Tale molecola è un induttore estremamente potente ed il suo recettore è rappresentato da una proteina che, una volta legata alla TCDD, trasloca nel nucleo (grazie all'ARNT, cioè al fattore di traslocazione nucleare del recettore Ah) dove interagisce con il DNA. Così facendo, attiva la trascrizione dei



geni che codificano per il citocromo P4501A1 e, quindi l'attività arilidrossilasica (da qui deriva il nome dato a tale locus, *Ah*). Per quanto riguarda, invece, il discorso sugli xenobiotici che agiscono sull'mRNA è necessario prima effettuare una premessa sul controllo post-trascrizionale. Esistono sistemi in grado di agire sullo splicing, sul trasporto e sulla stabilità dell'mRNA. Vi sono diversi tipi di

splicing che la cellula effettua sullo stesso mRNA determinando differenti caratteristiche di stabilità durante il trasporto ai ribosomi.

Il diallil solfuro (presente nell'olio derivante dall'aglio) determina un'induzione del CYP (citocromo P450) 2B1, in fegato di ratti (Brady J.F. et al.,1991). Si è, poi, dimostrato che tale induzione è accompagnata da un aumento dei livelli di mRNA di tale isoforma (Pan J.M. et al.,1991).

A volte si può non avere un'attivazione trascrizionale e di conseguenza un incremento dell'mRNA, ma la stabilizzazione di tale molecola può giocare un ruolo importante nella modulazione.

Possono essere coinvolti nell'induzione del CYP anche i meccanismi post-traduzionali, come la regolazione dell'attività dell'enzima tramite l'azione a livello della capacità catalitica e della stabilità della molecola. Ad esempio, l'etanolo e l'acetone agiscono entrambi sull'isoforma CYP2E1 stabilizzando l'enzima attivo. Anche il fenetil-isotiocianato determina una modulazione del CYP2E1. Esso, però, modula l'enzima in senso negativo, in quanto attiva il suicidio della proteina (Ishizaki H. et al., 1990).

Gli effetti dell'induzione possono essere distinti in:

- aspecifici;
- specifici.

Nel primo caso, gli effetti tossici, mutageni e cancerogeni derivano dalla liberazione, durante il ciclo catalitico del CYP, di ioni radicali superossido ($O_2^{\cdot-}$). Questo ione, poi, dà luogo ad ulteriori forme reattive ad esso associate, quali:

- radicale ossidrilico (OH^{\cdot});
- ossigeno singoletto (1O_2);
- perossido di idrogeno (H_2O_2).

Tali specie si formano in seguito a reazioni di dismutazione spontanea o enzimatica. Quindi, in seguito all'induzione aspecifica delle diverse isoforme CYP (indipendente, quindi, dall'isoforma) si ha una forte produzione di radicali, essendo aumentata l'entità dei cicli catalitici compiuti dal CYP.

Nel secondo caso, invece, l'induttore predispone il soggetto ad un rischio maggiore nei confronti di quelle molecole che vengono bioattivate dall'isoforma indotta. Tali induttori vengono, quindi,

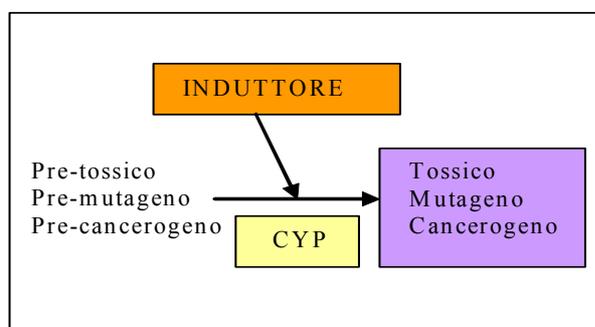


Fig.3: induzione specifica

definiti “co-tossici”, “co-mutageni” e “co-cancerogeni” in quanto, aumentando i livelli degli enzimi metabolizzanti, fanno sì che sostanze, rispettivamente, “pre-tossiche”, “pre-mutagene” oppure “pre-cancerogene” vengano trasformate in maniera più massiccia nel composto attivo (Fig.3). Sono numerosi gli esempi che si possono riportare a riguardo, come la trasformazione di molte ammine aromatiche in metaboliti cancerogeni ad opera dell'isoforma 1A2. Oppure, sempre a carico della stessa isoforma, la trasformazione della fenacetina e dell'acetanilide in paracetamolo, a sua volta trasformato (dal CYP1A2 insieme ad altre isoforme) in benzochinoneimina, un agente tossico. Un altro esempio ci è fornito dal benzo[a]pirene il quale, in seguito a processi di idrossilazione (CYP1A1) e di epossidazione, dà origine a metaboliti cancerogeni. Sono molte le

molecole di cui si conosce la bioattivazione condotta dal CYP 2E1, tra le quali troviamo:

- acetonitrile;
- benzene;
- diclorometano;
- cloroformio;
- stirene;
- cloruro di vinile.

La modificazione dei livelli e/o dell'attività di tali enzimi influenza non solo la bioattivazione di numerose sostanze potenzialmente tossiche, mutagene o cancerogene, ma anche il metabolismo di molti farmaci da essi metabolizzati e, quindi, si può compromettere l'efficacia della terapia.

Inoltre, è necessario sottolineare che gli enzimi di fase I non catalizzano esclusivamente reazioni di bioattivazione, ma anche la trasformazione di substrati attivi in metaboliti meno tossici. E, in più, a volte, è lo stesso CYP che catalizza sia l'attivazione sia la detossificazione della stessa sostanza. E' il caso dell'aflatossina B₁ che viene metabolizzata dall'isoforma CYP 3A4 diventando 8,9-epossido, un composto epatotossico e cancerogeno; la stessa isoforma, però, compie una reazione di detossificazione sullo stesso substrato, trasformandolo in aflatossina Q₁.

In seguito ad una induzione duratura del citocromo P450, si determina una aumentata richiesta di gruppi eme. Questa situazione può creare l'instaurarsi di una patologia, la *porfiria*, una malattia determinata dall'accumulo di intermedi della biosintesi dell'eme. Sono riportati due casi storici di tale patologia, il primo dei quali risale al 1956 quando, in Turchia, si verificò un'epidemia di porfiria cutanea tarda dovuta al consumo di grano contaminato da un

fungicida, l'esaclorobenzene. Il secondo risale, invece, al 1964 quando, negli Stati Uniti, si ebbe la stessa malattia in lavoratori di un impianto che produceva acido 2,4,5- triclorofenossiacetico (il principio attivo di molti erbicidi e del defoliante Agent Orange adoperato anche nella guerra del Vietnam).

Anche la modulazione negativa può produrre effetti dannosi, in quanto, diminuendo l'azione detossificante, si ha una prevalenza dell'effetto tossico diretto dello xenobiotico oppure si può determinare un blocco del metabolismo di alcuni farmaci (Fig.3.4).

Il risultato di tutto ciò è che la modulazione di tali isoenzimi può modificare sostanzialmente il metabolismo epatico di un soggetto nei confronti di moltissimi composti e le conseguenze dipendono dalle sostanze con le quali si entra in contatto quotidianamente.

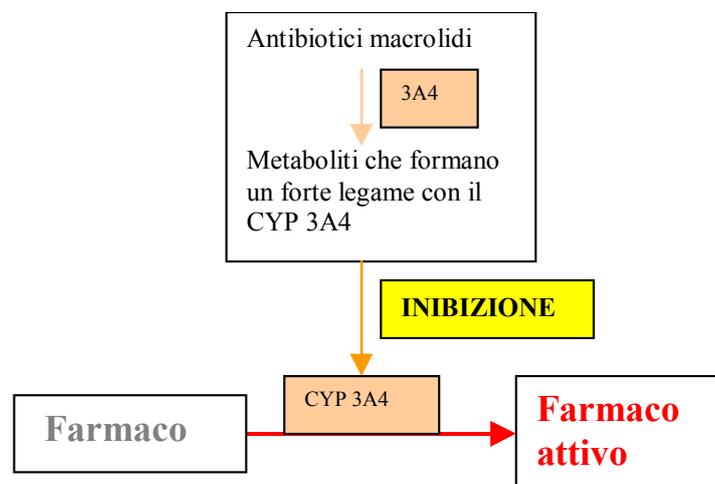


Fig.3.4: inattivazione suicida del CYP 3A4.

La modulazione enzimatica non è limitata agli enzimi di fase I, essa infatti è riscontrabile anche negli enzimi di fase II. Un esempio ci è fornito dalla famiglia delle UDP-glucuronosil-transferasi, la cui attività varia in funzione dell'età, dello stato di salute, dell'esposizione agli xenobiotici, del "background" genetico. In relazione a quest'ultimo fattore, sono state descritte le variazioni, nel

ratto, di questa famiglia in risposta alla somministrazione di farmaci e di xenobiotici, ma anche in conseguenza dei polimorfismi genetici (Burchell B. et al., 1989). Tale famiglia enzimatica insieme alla glutatione-S-transferasi sono, ad esempio, inducibili in seguito all'esposizione a farmaci quali fenobarbital e simili, oppure da inquinanti del tipo 3-metilcolantrene.

3.2.1 Azioni di alcuni costituenti delle piante sugli enzimi del metabolismo

In letteratura sono presenti molti studi sull'azione di singoli phytochemicals sugli enzimi del drug metabolism.

In uno studio condotto adoperando microsomi di fegato di topo derivanti da animali indotti, ad esempio, è stata notata una modulazione del sistema monoossigenasico P450 dipendente da parte di composti fenolici come l'acido protocatecuico, l'acido clorogenico, l'acido tannico, gallati e silibina sulle attività delle Etossiresorufina-O-dealchilasi (EROD, CYP1A1), Metossiresorufina-O-dealchilasi (MROD, CYP1A2) e Pentossiresorufina-O-dealchilasi (PROD, CYP2B1) (Baer-Dubowska W. et al., 1998). L'acido tannico si è rivelato un potente inibitore dell'attività dell'EROD, mentre gli altri composti studiati dell'attività della PROD e della MROD.

E' stato anche effettuato uno studio "in vitro" volto a determinare l'effetto sulle monoossigenasi di fegato di criceto di altri phytochemicals quali: benzil-isotiocianato, fenetil-isotiocianato, resveratrolo, acido caffeico, diosmina, acido ferulico, indolo-3-carbinolo (Teel R.W. et al., 1998). I primi tre si sono dimostrati potenti inibitori dell'attività dell'alcossiresorufina-O-dealchilasi. Inoltre, tutti questi composti si sono dimostrati inibitori dell'attività della benzilossiresorufina-O-dealchilasi (BROD), della EROD e della

MROD. Considerando l'attività dell'EROD si è visto che i flavonoidi non idrossilati sono più efficaci rispetto a quelli idrossilati e che i flavonoidi con un nucleo flavone insaturo hanno un maggiore effetto inibitorio rispetto agli analoghi saturi. Invece, per quanto riguarda l'attività della BROD, i flavonoidi non idrossilati si sono dimostrati attivatori, mentre quelli idrossilati mostrano un effetto bifasico: sono attivatori a basse concentrazioni e inibitori ad alte concentrazioni (Siess M.H. et al., 1995). E' stato, inoltre, visto che i flavonoidi ad elevate dosi possono avere un ruolo negativo, in modelli animali, sulla cancerogenesi chimica e da U.V. (Kuo S.M.,1997). In microsomi di fegato di ratto, inoltre, è stata misurata l'idrossilazione del testosterone nelle posizioni: 7α , 6β e 2α ad opera delle isoforme CYP2A1, 3A2, e 2C11, rispettivamente. Si è visto che il 3,6-dicloro-2'-isopropilossi-4'-metilflavone è il più potente inibitore dell'isoforma CYP2C11 (Dai R. et al, 1997). In microsomi indotti da β -naftoflavone è stata notata una inibizione dose-dipendente dell'attività dell'EROD determinata dalla quercetina. Non sono esclusivamente i flavonoidi, ma anche gli acidi fenolici, i glucosinolati, i composti solforati e gli indoli ad alterare i livelli degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici sia di fase I sia di fase II (Nebert and Negishi, 1982; Spencer et al., 1991; Tephyly T.R. e Burchell B., 1990). Da uno studio effettuato sugli indoli, in particolare sull'indolo-3-carbinolo e sull'indolo-3-acetonitrile (Chung F.L. et al., 1985), molecole di cui sono particolarmente ricchi alcuni tipi di cavoli e di cavolini di Bruxelles, si è visto che tali composti possono indurre numerosi enzimi monoossigenasici, compresi la benzo-[a]-pirene idrossilasi e la N-nitrosodimetilamina demetilasi.

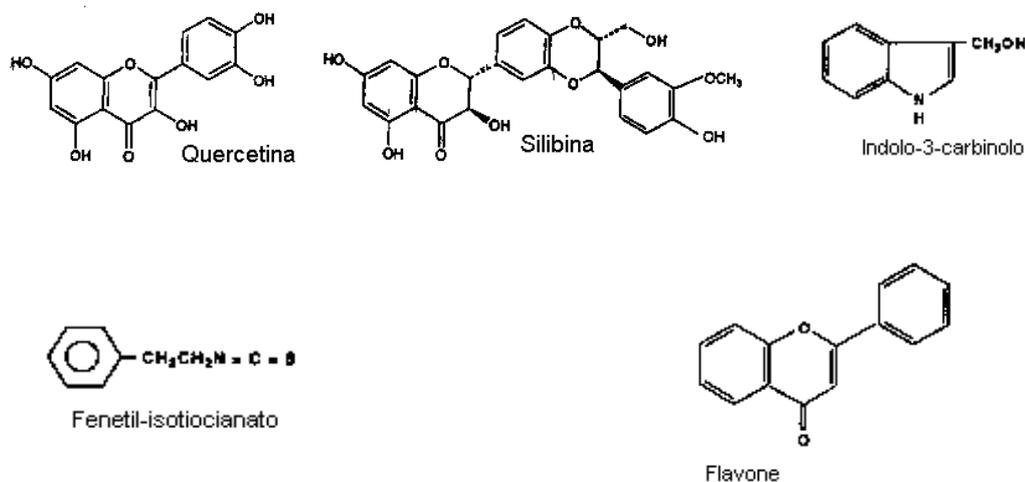


Fig.3.5. Strutture di alcuni phytochemicals

Bisogna, però, considerare che la dieta umana non è costituita esclusivamente da molecole separate ed è per tale motivo che sono numerosi gli studi condotti sull'attività degli enzimi del "drug metabolism" in seguito all'ingestione di frutta e verdura "in toto". Ad esempio, la dieta di un gruppo di ratti è stata supplementata con polvere di cipolla per 20 giorni (Teyssier C. et al., 2001). In seguito a ciò si è avuta sia una induzione delle isoforme CYP1A e CYP2B e della glutatione-S-trasferasi sia un decremento dell'attività dell'isoforma CYP2E1. Sono, inoltre, state fatte indagini sugli effetti delle mele sempre su tale famiglia enzimatica adoperando microsomi derivanti da cellule linfoblastoidi umane ingegnerizzate per esprimere i singoli cDNA per le specifiche isoforme CYP umane (Plumb G.W. et al., 1997). E' risultata una debole inibizione dell'isoforma CYP3A4, mentre si è avuta una forte inibizione dell'isoforma CYP1A1. A due gruppi differenti di topi maschi, inoltre, è stato somministrato (per os) succo di pompelmo in due dosi diverse: al primo gruppo 0.2 ml per 10 giorni, mentre al secondo un'unica dose di 0.5 ml 90 minuti prima del sacrificio. E' risultato che l'attività del

citocromo P450 nel fegato, nel caso della dose singola, ha subito una forte diminuzione, in particolare di: xantina ossidasi, glutatione perossidasi e perossidasi lipidica. Nel caso, invece, della dose multipla si è notato un incremento delle attività degli stessi enzimi ed un decremento del contenuto delle proteine epatiche totali (Dakovic-Svajcer K. et al., 1999).

Questi risultati indicano che il consumo di flavonoidi, come pure quello di numerose altre componenti della dieta, modula l'attività di alcune isoforme del citocromo P450. Così facendo, può essere alterato il metabolismo endogeno degli steroidi e di altri substrati fisiologici, ma non solo: si possono anche avere numerose conseguenze sul metabolismo dei substrati di tali isoforme enzimatiche.

3.3 POLIMORFISMI METABOLICI

Gli xenobiotici rappresentano una delle cause della modulazione costitutiva dell'attività del sistema monoossigenasico. Oltre ad essi, infatti, esistono i cosiddetti "polimorfismi metabolici", cioè alterazioni genetiche della struttura di enzimi preposti ad alcune trasformazioni metaboliche (acetiltransferasi, UDP-glucuroniltransferasi, oppure di alcune isoforme CYP).

Possiamo individuare due tipi di metabolizzatori, ossia quelli *lenti* e quelli *rapidi* (in alcuni casi, si riscontrano anche i *medi*), situazioni paragonabili, rispettivamente, all'induzione e all'inibizione enzimatica. Sussiste, però, una differenza tra le due situazioni: mentre nel caso di modulazione da xenobiotici si ha una *reversibilità* del fenomeno nel momento in cui cessa l'esposizione, nel caso di un polimorfismo l'elevata o la bassa capacità metabolica dell'enzima è costante nella vita dell'individuo (Paolini et al., 1998).

Se un individuo è un lento metabolizzatore (in riferimento ad una certa isoforma CYP) ed è esposto ad un determinato pre-tossico

(metabolizzato da tale isoforma), si avrà che la bioattivazione sarà più lenta e, di conseguenza, i sistemi di riparo “buoni” potranno non essere saturati. Se, invece, tale individuo entra in contatto con una sostanza di per sé tossica, si avrà una maggiore persistenza di tale sostanza nell'organismo, con le relative conseguenze. La situazione, come comprensibile, risulta invertita nel caso di un individuo elevato metabolizzatore.

Tali polimorfismi possono determinare una maggiore o una minore suscettibilità ad alcuni tipi di tumore. La letteratura è molto gravida nel settore. Tuttavia, diverse monografie rivelano che sono pochissimi i casi in cui tale suscettibilità risulta concreta. E' il caso, ad esempio, di fumatori lenti metabolizzatori per la forma μ della glutatione-S-trasferasi ed elevati metabolizzatori per le isoforme CYP1A1: essi sembrano essere maggiormente predisposti nei confronti del cancro ai polmoni (Bröckmoller J. et al., 1998; Kellerman G. et al., 1973).

E' appropriato, quindi, pensare ad ogni soggetto come ad un individuo dotato di un proprio “profilo metabolico complessivo” (“fingerprint”).

3.4 APPLICAZIONI DEGLI STUDI SULLA MODULAZIONE ENZIMATICA

La conoscenza della capacità di una molecola di determinare un effetto induttivo nelle monoossigenasi può risultare importante in diverse circostanze quali, ad esempio:

- la fase preclinica di studio dei farmaci;
- nell'uomo esposto (biomonitoraggio ambientale);
- il vaglio tossicologico dei fitofarmaci.

Un aspetto molto significativo nello studio della tossicità di un composto è dato dal ruolo complessivo che gli enzimi attivanti/detossificanti giocano nella formazione di intermedi reattivi

nei differenti tessuti. Infatti, più che la singola attività enzimatica, è fondamentale conoscere il ruolo relativo delle due azioni in questione. Sarà, quindi, il rapporto detossificazione/attivazione che determinerà la concentrazione dell'intermedio reattivo nel tessuto.

CAPITOLO IV

CANCEROGENESI CHIMICA E RADICALI LIBERI

4.1 CANCEROGENESI CHIMICA

Lo studio delle sostanze chimiche come causa di neoplasie ha permesso di comprendere la patogenesi di buona parte dei cosiddetti tumori spontanei. Tali tumori dipendono dalla prolungata esposizione anche a basse dosi di talune sostanze chimiche definite cancerogeni e sono caratterizzati da lunghissimi tempi di insorgenza. Si tratta di un processo multifasico e multifattoriale che si verifica sia a livello genetico che fenotipico e che viene tipicamente distinto in tre fasi: iniziazione, promozione e progressione.

L'iniziazione deriva dall'esposizione delle cellule ad un'appropriata dose di agente cancerogeno *genotossico*, una sostanza chimica in grado di determinare un danno cromosomico o una mutazione genetica non letali.

Affinché si sviluppi il cancro è necessario che questa mutazione colpisca dei geni importanti per il funzionamento della cellula stessa:

- oncogeni: prendono origine da geni cellulari altamente conservati in tutti i vertebrati, i proto-oncogeni, la cui espressione è legata ai fenomeni di moltiplicazione e differenziazione cellulare. Sono quindi dei proto-oncogeni modificati da mutazioni provocate da agenti esogeni (chimici, fisici e virali). Tra questi vi sono i fattori di crescita, i recettori per i fattori di crescita, proteine coinvolte nei meccanismi di traduzione del segnale come ras, proteine che

regolano la trascrizione nucleare come myc, regolatori del ciclo cellulare come ciclone e chinasi ciclica-dipendenti (CDK);

- oncosoppressori: sono proteine cellulari con azione opposta a quella degli oncogeni in quanto, producono segnali che regolano negativamente la moltiplicazione cellulare. Nella Tab.1 sono riportati alcuni degli oncosoppressori più frequentemente mutati nelle neoplasie umane;
- geni che regolano l'apoptosi;
- geni che regolano la riparazione del DNA (Carbone et al., 2004; Tsao et al., 2004).

Gene	Tumori con delezioni o mutazioni di oncosoppressori
ACP	Poliposi familiare del colon
HNPCC	Carcinoma sporadico colon/retto
RB-1	Retinoblastoma, Osteosarcoma, Carcinoma polmonare
WT-1	Tumore renale di Wilms
BRCA-1	Carcinoma ovaio, colon, mammella, endometrio
P ⁵³	Carcinomi di vari organi e leucemie

Tabella 4.1 Oncosoppressori mutati nelle neoplasie umane

Il primo evento essenziale per il processo di cancerogenesi è rappresentato dalla mancata riparazione del DNA. Tuttavia, affinché l'alterazione diventi ereditabile, occorre che il segmento di DNA che contiene il danno venga replicato. Pertanto, perché l'iniziazione avvenga, le cellule alterate dal cancerogeno devono subire almeno un

ciclo replicativo, in modo che la modificazione del DNA si possa fissare e divenire permanente.

Le sostanze cancerogene inizianti sono caratterizzate da una spiccata idrofilicità determinata dalle numerose cariche elettriche superficiali, elettrofilicità e da capacità mutagene. Possono essere distinte in due categorie:

- cancerogeni diretti: in virtù delle caratteristiche summenzionate sono in grado di interagire direttamente con il DNA e di essere rapidamente eliminati dagli apparati escretori;
- cancerogeni indiretti o precancerogeni: al contrario dei cancerogeni diretti sono solitamente delle sostanze neutre, idrofobe e lipofile. Sulla base della loro struttura chimica, non possono interagire direttamente con il DNA ma richiedono una conversione metabolica *in vivo* per dare origine a cancerogeni terminali capaci di trasformare le cellule (Das et al., 2000).

Tali cancerogeni, una volta assorbiti, vengono veicolati ad organi preposti alla modificazione di sostanze esogene per renderle compatibili con i meccanismi di escrezione. Gli organi principalmente interessati a queste trasformazioni sono il fegato e la vescica. In queste sedi i precancerogeni si accumulano e vengono modificati in modo da essere resi idrosolubili. Automaticamente, in questo modo, acquisiscono anche la capacità di interagire con il DNA delle stesse cellule che ne hanno mediato la trasformazione. La loro conversione metabolica è realizzata dagli enzimi di fase I, II e III del *drug-metabolism*. In particolare, secondo una conversione oramai superata, la bioattivazione dei precancerogeni a cancerogeni terminali è realizzata esclusivamente dal gruppo degli enzimi di fase I tra i quali principalmente il sistema monoossigenasico P450-dipendente. Il

danneggiamento del DNA da parte dell'intermedio elettrofilo così generato è prevenuto però dall'attività degli enzimi di fase II considerati esclusivamente detossificanti poiché in grado di inattivare gli intermedi reattivi attraverso un'ampia varietà di meccanismi, tra i quali la coniugazione con ligandi endogeni e di promuovere la loro escrezione. Ne consegue pertanto che il potere cancerogeno di una sostanza chimica è determinato non solo dalla reattività intrinseca del suo derivato elettrofilo, ma anche dall'equilibrio tra attivazione metabolica e reazioni di inattivazione (Talalay et al., 2001).

La promozione è il processo mediante il quale, a partire da una cellula iniziata, si sviluppa la neoplasia benigna. Le sostanze responsabili di tali eventi, i promotori, non sono cancerogeni se somministrati separatamente dall'iniziatore, non interagiscono direttamente con il DNA e sono quindi definiti *non-genotossici* e, la loro azione è, entro certi limiti, reversibile. L'evento determinato dal promotore che scatena la trasformazione cellulare e quindi lo sviluppo della neoplasia è l'induzione di un'intensa proliferazione cellulare. Quest'ultima viene indotta attraverso meccanismi epigenetici, interagendo con specifici recettori di superficie e/o attivando secondi messaggeri intracellulari. Altri meccanismi prevedono un'azione genotossica indiretta realizzata attraverso l'attivazione di protossici, premutageni e precancerogeni e/o mediante l'aumento dello stress ossidativo. In questo caso si parla di cancerogeni co-tossici, -mutageni e -cancerogeni (Paolini et al., 1992 e 1994).

Nel corso della fase di progressione avviene il passaggio da cellula tumorale benigna a maligna. La cellula tumorale benigna è caratterizzata da una maggiore instabilità genetica rispetto alla cellula

normale di derivazione ecco perché tali cellule accumulano delle mutazioni genetiche che ne alterano il fenotipo. Tali danni genetici si riflettono nella comparsa di sottopopolazioni cellulari che differiscono tra di loro per diverse caratteristiche quali l'invasività, la capacità di accrescimento e di formare metastasi, alterazione del metabolismo energetico.

Pertanto, sebbene l'origine della maggior parte delle neoplasie sia monoclinale, quando un tumore diventa clinicamente evidente le cellule che lo compongono sono diventate estremamente eterogenee, più adatte ad escludere le difese dell'ospite e, pertanto, più aggressive (Schedin et al., 2004).

I cancerogeni, come detto in precedenza, si possono distinguere in due categorie:

1. genotossici
2. non genotossici.

I primi agiscono direttamente sul DNA, sul quale determinano mutazioni ed alterazioni (micro- e macro-lesioni). Secondo la "Teoria Genetica" la trasformazione neoplastica di una cellula sarebbe la conseguenza delle alterazioni del materiale genetico, infatti, la maggior parte degli agenti mutageni è anche cancerogena.

I cancerogeni non genotossici, invece, hanno un'azione indiretta, cioè potrebbero produrre eventi genotossici come effetto secondario di una tossicità indotta, determinando una sregolazione della crescita cellulare, senza agire direttamente sul DNA (es.: diossine, asbesto). Recentemente è stata elaborata la "Teoria Unificata" secondo la quale, i cancerogeni non genotossici agirebbero come "up-regulators" sul sistema monoossigenasico P450-dipendente (Paolini M. et al., 1992 e 1994; Bast A. et al., 1986).

Questa induzione, come già detto, ha numerosi effetti sul metabolismo endogeno, ma principalmente aumenta la produzione di intermedi reattivi e di radicali liberi.

4.2 RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO

I radicali liberi dell'ossigeno sono specie altamente reattive, in quanto possiedono un elettrone spaiato nel loro orbitale più esterno. Essi vengono formati, all'interno del nostro organismo, in seguito alla scissione omolitica di un legame covalente: i due elettroni si separano simmetricamente formando due intermedi reattivi (ciascuno dei quali possiede un elettrone spaiato). Questi comprendono: l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed il radicale ossidrilico (OH^\cdot).

I processi che portano alla produzione di tali specie possono essere di due tipi:

1. Esogeni;
2. Endogeni.

Nel primo caso, i radicali dell'ossigeno (ROS) possono venire prodotti in seguito all'esposizione a sorgenti quali: U.V., radiazioni ionizzanti oppure inquinamento ambientale.

Nel secondo caso, invece, essi possono derivare da processi di natura patologica oppure fisiologica. Infatti, esistono numerosi enzimi (diamminasi ossidasi, xantina ossidasi, triptofano diossigenasi, citocromo P450) che producono ROS (v. anche cap. III). I radicali liberi si formano comunemente durante la nostra vita, poiché siamo organismi che vivono in presenza di una certa tensione di ossigeno. Appena viene formato un radicale libero, questo può interagire con l'ossigeno e dare luogo ad altri radicali, quindi, il fatto di essere

dipendenti dall'ossigeno significa anche essere continuamente esposti a generazioni di radicali a livello endogeno. Oltre a ciò, anche una serie di composti (come il CCl_4) danno origine a ROS durante le reazioni di bioattivazione condotte dagli enzimi del *drug metabolism*.

4.3 AZIONI DEI RADICALI LIBERI NELL'ORGANISMO

Il primo target molecolare dei ROS è rappresentato dai lipidi di membrana, quindi dai grassi poliinsaturi che caratterizzano le nostre membrane biologiche. Il processo che avviene è definito perossidazione lipidica, quello che comunemente accade durante l'irrancidimento del burro in seguito all'attacco dell'ossigeno alle componenti poliinsature dei lipidi. Una situazione analoga si crea nel nostro organismo quando i lipidi insaturi di membrana vengono attaccati dai radicali dell'ossigeno: si determina un processo a cascata, ossia si creano altri radicali finché si arriva alla formazione dell'*etano*, con la completa distruzione della membrana cellulare. Questo processo si può schematizzare in tre fasi:

1. Iniziazione;
2. Propagazione;
3. Terminazione.

Durante la prima fase, un radicale libero iniziatore cattura un atomo di idrogeno da un carbonio metilenico facente parte di un acido grasso poliinsaturo. Nella seconda fase il radicale formatosi reagisce con una molecola di ossigeno, producendo così un radicale perossile ($\text{ROO}\cdot$). Tale radicale reagisce a sua volta con una molecola di acido grasso poliinsaturo formando un lipide idroperossido (ROOH) ed un nuovo radicale ($\text{R}\cdot$) che potrà attaccare nuove molecole. Tale processo continuerà fino a quando si avrà collisione tra due radicali: in questo

caso si parla di terminazione, in quanto il prodotto non sarà più in grado di portare avanti la reazione.

Nell'insieme, questo processo porta ad una diminuzione della fluidità della membrana plasmatica. Inoltre, essendo la membrana quella componente cellulare che permette l'omeostasi, venendo questa danneggiata si ha come conseguenza l'esposizione di tutta la cellula ad una rovinosa serie di eventi, quali: l'attacco delle riserve endogene di GSH (glutathione) e di tioli, l'alterazione delle concentrazioni ioniche intracellulari (la membrana cellulare è la sede di tutti i siti di scambio: ad es. pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, ATP-asi), l'attacco a macromolecole endocellulari (ad es. proteine, DNA, RNA), a proteine citoscheletriche (ad es. tubuline, actine) e ai mitocondri (con conseguente alterazione del metabolismo energetico). Inoltre, durante la perossidazione lipidica si formano dei perossi-radicali reattivi che, sembra, possano raggiungere il torrente sanguigno e, quindi, iniziare un nuovo processo in altre sedi dell'organismo.

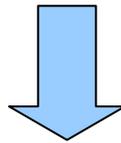
A livello del DNA, invece, determinano alterazione delle basi (sia puriniche sia pirimidiniche) come, ad esempio, la formazione di dimeri, ma anche la scissione della molecola stessa. Com'è facilmente intuibile, a seguito di tali modificazioni si determina una variazione dell'informazione genetica alla quale possono conseguire: mutagenesi, cancerogenesi e apoptosi.

Le alterazioni che i radicali causano nelle proteine, invece, sono prevalentemente a livello dei siti aromatici oppure dei siti che contengono zolfo, dove determinano l'estrazione di un idrogeno alla quale può seguire la formazione di ponti inter- o intra- molecolari. I ponti disolfurici svolgono ruoli fondamentali nel mantenimento dell'integrità delle proteine. Infatti, nel momento in cui si ha l'espulsione di un elettrone (determinata, per esempio, dal radicale),

dal gruppo cisteinico migra un elettrone controbilanciando la precedente perdita. La conseguenza che si ha dunque, in seguito all'azione dei radicali liberi, è una perdita o una modificazione dell'attività della proteina.

Questa serie di reazioni che si susseguono a catena comportano l'instaurarsi del cosiddetto stress ossidativo (Fig.4.1).

RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO



1. PEROSSIDAZIONE LIPIDICA;
2. OSSIDAZIONE E DEPLEZIONE DI GSH;
3. OSSIDAZIONE DEI TIOLI PROTEICI;
4. ALTERAZIONE DELL'OMEOSTASI IONICA;
5. DANNO AL DNA;
6. ALTERAZIONI CITOSCHELETRICHE;
7. ALTERAZIONI MITOCONDRIALI;
8. DEPLEZIONE DI ATP;
9. AUMENTO DELLA PERMEABILITA' PLASMATICA.



Fig.4.1 Azione dei radicali liberi dell'Ossigeno

Non tutti i radicali tuttavia presentano effetti nocivi; infatti, ne vengono prodotti a livello dei macrofagi, i quali li sfruttano come agenti citotossici, quindi come difesa nei confronti di patogeni che attaccano le cellule.

Anche dal metabolismo degli xenobiotici può derivare la produzione di ROS, in particolare dall'inibizione del trasporto mitocondriale di elettroni, dall'inattivazione di enzimi antiossidanti (ad es. la catalasi), dalla deplezione di scavengers radicalici.

Vi sono numerosi composti con sospetta o dimostrata attività cancerogena (p.es. gli idrocarburi aromatici policiclici) che possono essere trasformati in intermedi radicalici dagli enzimi del *drug metabolism*, così contribuendo alla produzione di radicali liberi.

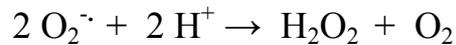
I cancerogeni causano cambiamenti strutturali permanenti nel DNA come: mutazioni, inserzioni, delezioni, riarrangiamenti di coppie di basi. Inoltre, possono attivare vie di trasduzione di segnali citoplasmatici e nucleari e modulare l'attività di proteine di geni sollecitati che regolano geni effettori collegati alla crescita, alla differenziazione e alla morte cellulare. I radicali dell'ossigeno possiedono tutte queste proprietà (Cerutti P. et al., 1985).

4.4 DIFESE ANTIOSSIDANTI

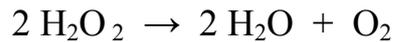
La situazione esposta nel paragrafo precedente potrebbe apparire allarmante se il nostro organismo non fosse in grado di difendersi da questa "aggressione". In realtà, esistono meccanismi antiossidanti fisiologici che tendono a contrastare il verificarsi di tali eventi. Essi comprendono due tipi di meccanismi di difesa:

1. Enzimatici, tra cui:

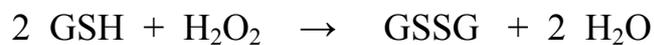
- *Superossido dismutasi* (SOD), localizzata nei mitocondri e nel citosol è specifica per l'anione superossido:



- *Catalasi*, presente nei perossisomi, detossifica il perossido di idrogeno da essi formato:



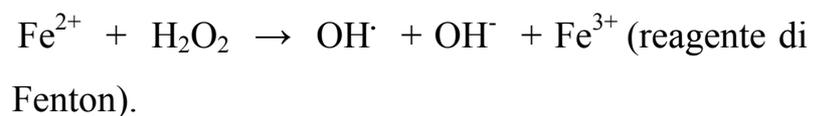
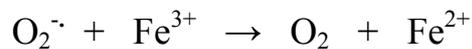
- *Glutazione perossidasi*, è l'enzima maggiormente adoperato nelle reazioni di smaltimento del perossido di idrogeno formato in seguito all'azione della SOD:



2. Non enzimatici, intrappolano i radicali formando prodotti incapaci di proseguire nelle reazioni a catena. Essi sono:

- *Vitamina E* (α -tocoferolo), è il principale antiossidante liposolubile la cui funzione principale è quella di proteggere le membrane biologiche. Esso può agire attraverso un duplice meccanismo, ossia come *quencher* e deattivare l'ossigeno singoletto direttamente, oppure come *scavenger* bloccando direttamente la reazione a catena della perossidazione lipidica. Il prodotto di tali reazioni è rappresentato dal radicale tocoferile, poco reattivo;
- *Vitamina C* (acido ascorbico), può facilmente convertire il radicale tocoferile in vitamina E; inoltre funge da antiossidante idrosolubile nei confronti di ossigeno singoletto, ipoclorito, superossido. Durante tale reazione si ossida a deidroascorbato ma, grazie all'intervento di una reduttasi GHS-dipendente, viene ridotto nuovamente ad acido ascorbico;

- *Acido urico*;
- *Bilirubina*;
- *β-carotene*;
- *Ceruloplasmina*, una proteina che trasporta rame (libero causerebbe la produzione di radicali ossidrilici e l'accelerazione della perossidazione lipidica);
- *Ferritina, transferrina e lactoferrina*, proteine che, rispettivamente, servono per: il deposito, il trasporto e la secrezione del ferro che, libero, ha le stesse azioni negative del rame:



L'organismo umano, quindi, può considerarsi ben protetto dai radicali liberi. Bisogna tuttavia sempre considerare le quantità di ROS con le quali entra in contatto: di conseguenza si può parlare di quanto accade nell'organismo in termini di una *bilancia ossidativa* sui cui piatti troviamo:

Fattori proossidanti (farmaci, tossici, radiazioni, etc.), flogosi (intervento dei macrofagi), variazione della tensione di ossigeno.

Barriere antiossidanti fisiologiche (enzimatiche e non enzimatiche)

La risultante di tale bilancio può comportare o meno uno stress ossidativo: se si ha uno sbilanciamento a favore delle specie reattive dell'ossigeno si creerà una condizione di stress ossidativo. I danni che conseguono ad uno stress ossidativo, comunque, possono venire riparati da numerosi meccanismi cellulari, quali: rimozione di proteine e di acidi grassi danneggiati, riparazione di basi del DNA, etc..

CAPITOLO V

MATERIALI E METODI

5.1 TRATTAMENTO E SACRIFICIO DEGLI ANIMALI

Abbiamo condotto gli esperimenti su topi maschi del ceppo *Swiss albino CD1* (forniti dalla ditta Harlan-Italy di Correzzane, Milano) del peso di (30 ± 3) g; gli animali sono stati pre-stabulati per una settimana prima del trattamento e alimentati con *pellet* (ditta Nossan), sottoponendoli a cicli circadiani (Tab.5.1).

Caratteristiche ambientali	Dati
Ore di luce al giorno	12
Ore di buio al giorno	12
Temperatura	22 ± 1 °C
Umidità	$60\pm 1\%$

Tabella 5.1

Abbiamo somministrato liofilizzato di mela *per os*, ottenuto per sublimazione di omogenato e poi risospeso in acqua, alle dosi di 250 o 500 mg/kg p.c. per 7 e 14 giorni consecutivi. Il gruppo di controllo ha ricevuto solo una soluzione salina, nelle stesse condizioni ambientali. Le dosi somministrate all'animale corrispondono, in un uomo medio (di 70 kg), a circa 2 e 4 mele die⁻¹.

Gli animali sono stati tenuti a digiuno la notte precedente al sacrificio e sacrificati il giorno dopo la fine del trattamento mediante

dislocazione cervicale previo stordimento per roteazione, in accordo con le procedure Ministeriali in vigore.

Immediatamente dopo, sono stati prelevati per intero gli organi: fegato, reni e polmone. Da ogni organo, opportunamente lavato si sono, in seguito, ottenuti gli estratti microsomiali (la cui preparazione sarà illustrata dettagliatamente in seguito) sui quali, attraverso tecniche spettrofluorimetriche, spettrofotometriche, e cromatografiche, abbiamo valutato le diverse attività enzimatiche utilizzando più substrati come *probe* delle molteplici isoforme CYP.

5.2 PREPARAZIONE DELLA FRAZIONE MICROSOMIALE

L'organo prelevato (fegato, polmone e rene) si lava accuratamente in tampone di omogeneizzazione Tris-Acetato pH 7.4, 0.1 M, in tre passaggi successivi, allo scopo di rimuovere i residui di emoglobina che interferirebbero nella determinazione del contenuto totale di citocromo P450. L'organo viene pesato e miscelato per 2 o 3 minuti in tampone di omogeneizzazione Tris-Acetato (4 mL di tampone per ogni grammo di peso dell'organo), utilizzando un omogenizzatore Potter (con pestello in teflon) mantenuto immerso in un contenitore pieno di ghiaccio per tutta la durata dell'operazione. L'omogenato così ottenuto viene poi sottoposto a centrifugazione a 9000 x g alla temperatura di 2-3 °C per 20 minuti in una centrifuga preparativa refrigerata (*Sorvall* RC5C). Il sovrantante postmitocondriale così ottenuto (chiamato anche S9), si decanta cautamente e si ricentrifuga a 105000 x g per 65 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 4 °C in ultracentrifuga (*Sorvall* ODT Combi 80000). Successivamente i microsomi precipitati si sospendono nella soluzione di lavaggio 0.1 M $K_2P_2O_7$ 1 mM acido etilentetraaminoacetico (pH 7.4) per

almeno 5 minuti con Potter a mano. La soluzione ottenuta verrà ricentrifugata ulteriormente mediante ultracentrifuga per ulteriori 65 minuti a 105000 x g sempre a 0-4 °C. Si omogeneizza ancora il precipitato ottenuto in soluzione finale 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) che contiene acido etilendiamminotetraacetico 1 mM e 20% (vol/vol) di glicerolo, "potterando" a mano per 7 minuti. I microsomi così ottenuti saranno rapidamente congelati mediante immersione in azoto liquido (-196 °C) per 5 o 10 minuti prima di essere riposti definitivamente in freezer a -80 °C dove verranno conservati fino al loro impiego nelle diverse attività enzimatiche.

La preparazione delle frazioni microsomiali secondo questa procedura previene lo sviluppo della perossidazione lipidica e l'azione di proteasi, attive anche a temperature inferiori a -60°C, che inficierebbero i risultati delle attività per la valutazione dell'induzione enzimatica.

5.3 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE CON IL METODO DI LOWRY

Vista la sensibilità del metodo, per ottenere una concentrazione proteica tale da rientrare nell'intervallo esplorato con gli *standard* (da 0 a 100 mg/mL), al cui interno la curva di taratura risulta lineare, si diluisce il campione 200 volte (0.5 mL di microsomi si portano a volume in un palloncino di 100 mL con H₂O bidistillata). La risposta viene riferita a quella ottenuta attraverso una curva standard di albumina sierica bovina di 100 mg/mL in acqua, concentrazione che risulta nella parte superiore dell'intervallo di linearità. Si preparano una serie di provette che verranno suddivise in standard (S), bianchi

(B) e prove (P) in cui verranno posti, rispettivamente, 1 mL di albumina standard, 1 mL di H₂O bidi (bidistillata), 1 mL di campione microsomiale diluito. A tempo, in ogni provetta, si aggiungono:

- 2 mL di reagente rameico in soluzione alcalina (1 mL di Cu₂SO₄ 0.5% in sodio citrato 1% + 50 mL di Na₂CO₃ 2% in NaOH 0.1 N). Si agita bene (preferibilmente mediante vortex) e si attendono 10 minuti prima di proseguire la reazione;
- si aggiungono, quindi, 0.2 mL di reagente di Folin-Ciocalteu opportunamente diluito (ottenuto diluendo 2.5 volte il Folin commerciale con H₂O affinché sia 1 N in acido).
- Si vortexa e si lascia riposare il tutto per circa 30-40 min;
- Infine, si “legge” il contenuto di ogni provetta, in termini di assorbanza, attraverso lo spettrofotometro, a 750 nm contro acqua. Si sottrae, quindi, il valore di assorbanza del bianco da quello dello standard e dei campioni (Lowry O.H. et al.,1951, Bailey Y.L. 1967).

5.4 DETERMINAZIONE DEL CITOCROMO P450 (CIT. P450)

La determinazione del citocromo P450 nei microsomi viene effettuata attraverso la tecnica classica di Omura e Sato mediante spettrofotometria differenziale. Il citocromo P450 dei campioni [0.5 mL di microsomi, + 4.5 mL di tampone Tris-HCl 0.05 M a pH 7.6 + EDTA 10 mM] è stato determinato osservando la differenza di assorbimento tra 450 e 490 nm dello spettro differenziale ottenuto tra citocromo P450 ridotto e lo stesso legato a CO rispetto alla forma ridotta ($\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Omura and Sato, 1964).

5.5 DETERMINAZIONE DELLE ATTIVITÀ:

Pentossiresorufina O-dealchilasi (PROD), Etossiresorufina O-deetilasi (EROD), Metossiresorufina O-demetilasi (MROD).

L'attività della **PROD** viene effettuata secondo le indicazioni di Lubet e collaboratori (Lubet et al., 1985) utilizzando la pentossiresorufina come *probe* specifico dell'isoforma CYP 2B1/2. La reazione avviene in cuvette termostate a 37 °C monitorando spettrofluorimetricamente la formazione del prodotto, resorufina, utilizzando i seguenti parametri: SLIT 5/5, Range 0.3, Excitation 522 nm, Emission 586 nm. La miscela di incubazione contiene: tampone Tris-HCl 0.05 M (pH 8), a caldo; MgCl; pentossiresorufina 200 µM; campione; NADPH 1 mM.

L'attività specifica viene, quindi, determinata confrontando i valori ottenuti con quelli relativi ad aggiunte di quantità note di resorufina (250 e 500 pmoli) direttamente alla miscela di incubazione successivamente al “*plateau*” della cinetica temporale registrata (Lubet R.A. et al., 1985).

L'attività **EROD** (CYP1A1) viene determinata in maniera analoga con l'unica differenza che il substrato di etossiresorufina risulta 1.7 µM nel volume finale di incubazione (Burke M.D. et al., 1985).

Per la **MROD** (CYP1A2), invece, la concentrazione di substrato (la metossiresorufina) risulta essere di 5 µM (Dutton D.R. et al., 1989).

5.6 DETERMINAZIONE DELLA p-NITROFENOLO IDROSSILASI (**p-NFI**)

L'attività è determinata in un volume di reazione finale di 2 mL contenente il miscuglio di reazione composto da acido perclorico (0.6 N); campione; tampone Tris/HCl 0.05 mM (pH 7.4) MgCl₂ 0.1M; p-nitrofenolo.

L'assorbanza viene letta a 546 nm. L'attività specifica (CYP2E1) viene calcolata con $\epsilon = 10.28 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Reinke L.A. et al., 1985).

5.7 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'AMMINO-PIRINA N-DEMETILASI (**APND**)

Il miscuglio di incubazione per il saggio è costituito da amminopirina (50 mM); tampone di omogeneizzazione (fosfato Na⁺/K⁺ 0.01 M, KCl 1.15%, pH 7.4); sistema rigenerante NADPH (0.6 mM NADP⁺ e 3.33 mM G6P) in tampone Tris/HCl (0.1 M a pH 7.4); ZnSO₄ al 15%; Ba(OH)₂ 1mM; reagente di Nash.

L'attività specifica (CYP 3A1/2) si calcola utilizzando $\epsilon = 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nash, 1953, Mazel, 1971) (Fig.5.1).

METABOLISMO AMMINOPIRINA

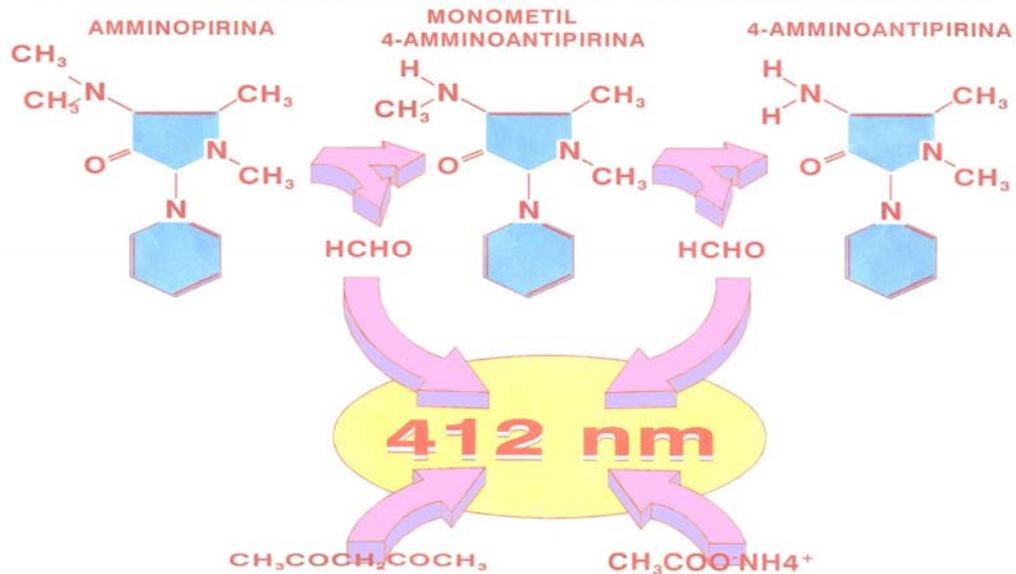


Figura 5.1: metabolismo dell'amminopirina ad opera dell'amminopirina N-demetilasi.

5.8 DETERMINAZIONE DELLA NADPH-CITOCROMO P450 (c)-REDUTTASI

Il miscuglio di incubazione è costituito da tampone fosfato 0.02 M + EDTA 0.1 M pH 7.7; citocromo c 0,5 mM; nadph 1mM;

L'attività specifica viene calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bruce M., 1967).

5.9 DETERMINAZIONE DELLA TESTOSTERONE IDROSSILASI (TOH)

5.9.1 Preparazione del campione: estrazione con solventi

In questo saggio, per qualsiasi campione (sia basali che trattati) vengono preparate 3 provette in ognuna delle quali si allestisce il seguente miscuglio di incubazione:

- 1 mL di cofattore saggio,
- 0.04 mL di MgCl_2 (250 mM),
- 0.665 mL di tampone fosfato Na^+/K^+ 0.1 M pH 7.4,
- 0.25 mL di microsomi,
- 0.02 mL di G6P-DH di grado II.

Ogni provetta viene preincubata a 37 °C per 5 min. in un bagnetto con portaprovette mobile, al fine di raggiungere la temperatura di reazione in maniera omogenea; il via alla reazione è dato con l'aggiunta di testosterone 80 mM (substrato di reazione). Dopo 10 min. la reazione viene bloccata addizionando 5 mL di CH_2Cl_2 (dicloroetano) freddo (-20 °C) sotto cappa; viene quindi aggiunto corticosterone che rappresenta lo standard interno (SI) in metanolo. Le 2 fasi vengono prima vortexate 2 min. poi separate attraverso centrifugazione a 400 r.p.m. per 15 min.. La fase contenente i metaboliti del testosterone (fase organica) e cioè quella più pesante che si trova sul fondo della provetta, viene prelevata con una *pasteur* e posta in una nuova provetta pulita. Alla fase acquosa viene addizionato 2 mL di CH_2Cl_2 (per una seconda estrazione); dopo aver vortexato ancora per 2 min. e separato le due fasi per centrifugazione (10 min. per 4000 r.p.m.), si pipetta nuovamente la fase organica e si unisce alla precedente. Si

procede poi al lavaggio accurato di queste due fasi riunite con 2 mL di NaOH 0.02 N allo scopo di saponificare i lipidi di membrana rendendoli idrosolubili e allontanandoli mediante i due successivi lavaggi con 2 mL di H₂O. La fase organica così ottenuta viene fatta evaporare facendo gorgogliare azoto dentro la provetta contenente il campione, posta a bagnomaria a 37 °C. Il campione essiccato viene posto in frigorifero a -20 °C fino al momento in cui viene saggiato per via cromatografica, previa risolubilizzazione in 100 µL di metanolo (Paolini M. et al., 1996). L'attività del testosterone idrossilasi TOH (*multiprobes*) ci permette di determinare contemporaneamente la modulazione di più isoforme CYPs. Il testosterone infatti, viene **idrossilato** in maniera regio/stereoselettiva dai diversi isoenzimi del P450 (Platt et al., 1989) (Tab.5.2).

Metabolita	Topo
6α-idrossitestosterone	2A1, 2B1
7α-idrossitestosterone	2A
6β-idrossitestosterone	3A1/2
16α-idrossitestosterone	2B9
16β-idrossitestosterone	2B
2α-idrossitestosterone	
2β-idrossitestosterone	2B1/2
4-androsten-3,7-dione	2B, 2C11

Tabella 5.2

5.9.2 Analisi quantitativa e qualitativa

Per l'analisi cromatografica abbiamo utilizzato il sistema HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) Water-Millipore (Fig.3), costituito da:

- 2 serbatoi contenenti i solventi (A e B) che rappresentano la fase mobile; il solvente A è dato da tetraidrofurano (THF) + MeOH + H₂O *Millipore* mentre il solvente B contiene THF + H₂O *Millipore*;
- una pompa a 4 vie ad alta pressione (*Waters 600 E, Multisolvent Delivery Sistem*), che trasporta i solventi dai serbatoi all'iniettore; il campione viene introdotto tramite quest'ultimo strumento e si mescola ai solventi;
- una colonna analitica in acciaio inossidabile in fase inversa *Nova-Pak® C18 (60A°, 4µm, 3.9 x 150 mm, Waters)* che rappresenta la fase stazionaria; è qui che i metaboliti idrossilati del testosterone, contenuti nel campione, vengono separati;
- un rivelatore o detector costituito da una lampada a raggi U.V. che lavora a lunghezza d'onda fissa di 254 nm (*Waters 486 Tunable Absorbance Detector*) in grado di riconoscere le specifiche proprietà chimico-fisiche dei componenti fuoriusciti dalla colonna, convertirle in un segnale elettronico e registrarle sottoforma di picchi che vengono integrati da un sistema computerizzato (*Millenium 2010 Chromatography Manager-version 1.10*).

Sono necessari 40 min. per la completa separazione dei metaboliti del testosterone: questa avviene al flusso costante di 1 mL/min. mediante eluizione in gradiente, variando in modo programmato la composizione della fase mobile al fine di aumentare il potere di risoluzione. Si parte da un 30% di solvente A + 70% di solvente B per arrivare ad un 100% di solvente A. Terminata la corsa cromatografica,

si attendono 10 min. prima di iniettare il nuovo campione per far sì che la fase mobile torni alle condizioni iniziali.

Il sistema computerizzato collegato al cromatografo calcola i tempi di ritenzione (t_r) e le aree dei picchi corrispondenti ai metaboliti correlandoli a quelli degli Standard Interno (S.I. = corticosterone), permettendo quindi il calcolo dei rapporti relativi dell'area dei picchi. I valori calcolati servono ad identificare e a quantificare gli analiti; ciò è possibile con l'ausilio di una curva di calibrazione che si ottiene iniettando, prima dei campioni, una miscela composta dai metaboliti standard (6α -, 7α -, 6β -, 16α -, 16β -, 2α -, 2β -idrossitestosterone e 4-androsten-3,17-dione) e dallo S.I. a concentrazione nota (Van der Hoeven, 1981).

5.10 ANALISI STATISTICA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

I valori espressi sono stati ottenuti animale per animale e si sono ricavate le medie di 6 animali indicando i relativi valori della deviazione standard (d.s). Per una valutazione statistica rigorosa si è determinato, dove necessario, la probabilità di evenienza casuale P, ponendo come limiti di significatività $P=0.05$ cioè 5% e $P=0.01$ cioè 1%.

Risultano significative le differenze per cui $p < 5\%$ o 1% cioè la probabilità di evenienza casuale è opportunamente bassa, minore del 5% o 1%. La probabilità di evenienza casuale è stata determinata attraverso il test di Wilcoxon (Box and Hunter, 1978).

CAPITOLO VI

RISULTATI

Al fine di determinare la capacità delle due tipologie di mela (derivanti da agricoltura “biologica” ed “integrata”) di modulare l’attività del sistema monoossigenasico microsomiale citocromo P450-dipendente (CYP), sono stati eseguiti studi su microsomi del fegaro, rene e polmone di topo, sesso maschile del ceppo *Swiss Albino CDI*. A tali animali sono stati somministrati giornalmente *per os* liofilizzati di mela “biologica” e mela “integrata”, alle dosi di 250 mg/kg p.c. e di 500 mg/kg p.c. (corrispondenti, rispettivamente a circa 2 e 4 mele al giorno), per periodi di 7 e 14 giorni.

Dono quindi stati determinati:

- Componenti della catena di trasporto microsomiale (NADPH-citocromo c(P450) riduttasi);
- Contenuto totale di citocromo P450;
- Diverse attività enzimatiche specifiche, utilizzando diversi substrati come *probes* per le diverse isoforme CYP, e precisamente:
 - EROD (Etossiresourfina O – deetilasi) per l’attività dell’isoforma CYP1A1;
 - PROD (Pentossiresourfina O – dealchilasi) per l’attività dell’isoforma CYP2B1/2;
 - MROD (Metossiresourfina O – demetilasi) per l’attività dell’isoforma CYP1A2;
 - APND (Amminopirina N – demetilasi) per l’attività dell’isoforma CYP3A1/2;

- p-NFI (Paranitrofenolo idrossilasi) per l'attività dell'isoforma CYP2E1.

L'attività della testosterone idrossilasi (TOH) è stata usata come multibiomarker dell'espressione CYP. Il testosterone viene infatti idrossilato in maniera stereo- e regio-selettiva dai differenti isoenzimi del citocromo P450, permettendo così la contemporanea determinazione di più isoforme.

6.1 FEGATO

6.1a Mela Biologica:

7 giorni:

A seguito di un'esposizione protratta per 7 giorni è stata evidenziata una significativa ($p < 0,01$) induzione della PROD, sia alla dose minima (+100%) che alla dose massima (+96%); alla dose minima si sono osservate anche significative ($p < 0,01$) induzione della MROD (+13%) e della APND (+36%); alla dose massima si è osservata anche una significativa ($p < 0,01$) riduzione della EROD (-20%). Per quanto riguarda l'attività TOH, alla dose minima sono state evidenziate significative ($p < 0,01$) induzioni delle seguenti monoossigenasi: 7 α -OHT (+16%), 6 β -OHT (+47%), 16 α -OHT (+20%), 2 β -OHT (+15%); alla stessa dose, hanno mostrato una significativa ($p < 0,01$) riduzione le seguenti attività: 6 α -OHT (-5%), 16 β -OHT (-60%), 2 α -OHT (-3%), 17-OT (-20%). Alla dose massima l'andamento è stato pressoché analogo, con i seguenti valori: induzione significativa ($p < 0,01$) per 7 α -OHT (+26%), 6 β -OHT (+61%), 2 β -OHT (+16%); riduzione

significativa ($p < 0.01$) per 6α -OHT (-34%), 16α -OHT (-7%), 16β -OHT (-23%), 2α -OHT (-64%), 17 -OT (-49%).

14 giorni:

L'esposizione protratta per 14 giorni ha evidenziato una significativa induzione della PROD (+24%) alla dose massima; riduzione significativa ($p < 0,01$) delle attività MROD (-20% alla dose minima, -14% alla dose massima), EROD (-9% alla dose minima, -34% alla dose massima), mentre per la TOH alla dose minima si è osservata una significativa induzione per le attività 7α -OHT (+34%, $p < 0.05$), 6β -OHT (+21%, $p < 0.05$), 2β -OHT (+65%, $p < 0.01$), mentre riduzione si è osservata per l'attività 6α -OHT (-26%, $p < 0.01$); alla dose massima andamenti analoghi, pur con diversa intensità: valore massimo raggiunto per l'induzione dell'attività 2β -OHT (+70%, $p < 0.01$).

6.1b Mela Integrata

7 giorni:

In questo caso, il trattamento ha avuto come risultato un significativo ($p < 0,01$) aumento dell'attività PROD (+71% alla dose minima, +103% alla dose massima) e della APND (+25% alla dose massima); si è invece osservata una riduzione significativa ($p < 0,01$) della EROD (-13% sia alla dose minima che massima); per la TOH, ad entrambe le dosi si è registrato un quadro di generale riduzione di tutte le monoossigenasi considerate, con particolari valori ottenuti alla dose minima per le attività 16α -OHT (-47%), 16β -OHT (-58%), 2β -OHT (-53%) (per tutti: $p < 0.01$), e alla dose massima per le attività 6α -OHT (-41%) 7α -OHT (-42%) (per tutti: $p < 0.01$).

14 giorni:

Il trattamento per 14 giorni ha prodotto un significativo ($p < 0,01$) aumento della PROD (+49% alla dose minima) e diminuzioni significative ($p < 0,01$) della MROD (-10% alla dose minima, -21% alla dose massima), della EROD (-17% alla dose minima e -28% alla dose massima), della APND (-17% alla dose massima) e della P-NFI (-36% alla dose massima). La TOH ha confermato il quadro di generale riduzione di tutte le monoossigenasi in studio, con valore massimo raggiunto alla dose massima per l'attività 7α -OHT (-60%, $p < 0,01$).

Le tabelle ed i grafici seguenti riassumono ed illustrano i risultati ottenuti:

TABELLA 1: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO DI FEGATO MURINO

PARAMETRO (Fegato)	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
EROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	27.74±0.85	29.65±0.35*	21.93±0.34**	24.23±0.76**	24.16±0.06**
EROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	25.31±0.72	23.14±0.36*	16.69±0.67**	20.95±1.13**	18.16±0.81**
PROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	19.1±0.30	38.16±0.55**	37.46±0.40**	32.66±0.41**	38.78±0.52**
PROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	17.30±0.94	18.85±0.35	21.52±0.06**	25.75±0.13**	18.26±0.20
MROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	105.20±2.5 9	118.51±3.92**	97.89±1.53*	99.03±1.49	108.06±1.79
MROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	106.39±4.1 1	85.03±4.67**	91.10±2.47**	96.10±1.67**	83.76±1.40**
APND (7 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	12.24±0.44	16.66±0.21**	13.78±0.68	13.90±0.28	15.27±0.27**
APND (14 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	11.59±0.30	12.75±0.38	12.71±0.25	13.64±0.40*	9.62±0.42*
pNFI (7 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.03±0.10	1.11±0.02	0.86±0.06	0.97±0.03	0.93±0.02
pNFI (14 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.20±0.02	1.24±0.43	1.04±0.06	1.11±0.02	0.77±0.02*

Ogni valore rappresenta la media ± d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali.

* p<0,05 ** p<0,05 – Wilcoxon

TABELLA 2: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO DI FEGATO MURINO.

PARAMETRO Monoossigenasi associate	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
6α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	18.85±0. 31	17.88±0.97**	12.49±0.21**	13.70±0.24**	11.07±0.19**
7α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	3.48±0.0 6	4.05±0.11**	4.10±0.12**	2.48±0.01**	2.01±0.07**
6β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.38±0.0 2	0.56±0.02**	0.61±0.01**	0.26±0.01**	0.28±0.01**
16α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	12.72±0. 23	15.30±0.48**	10.51±0.16**	6.69±0.25**	10.76±0.13**
16β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	23.79±0. 80	9.61±0.21**	18.37±0.22**	10.11±0.10**	17.80±0.16**
2α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	3.05±0.2 5	2.04±0.20**	1.09±0.01**	2.52±0.10**	1.94±0.01**
2β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	24.26±0. 78	27.78±0.96**	28.23±0.08**	11.35±0.05**	17.74±0.13**
17-OT nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.41±0.0 3	0.33±0.04**	0.21±0.02**	0.22±0.01**	0.27±0.01**

Ogni valore rappresenta la media \pm d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali. Il trattamento è stato effettuato quotidianamente per 7 giorni consecutivi.

* p<0,05 ** p<0,05 – Wilcoxon

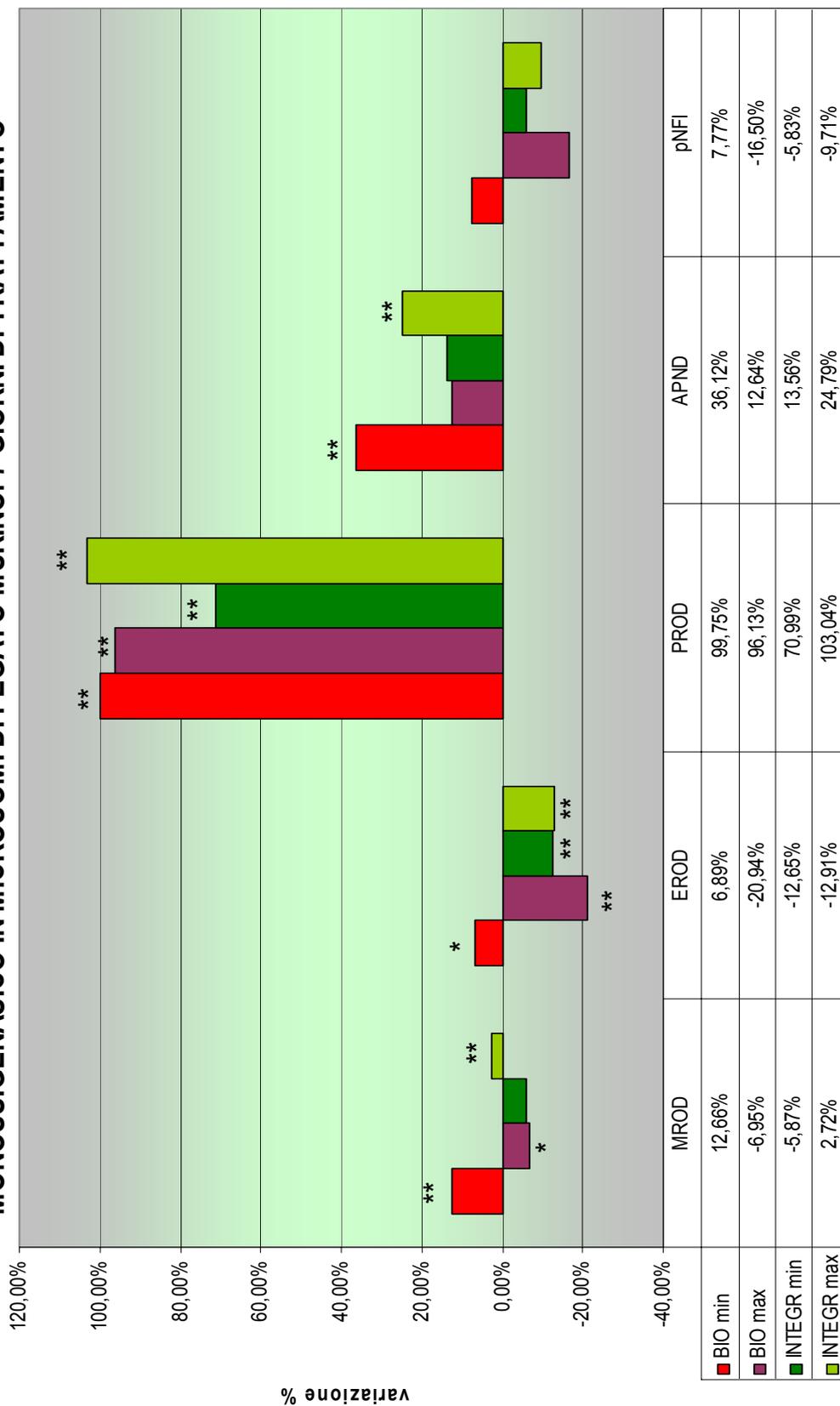
TABELLA 3: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO DI FEGATO MURINO

PARAMETRO Monoossigenasi associate	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
6α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	16.34±0.06	12.15±0.01**	11.44±0.06**	11.40±0.01**	9.50±0.45**
7α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	3.85±0.22	5.15±0.02*	5.26±0.02**	2.09±0.01**	1.54±0.25**
6β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.43±0.02	0.52±0.01*	0.55±0.04**	0.36±0.08*	0.27±0.01**
16α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	12.37±0.89	14.46±0.07*	11.39±0.03*	11.36±0.15	11.17±1.20
16β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	26.15±1.10	25.82±1.48	25.09±0.06	21.22±0.07**	20.02±1.40*
2α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	3.44±0.02	3.21±0.22	3.03±0.01*	4.38±0.02	4.89±0.12
2β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	21.83±0.21	35.33±3.70**	36.26±0.05**	24.73±0.01	21.01±2.18
17-OT nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.39±0.02	0.35±0.01	0.36±0.01	0.30±0.01*	0.28±0.06**

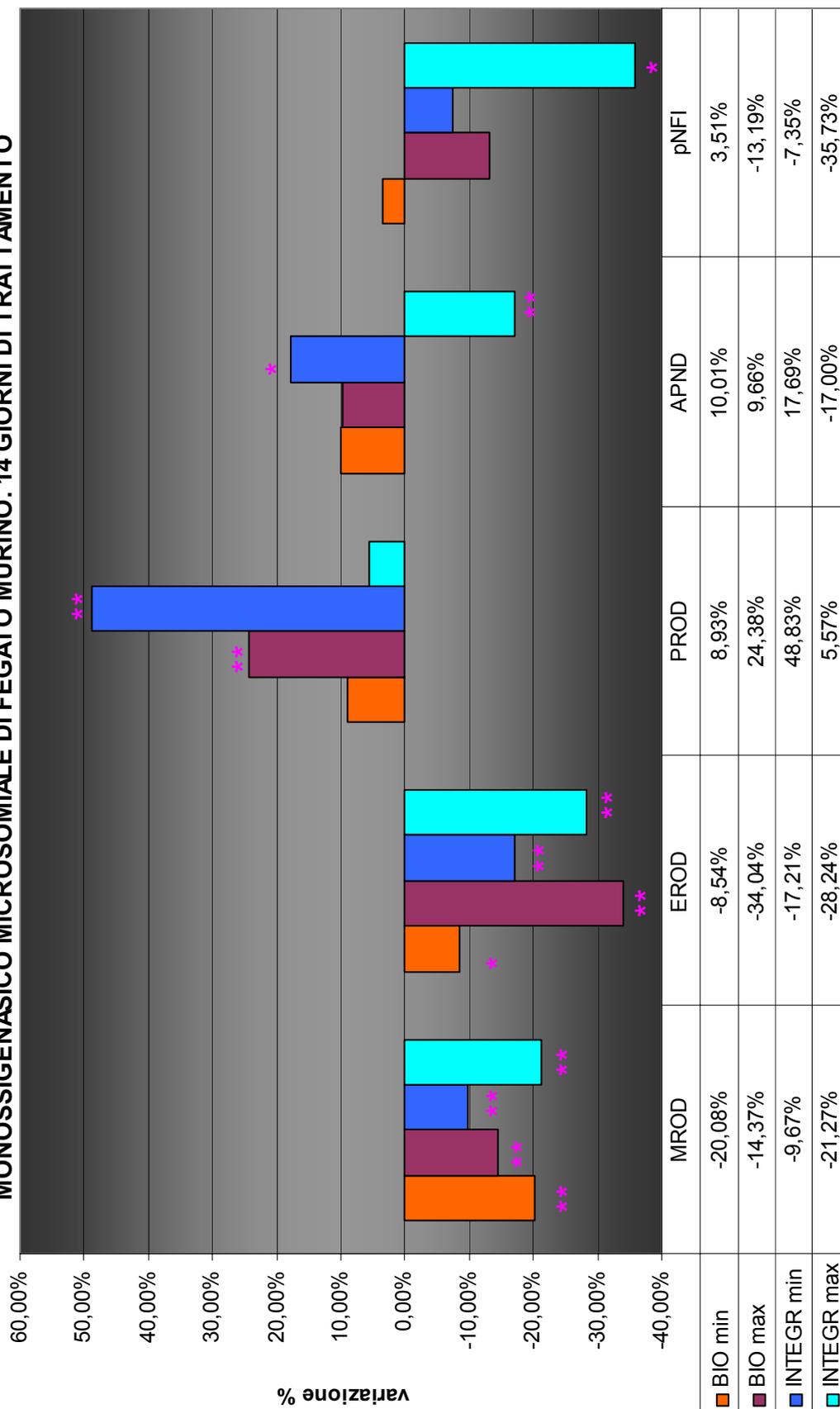
Ogni valore rappresenta la media \pm d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali. Il trattamento è stato effettuato quotidianamente per 7 giorni consecutivi.

* p<0,05 ** p<0,05 – Wilcoxon

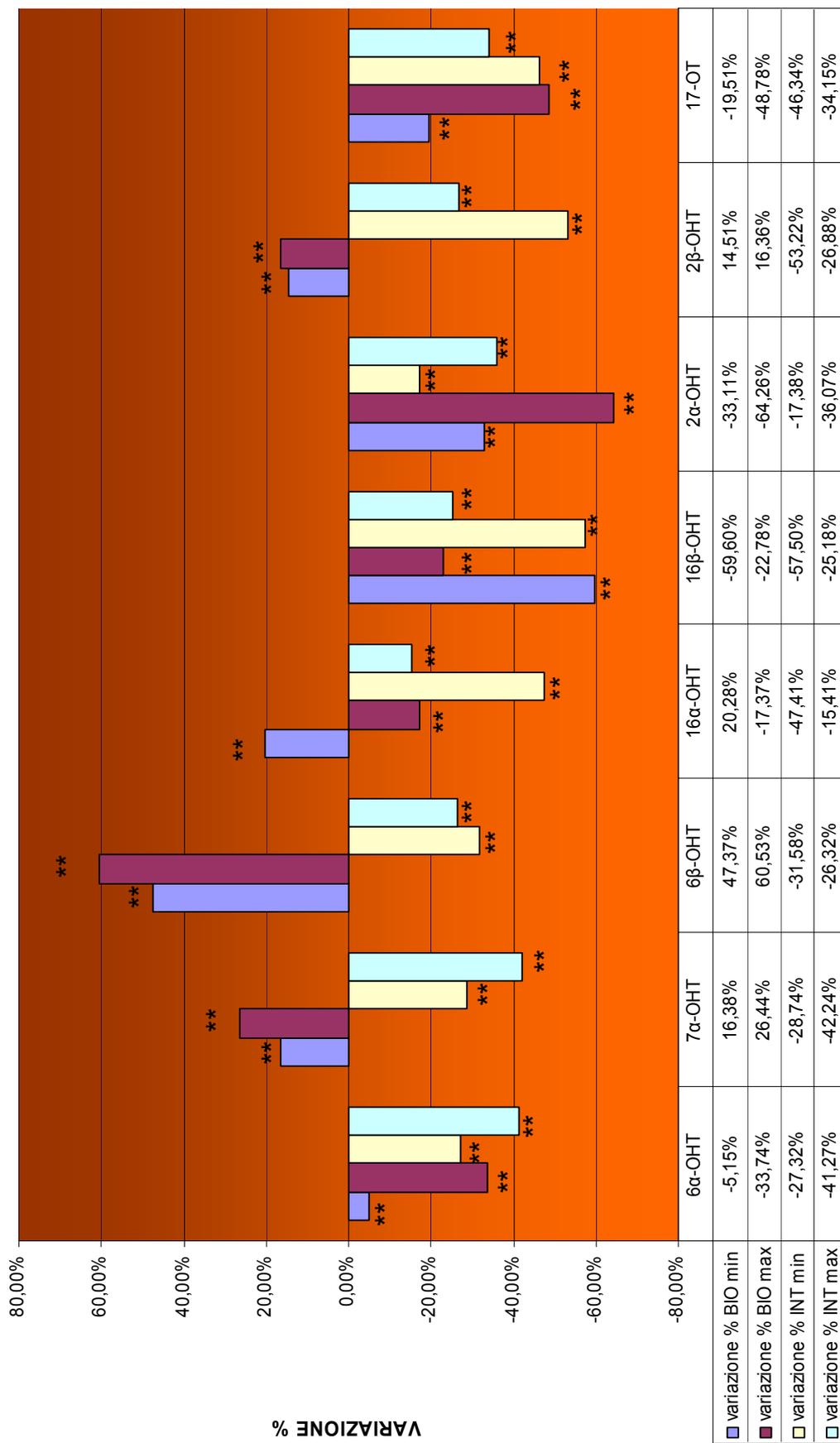
EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO IN MICROSOMI DI FEGATO MURINO. 7 GIORNI DI TRATTAMENTO



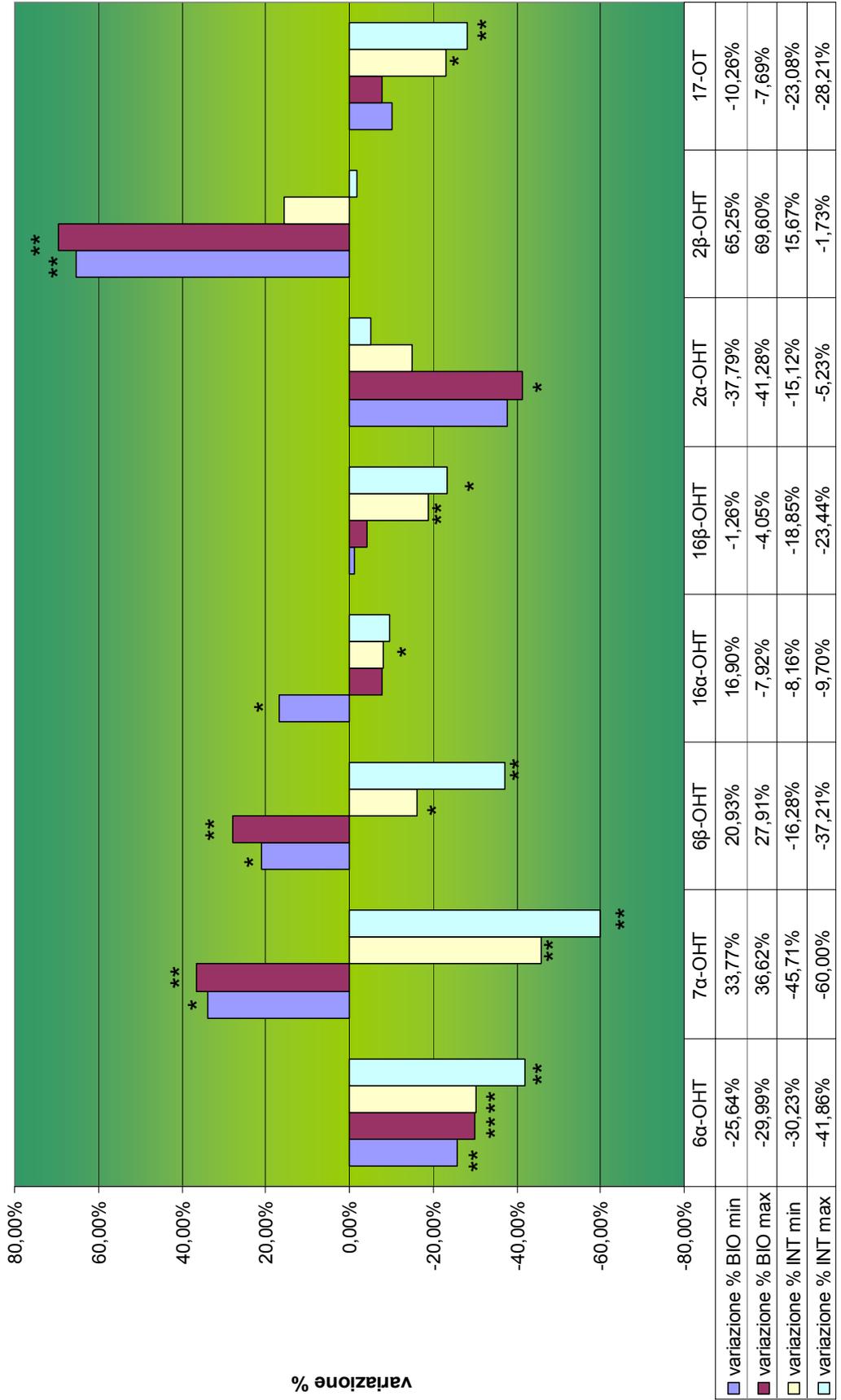
**EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA
MONOSSIGENASICO MICROSOMIALE DI FEGATO MURINO. 14 GIORNI DI TRATTAMENTO**



**EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SULLA TESTOSTERONE
IDROSSILASI IN MICROSOMI EPATICI MURINI. 7 GIORNI DI TRATTAMENTO**



EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SULLA TESTOSTERONE IDROSSILASI IN
MICROSOMI EPATICI MURINI. 14 GIORNI DI TRATTAMENTO



6.2 RENE

6.2a Mela Biologica

7 giorni:

La somministrazione protratta per 7 giorni ha causato una significativa ($p < 0,01$) induzione dell'attività della EROD sia alla dose minima (+302%) sia a quella massima (+361%), nonché una significativa ($p < 0,01$) induzione (383%) della p-NFI alla dose minima; si registra inoltre una inattivazione significativa ($p < 0,01$) pari al 57% alla dose minima e del 44% alla dose massima della APND, ed una significativa ($p < 0,01$) induzione della PROD alla dose massima del 154%. La TOH ha evidenziato un quadro di generale induzione, all'interno del quale si osserva la più significativa ($p < 0,01$) corrispondente all'attività della 2 β -OHT sia alla dose minima (+111%) sia a quella massima (+169%), nonché una significativa ($p < 0,05$) induzione (+56%) corrispondente all'attività 17-OT alla dose massima.

14 giorni:

L'esposizione protratta per 14 giorni ha condotto ad un aumento significativo ($p < 0,01$) dell'attività enzimatica sia alla dose minima (+293%) sia alla massima (+362%) della EROD; alla dose massima si sono osservate anche induzioni significative ($p < 0,01$) della MROD (174%), della PROD (67%) della APND (66%), mentre alla dose minima si osservato un aumento della PROD del 49%. Per la TOH l'esposizione protratta per 14 giorni ha condotto alla dose minima ad una diminuzione significativa ($p < 0,05$) della 2 β -OHT (-40%), mentre alla dose massima sono stati registrati aumenti significativi ($p < 0,01$)

delle monoossigenasi 6 β -OHT (+348%), 16 β -OHT (+94%), 2 β -OHT (+263%).

6.2b Mela Integrata

7 giorni:

La somministrazione per 7 giorni ha provocato un significativo ($p < 0,01$) aumento dell'attività dell'EROD del 668% alla dose minima, e del 159% alla dose massima, ed un'inibizione significativa ($p < 0,01$) sia alla dose minima che massima della APND, rispettivamente del 40% e del 29%. Per la TOH, la somministrazione per 7 giorni ha provocato una significativa ($p < 0,05$) riduzione dell'attività 2 β -OHT (-46%) alla dose minima, mentre non sono state osservate significative modulazioni alla dose massima.

14 giorni:

Risultati nella stessa direzione per l'EROD sono stati ottenuti per una somministrazione protratta per 14 giorni, sia alla dose minima (+683%, $p < 0,01$) sia alla dose massima (+162%, $p < 0,01$); qui si è inoltre osservata un'induzione ($p < 0,01$) di MROD del 76%, e deboli inattivazioni de APND e pNFI, da un 10% (APND, dose max) ad un 25% (pNFI, dose min). La TOH ha evidenziato significative ($p < 0,05$) riduzioni delle attività 7 α -OHT (-38%), 16 α -OHT (-21%) e 2 β -OHT (-52%, quest'ultima con $p < 0,01$) alla dose minima, mentre alla dose massima sono stati osservati aumenti significativi ($p < 0,01$) nelle attività 7 α -OHT (-61%), 16 α -OHT (-46%).

Le tabelle ed i grafici seguenti riassumono ed illustrano i risultati ottenuti:

TABELLA 4: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO DI RENE MURINO

PARAMETRO (Rene)	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
EROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	17.14±0.26	68.84±6.46**	78.93±0.21**	131.60±7.43**	44.43±2.54**
EROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	17.95±0.52	70.52±0.98**	82.89±1.24**	140.51±2.32**	47.11±1.10**
PROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.39±0.01	0.35±0.03	0.98±0.02**	0.35±0.02	0.45±0.01
PROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.39±0.02	0.58±0.02**	0.65±0.04**	0.34±0.01	0.39±0.02
MROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.45±0.01	1.87±0.43	1.91±0.10*	1.46±0.01	1.33±0.11
MROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.59±0.01	2.05±0.01*	4.36±0.06**	1.67±0.01	2.80±0.20**
APND (7 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	8.60±0.60	3.66±0.16**	4.80±0.10**	5.20±0.61**	6.07±0.06**
APND (14 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	8.40±0.55	5.92±0.01**	13.92±0.19**	6.88±0.17**	7.52±0.09*
pNFI (7 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.24±0.01	1.16±0.01**	0.24±0.01	0.26±0.02	0.21±0.01
pNFI (14 giorni) nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.27±0.01	0.53±0.01**	0.19±0.02**	0.20±0.01*	0.21±0.02*

Ogni valore rappresenta la media ± d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali.

* p<0,05 ** p<0,05 – Wilcoxon

TABELLA 5: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO DI RENE MURINO

PARAMETRO Monoossigenasi associate	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
6α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	2.63±0.22	2.94±0.08	3.24±0.17	2.25±0.04	2.85±0.02
7α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	2.12±0.18	2.75±0.24	2.61±0.05	1.91±0.12	1.90±0.08
6β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	3.83±0.25	4.13±0.01	4.57±0.18*	3.27±0.04	4.05±0.03
16α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.91±0.08	2.66±0.20*	2.26±0.11	2.03±0.09	2.15±0.04
16β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.85±0.05	1.13±0.05*	0.86±0.45**	0.80±0.02	0.76±0.08
2α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.56±0.02	0.72±0.05	0.62±0.08	0.40±0.06	0.41±0.04
2β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.26±0.01	0.55±0.03**	0.70±0.02	0.14±0.04	0.25±0.01
17-OT nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.16±0.01	0.22±0.01	0.25±0.02*	0.20±0.02	0.22±0.02

Ogni valore rappresenta la media \pm d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali. Il trattamento è stato effettuato quotidianamente per 7 giorni consecutivi.

* p<0,05 ** p<0,01 – Wilcoxon

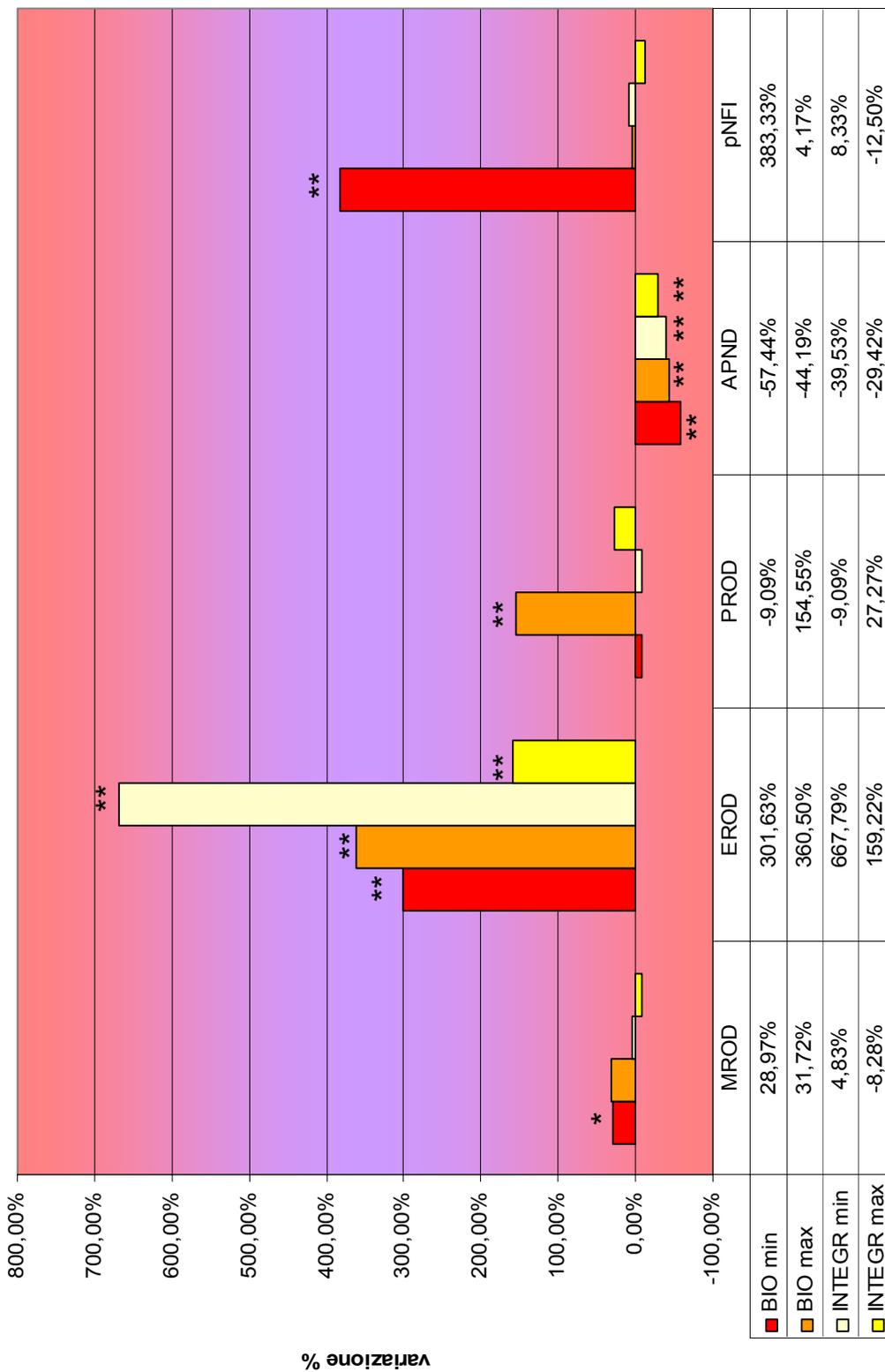
TABELLA 6: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO DI RENE MURINO

PARAMETRO Monoossigenasi associate	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
6α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	2.71±0.20	2.79±0.11	3.35±0.11*	2.28±0.04	2.02±0.11
7α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	2.88±0.03	2.52±0.10	1.21±0.17**	1.42±0.06*	0.89±0.04**
6β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	3.28±0.04	3.44±0.09	14.70±0.01**	3.75±0.04	3.25±0.36
16α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	2.24±0.02	2.43±0.17	2.88±0.14*	1.76±0.04*	1.22±0.21**
16β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.05±0.02	1.06±0.11	2.04±0.04**	0.91±0.03	0.81±0.04
2α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.62±0.05	0.87±0.03	0.67±0.06	0.79±0.07	0.76±0.01
2β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.33±0.03	0.20±0.02*	1.20±0.11**	0.16±0.01**	0.36±0.01
17-OT nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	0.18±0.01	0.18±0.01	0.19±0.02	0.18±0.01	0.17±0.01

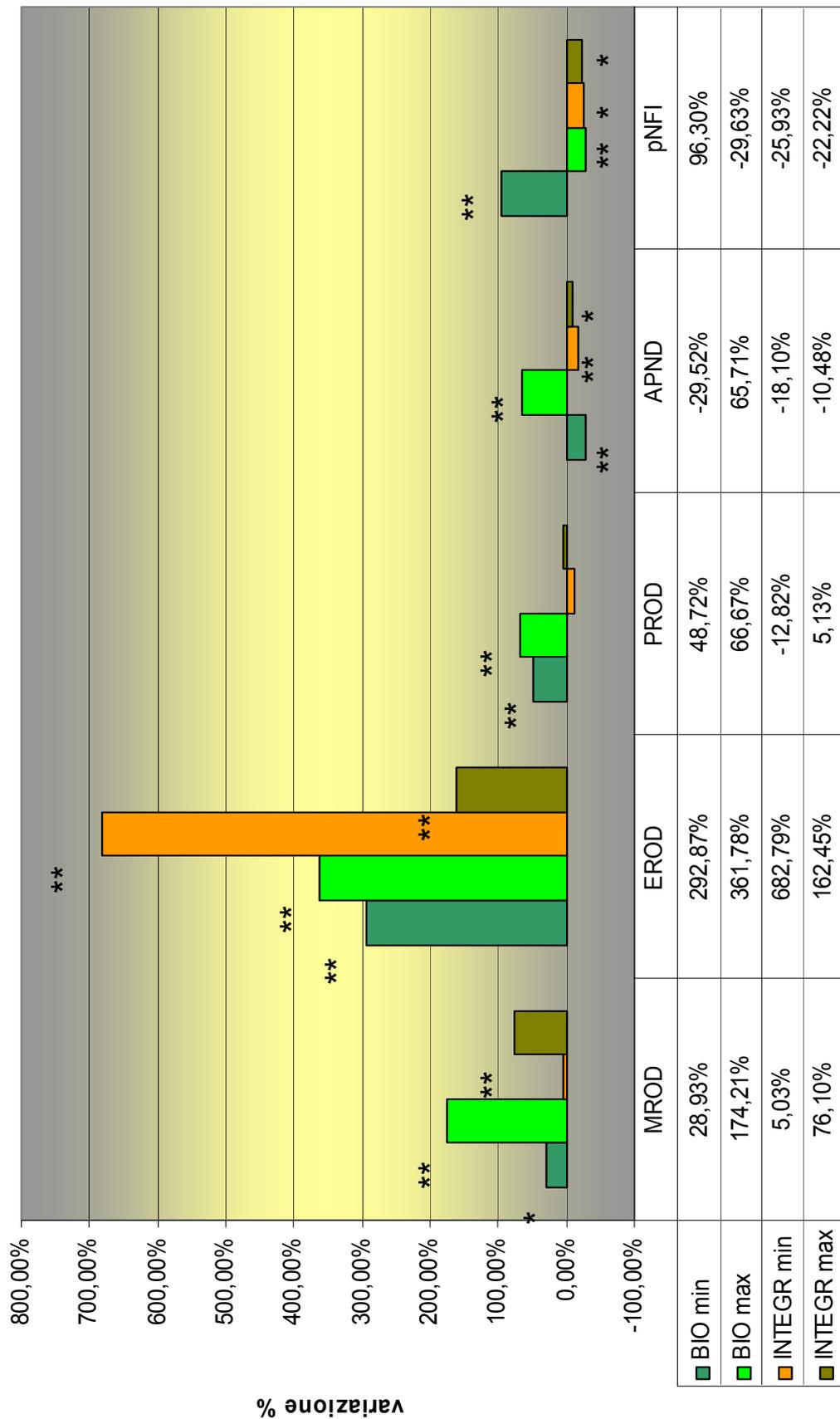
Ogni valore rappresenta la media \pm d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali. Il trattamento è stato effettuato quotidianamente per 14 giorni consecutivi.

* p<0,05 ** p<0,01 – Wilcoxon

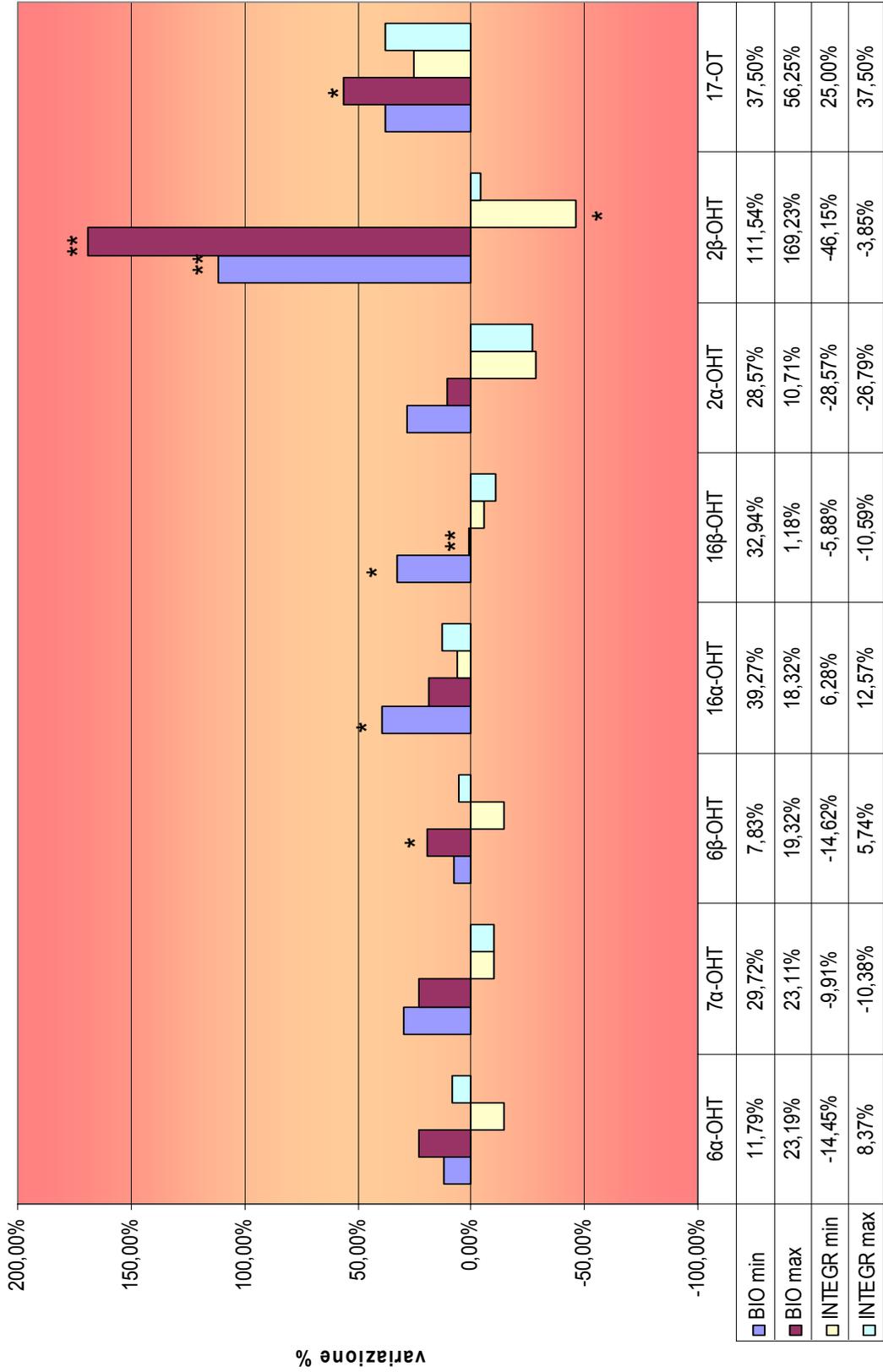
EFFETTI DELLA MELA DA AGRICOLTURA BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO MICROSSOMIALE DI RENE MURINO. 7 GIORNI DI TRATTAMENTO



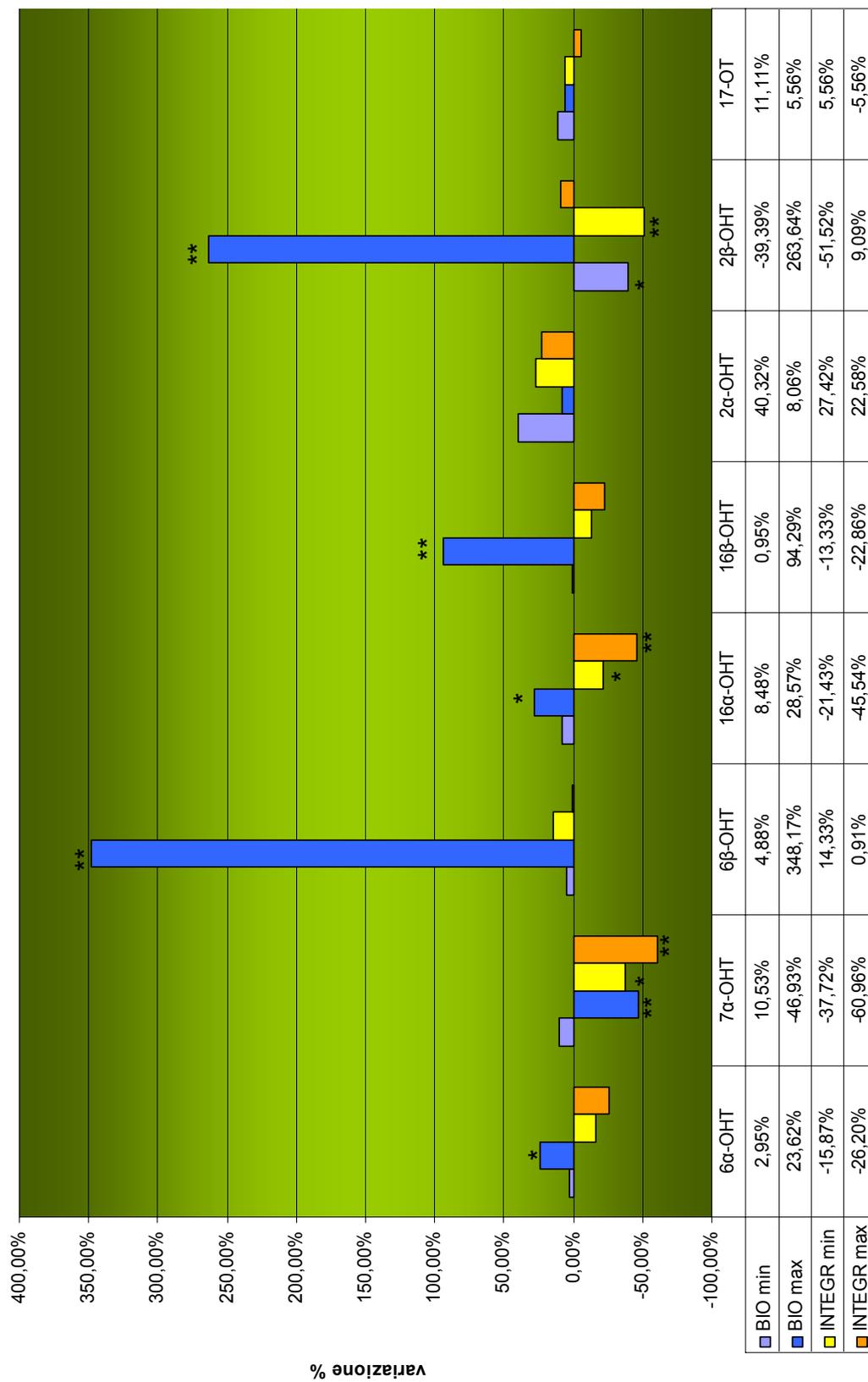
EFFETTI DELLA MELA DA AGRICOLTURA BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO MICROSSOMIALE DI RENE MURINO. 14 GIORNI DI TRATTAMENTO



**EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SULLA TESTOSTERONE
IDROSSILASI IN MICROSOMI DI RENE MURINO. 7 GIORNI DI TRATTAMENTO**



EFFETTI DELLA MELA DA AGRICOLTURA BIOLOGICA ED INTEGRATA SULLA TESTOSTERONE
IDROSSILASI IN MICROSOMI DI RENE MURINO. 14 GIORNI DI TRATTAMENTO



6.3 POLMONE

6.3a Mela Biologica

7 giorni:

L'esperimento della durata di 7 giorni ha condotto a significative riduzioni delle attività EROD e PROD sia alla dose minima ($p < 0.01$, -28% e -60%) sia alla dose massima ($p < 0.05$ -24%, $p < 0.01$ -48%); per quanto riguarda la TOH, questa tendenza viene confermata sia alla dose minima che alla dose massima: in particolare sono state registrate inattivazioni significative ($p < 0.01$) che da un minimo di -8% (6 α -OHT, dose minima) sono arrivate fino ad un -52% (16 β -OHT, dose minima).

14 giorni:

La somministrazione protratta per 14 giorni ha condotto a risultati che illustrano un quadro di generale inattivazione, con minimo di -40% ($p < 0.01$, MROD, dose massima) e punta fino a -83% ($p < 0.01$, EROD, dose massima); unica eccezione, una debole induzione della PROD alla dose massima (+20%, $p < 0.01$). La TOH ha dato invece risultati di andamento contrastante: si sono verificate diverse induzioni, di cui la più alta ha raggiunto un +52% (6 α -OHT, dose massima, $p < 0.01$), ma anche una significativa inattivazione a carico della 2 β -OHT (-55%, dose minima, $p < 0.01$).

6.3b Mela Integrata

7 giorni:

In questo caso, mentre per la MROD alla dose massima è stata registrata un'induzione del 63% ($p < 0,01$), si è osservata una inattivazione pari a -45% per la PROD alla dose minima ($p < 0,01$). Per quanto riguarda la TOH, mentre alla dose minima sono state registrate solo inattivazioni (-25% per 6 α -OHT, -20% per la 16 α -OHT, -37% per la 2 α -OHT, -69% per la 16 β -OHT, dati con $p < 0,01$), alla dose massima sono state osservate sia induzioni, fino ad un massimo di +38% (6 α -OHT, $p < 0,01$), sia inattivazioni (-44%, 16 β -OHT, $p < 0,01$).

14 giorni

L'esperimento condotto per 14 giorni ha evidenziato un andamento di inattivazione, sia per PROD, che per MROD ed EROD. Tutti i dati sono significativi ($p < 0,01$) e vanno da un minimo di -18% (PROD, dose massima) ad un massimo di -77% (EROD, dose minima). La TOH ha mostrato sia attivazioni (fino ad un +22%, 2 α -OHT, dose minima, $p < 0,01$) che inattivazioni raggiungendo un minimo di -53% per la 2 β -OHT alla dose massima ($p < 0,01$).

Le tabelle ed i grafici seguenti riassumono ed illustrano i risultati ottenuti:

TABELLA 7: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOSSIGENASICO DI POLMONE MURINO

PARAMETRO (Polmone)	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
EROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	9.59±0.02	6.84±0.02**	7.23±0.98**	8.19±0.99	11.47±0.03*
EROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	10.58±0.39	4.55±0.18**	1.70±0.04**	2.42±0.02**	3.02±0.06**
PROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	18.75±1.44	7.36±0.90**	9.72±0.80**	10.38±0.99**	15.76±0.97*
PROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	18.05±0.68	18.65±0.14	21.58±0.28**	12.08±0.18**	14.85±0.05**
MROD (7 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	19.97±1.33	15.47±1.90	17.28±1.97*	20.09±0.72	32.54±1.10**
MROD (14 giorni) pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	19.40±1.60	5.95±0.39**	10.40±0.23**	11.38±0.49**	7.40±0.59**

Ogni valore rappresenta la media ± d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali.

* p<0,05 ** p<0,05 – Wilcoxon

TABELLA 8: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO DI POLMONE MURINO

PARAMETRO Monoossigenasi associate	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
6α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	46.83±0.71	43.08±0.91**	45.03±1.10**	35.10±0.57**	64.50±2.12**
7α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	7.77±0.56	4.55±0.56**	4.89±1.08**	5.87±1.59*	8.43±2.11
6β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	40.77±0.70	30.54±4.60**	35.21±2.31**	32.87±3.39**	53.46±6.65**
16α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	13.56±0.01	8.02±0.99**	10.21±1.54**	9.54±0.30**	16.13±0.54**
16β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	6.43±0.09	3.06±0.90**	5.06±0.98	2.01±0.60**	3.58±0.35**
2α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	6.77±0.28	3.90±1.16**	4.65±1.08**	4.27±0.19**	7.35±0.78
2β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	4.60±0.28	3.26±0.74	5.12±0.47	3.80±0.15	5.86±0.22
17-OT nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.73±0.03	1.51±0.37	2.78±0.68*	1.32±0.29	2.24±0.04

Ogni valore rappresenta la media \pm d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali. Il trattamento è stato effettuato quotidianamente per 7 giorni consecutivi.

* p<0,05 ** p<0,05 – Wilcoxon

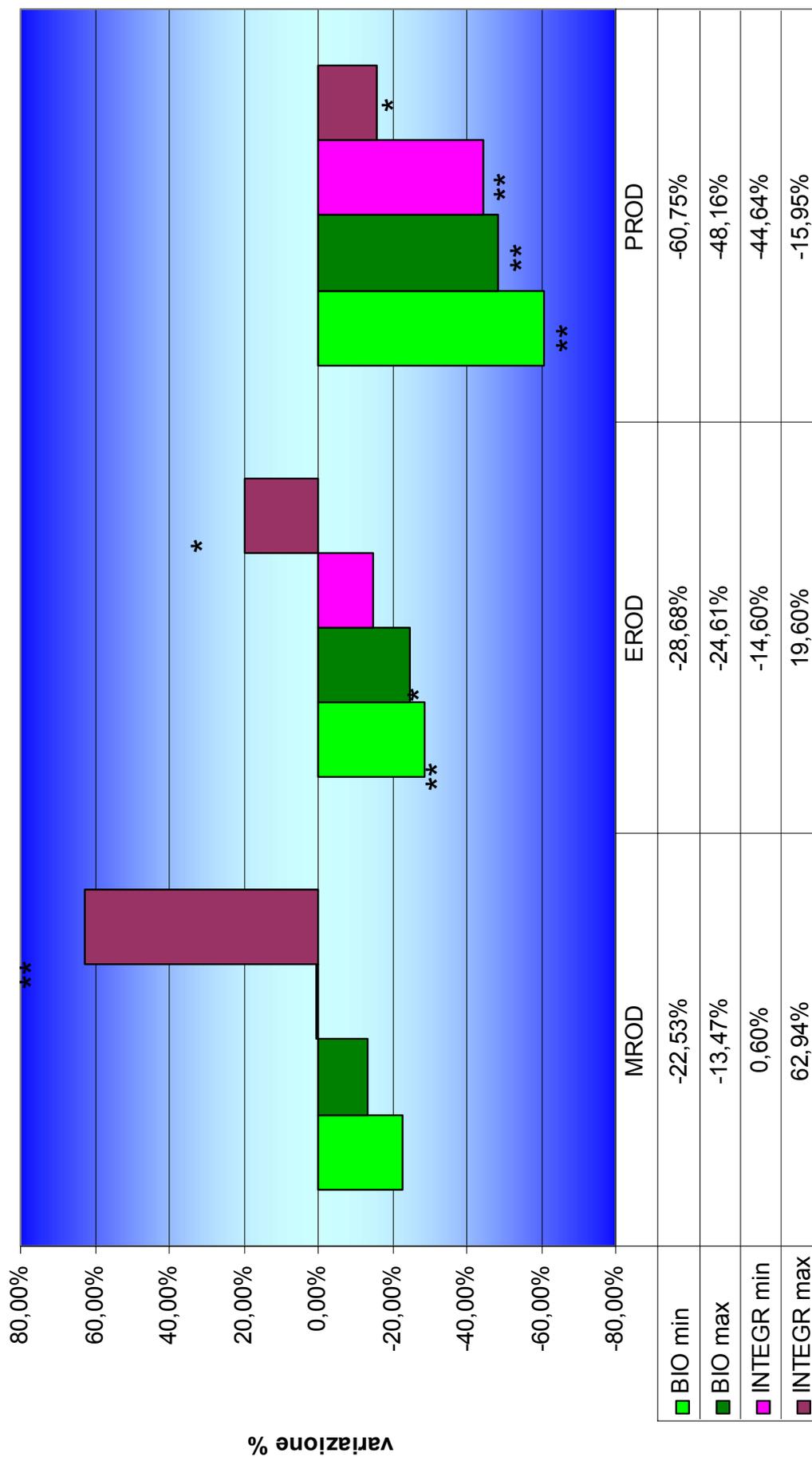
TABELLA 9: EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA MONOOSSIGENASICO DI POLMONE MURINO

PARAMETRO Monoossigenasi associate	Basali (veicolo)	MELA BIOLOGICA		MELA INTEGRATA	
		250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.	250 mg/kg p.c.	500 mg/kg p.c.
6α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	46.60±2.08	54.30±2.03*	70.65±0.78**	56.37±1.53**	41.60±2.31
7α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	7.32±0.34	8.21±0.09	8.70±0.38	7.89±0.33	6.26±0.08
6β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	36.70±2.61	35.80±0.36	45.50±0.42**	37.80±0.30	24.75±0.08**
16α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	14.51±0.14	12.82±0.93*	18.45±0.35**	15.33±0.25	11.00±0.96*
16β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	5.73±0.23	5.07±0.33	6.84±0.28	6.24±0.17	3.77±0.12**
2α-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	4.94±0.09	5.89±0.30	6.07±0.21**	6.03±0.09**	4.51±0.08
2β-OHT pmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	5.67±0.08	5.53±0.31	2.56±0.14**	3.67±0.19**	2.67±0.24**
17-OT nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹	1.60±0.09	1.59±0.13	1.98±0.14	1.93±0.07	1.38±0.04

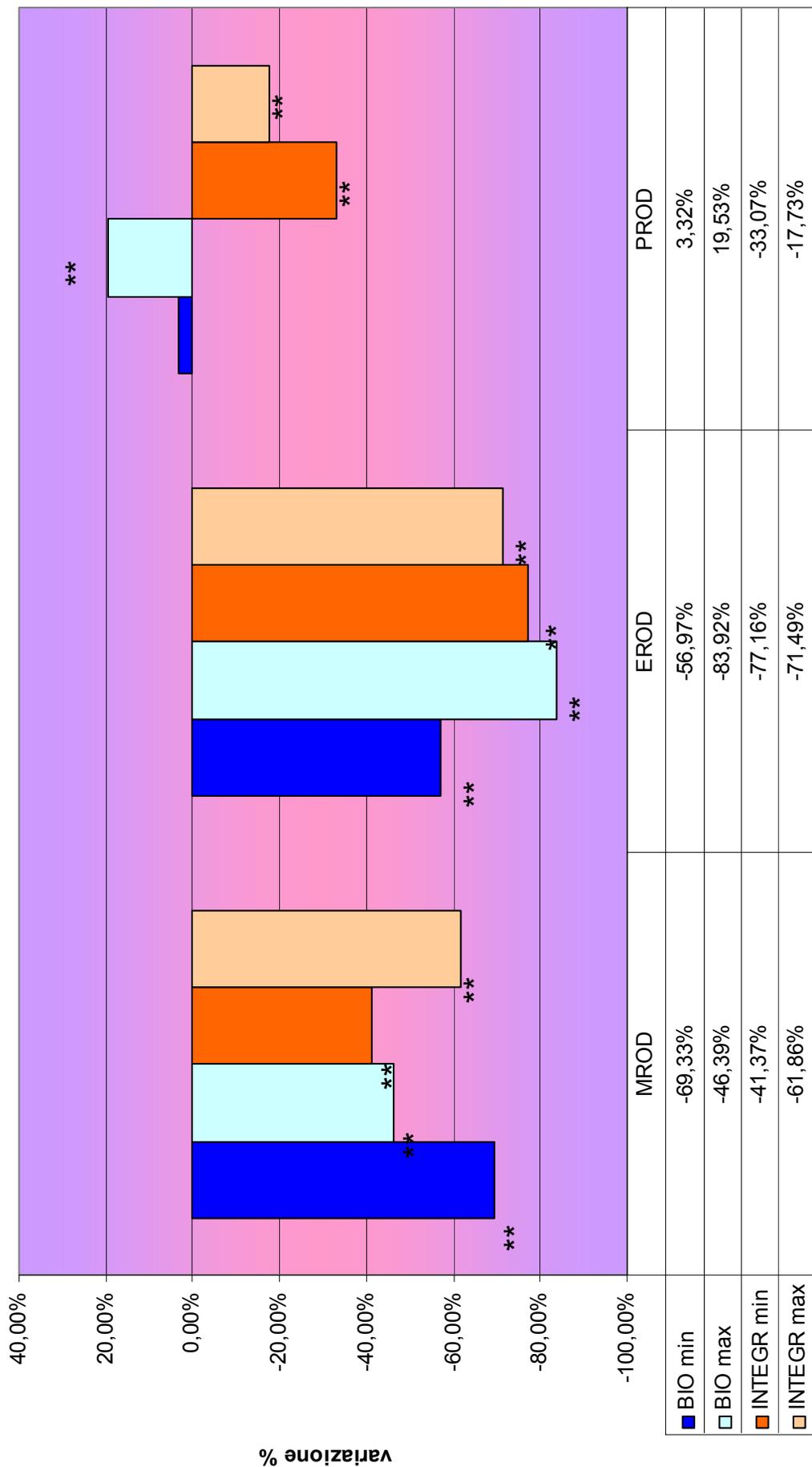
Ogni valore rappresenta la media \pm d.s. di sei esperimenti indipendenti su sei differenti animali. Il trattamento è stato effettuato quotidianamente per 14 giorni consecutivi.

* p<0,05 ** p<0,05 – Wilcoxon

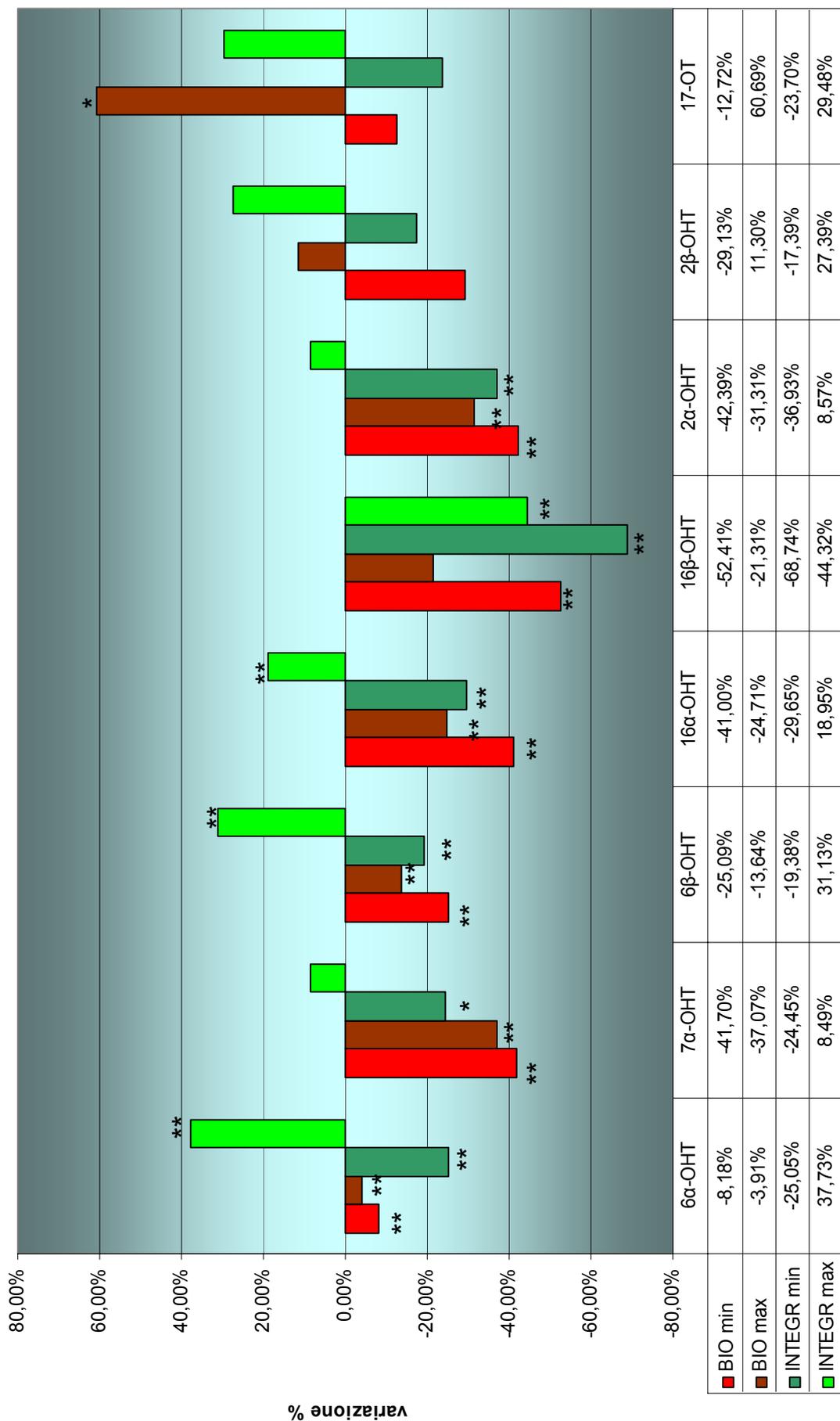
**EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA
MONOSSIGENASICO MICROSSOMIALE DI POLMONE MURINO. 7 GIORNI DI TRATTAMENTO**



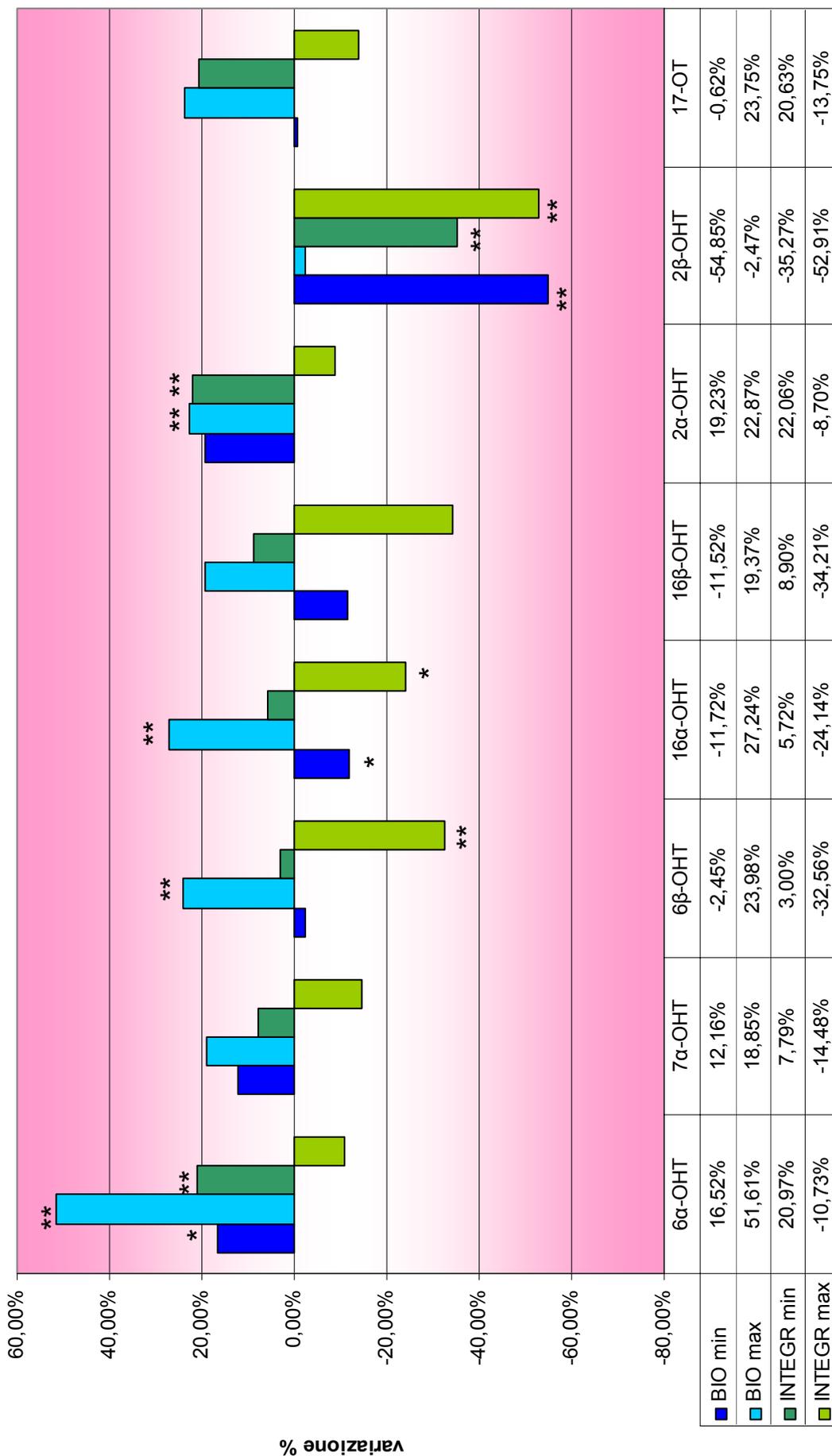
**EFFETTI DELLA MELA DA AGRICOLTURA BIOLOGICA ED INTEGRATA SUL SISTEMA
MONOSSIGENASICO MICROSOMIALE DI POLMONE MURINO. 14 GIORNI DI TRATTAMENTO**



**EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE BIOLOGICA ED INTEGRATA SULLA TESTOSTERONE
IDROSSILASI IN MICROSOMI DI POLMONE MURINO. 7 GIORNI DI TRATTAMENTO**



**EFFETTI DELLA MELA DA COLTIVAZIONE INTEGRATA E BIOLOGICA SULLA TESTOSTERONE
IDROSSILASI IN MICROSOMI DI POLMONE MURINO. 14 GIORNI DI TRATTAMENTO**



CAPITOLO VII

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

E' opinione diffusa che gli enzimi della fase I (soprattutto il citocromo P450 e le FAD-monoossigenasi) siano principalmente di natura bioattivante, mentre quelli della fase II (glutazione S-transferasi o UDP-glucoronil-transferasi, che catalizzano reazioni biosintetiche di coniugazione) tendono, invece, ad essere considerati detossificanti (da un punto di vista tossicologico) per gli xenobiotici. E' stata addirittura teorizzata, dai sostenitori di tale datata concezione, una strategia chemiopreventiva che prevede la supplementazione della dieta con costituenti naturali, siano essi estratti da vegetali, siano esse molecole singole da essi derivate, volta alla modulazione degli enzimi del *drug metabolism* per inattivare gli enzimi di fase I ("i cattivi") ed indurre quelli di fase II ("i buoni"). Tale corrente di pensiero, tuttavia, non è in linea con la letteratura dell'ultimo ventennio, dal momento che l'apparato biotrasformante deve essere considerato nel suo complesso sia attivante, sia detossificante. Infatti, un'enorme quantità di lavori evidenzia come tutti gli enzimi del metabolismo posseggano una natura bivalente bioattivante/detossificante (Paolini M et al. 1998). Tali due funzioni non dipendono dall'enzima, bensì dal substrato che l'enzima stesso deve trasformare. La furilfuramide, additivo alimentare antimicrobico utilizzato in passato, rappresenta un esempio a sostegno di quanto detto: si tratta di un potente cancerogeno, che viene metabolizzato in prodotti finali "inattivi" ad opera delle isoforme CYP1A2 (fase I) (Shimada T. et al., 1990). Il 2-acetilaminofluorene, al contrario, viene trasformato da acetiltransferasi e solfotransferasi (fase II) in molecole altamente

elettrofile e genotossiche. Anche la β -naftilammina viene idrossilata in 1-idrossi-2-amminonaftalene, noto cancerogeno. Quest'ultimo viene poi inattivato dalla UDP-glucuronosil-transferasi, che lo trasforma in β -glucuronide. A questo punto, però, viene scisso dalle β -glucurononidasi (fase III), con liberazione del metabolita cancerogeno. Questi esempi mettono in evidenza come sia possibile ottenere metaboliti reattivi ad opera di enzimi di fase II e III ed altri non pericolosi da parte di enzimi di fase I.

Essendo l'uomo esposto quotidianamente ad una grande moltitudine di sostanze (derivanti da ambiente, dieta, abitudini voluttuari, luoghi di lavoro), ogni eventuale modulazione dell'attività di tali enzimi non può che comportare un aumento del rischio tossicologico individuale (Paolini M et al, 1999). Paradossalmente, quando nel 1985 questa teoria è stata proposta (Guengerich F.P., 1985) ampie rassegne già documentavano la doppia natura bioattivante/detossificante di ogni enzima sia di fase I e II del *drug metabolism*).

Nella presente tesi è stato osservato come la supplementazione di una dieta standard con mela nel topo (derivante sia da coltivazione integrata che biologica) abbia determinato sia effetti di natura induttiva, sia di natura inattivante per le diverse isoforme di citocromo P450 considerate, nei diversi organi presi in esame: induzioni particolarmente marcate, ad esempio, sono state osservate per le isoforme CYP2B1/2, CYP1A1 e CYP1A2 nel rene, ma contemporaneamente sono state evidenziate significative inattivazioni a carico di altre isoforme, negli organi considerati.

I *patterns* di modulazione sono stati piuttosto complessi, e di difficile interpretazione; tuttavia, in questa sede non vi era lo scopo di attribuire a ciascuna modulazione una causa specifica in termini di molecole responsabili di un determinato effetto (sia induttivo che

inattivante): ciò che si è voluto sottolineare è piuttosto la potenzialità che il singolo frutto può avere nell'ambito dell'apparato metabolico.

Per quanto concerne l'analisi comparativa tra le due tipologie di mela in oggetto di studio, non sono state riscontrate sostanziali differenze nel grado di modulazione del metabolismo, pertanto non è possibile definire un tipo di frutto "migliore" dell'altro in termini di pericolosità.

Non ci si stupisca del fatto che l'ingestione abituale di una "semplice" mela possa agire sul metabolismo andando ad alterare in modo così significativo le attività di specifiche famiglie isoenzimatiche, fenomeno che si ripercuote sia sul metabolismo endogeno, sia su quello degli xenobiotici. Peraltro, le osservazioni qui espresse si sposano perfettamente con le evidenze sperimentali riportate nella letteratura scientifica.

Analizzando nel loro insieme i risultati ottenuti, è possibile supporre come il regolare arricchimento della dieta con un unico tipo di frutta possa comportare un rischio, più che un beneficio, per la salute dell'uomo. In pratica arricchire la dieta in maniera continuativa con uno specifico alimento (o peggio ancora, alimentarsi esclusivamente con un determinato alimento – le monodiete), può essere dannoso poiché il complesso di molecole in esso presenti (circa 700 nel caso della mela) può determinare alterazioni metaboliche come quelle descritte, che in ultima analisi potrebbero giocare un ruolo importante nella cancerogenesi alterando i processi metabolici di cancerogeni ubiquitari. In parallelo, si avrebbe inoltre un'alterazione del metabolismo endogeno, dove questi catalizzatori sono fisiologicamente coinvolti (metabolismo della vitamina D, leucotrieni, acidi grassi, etc.), e di eventuali farmaci co-somministrati.

Certamente il messaggio che scaturisce dal presente lavoro non è quello di denigrare le tanto conclamate proprietà salutari della mela, poiché comunque i dati ottenuti, oltre al normale processo estrapolativo, vanno relazionati al complesso della dieta, dove verosimilmente i vari antagonismi e sinergismi derivanti dai cocktail delle diverse componenti di frutta e verdura tendono ad annullarsi: diventa quindi importante sottolineare come la dieta non solo debba essere “ricca” di elementi chemioprotettivi, ma anche “varia” in tipologie di frutta e verdura. Del resto, anche il National Cancer Institute statunitense, una tra le più autorevoli istituzioni internazionali in materia di cancro, ha già da tempo promosso un programma indirizzato all’opinione pubblica volto a sensibilizzare la popolazione nei confronti di un’alimentazione ricca di frutta e verdura: “Five a Day for Better Health” (già aggiornato a “Five to Nine a Day”) è lo slogan con il quale viene diffusa la raccomandazione di consumare 5-9 porzioni di frutta e verdura al giorno, per favorire l’assimilazione di sostanze in grado di proteggere contro le neoplasie.

E’ auspicabile che tale strategia venga perseguita anche da altri enti preposti al controllo della salute pubblica, in modo da enfatizzare gli effetti benefici associati al consumo di elevate quantità di diversi tipi di frutta e verdura, in modo tale da favorire l’eliminazione di cattive abitudini alimentari, troppo spesso causa (sottovalutata) di gravi problemi di salute.

CAPITOLO VIII

BIBLIOGRAFIA

- AMES B.N., GOLD L.S.: “Response to Technical Comment: Cancerogenic Risk Estimation” **Science** (1988); 240: 1045-1047.
- AMES B.N., MAGEAW.R., GOLD L.S.: “Ranking possible cancerogenic hazards” **Science** (1987) 236: 271-280.
- AMES B.N.: “Dietary carcinogens and anticancerogens. Oxygen radicals and degenerative diseases” **Science** (1983); 221: 1256-1264.
- BAER-DUBOWSKA W., SZAEFER H., KRAJKA-KUZNIAK V.,: “Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds” **Xenobiotica** (1998); Aug; 28 (8): 735-43.
- BAILEY Y.,: “Techniques in protein chemistry”; Amsterdam: **Elsevier** (1967); 340-341.
- BAST A.,: “Is formation of reactive oxygen by cytochrome P450 periculous and predictable?” **Trends Pharmacol. Sci.** (1986); 6: 266-270.
- BEIER R.C.: “Natural pesticides and bioactive components in foods”. In Ware GW (ed): “Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.” New York: Springer-Verlag (1989).
- BERKELEY S.F., HIGHTOWER A.W., BEIER R.C., FLEMING D.W., BROKOPP C.D., IVIE G.W., BROOME C.V.,: “Dermatitis in grocery workers associated with high natural concentrations of furanocoumarins in celery” **Ann. Intern. Med.** (1986); 105: 351-355.
- BOX G., HUNTER W.: “Statistics for experiments”; New York: **Wiley** (1978): 80-82.
- BRADY J.F., WANG M.-H., HONG J.-Y., XIAO F., LI Y., YOO J. S.H., NING S.M., FUKUTO J.M., GAPAC J.M., YANG C.S.: “Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase activities and

cytotoxicity by diallyl sulfide” **Toxicol. Appl. Pharmacol.** (1991); 108; 342-354.

• BROCKMÖLLER J., CASCORBI I., KERB R., SACHSE C., ROOTS I.; “Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition” **Toxicol. Lett.** (1998); 102-103: 173-183.

• BROWN T.P., RUMSBY P.C., CAPLETON A.C., RUSHTON C., LEVY L.S.; “Pesticides and parkinson’s disease: is there a link?” **Environ. Health perspect.** (2006); 114 (2): 156-64.

• BRUCE M.; “Microsomal NADPH-cytochrome C-reductase” **Meth. Enzymol.** (1967); 10: 551-53.

• BURCHELL B. and COUGHTRIE M.W.H **Pharmacol. Ther.** (1989); 43: 261-289.

• BURCHELL B., BAIRD S., COUGHTRIE M.V.; “The role of xenobiotic glucuronitating enzymes in drug resistance of tumour tissues and cells” **Princess Takamatsu Symp.** (1990); 21:263-75

• BURKE M., THOMPSON S., ELCOMBE C., HALPERT J., HAAPARANT T., MEYER R.: “Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxy-phenoxazone and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450” **Biochem. Pharmacol.** (1985); 34: 3337-3345.

• CARBONE M., PASS H.I.; “Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen?” **Sem. Cancer Biol.** (2004); 14: 399-405.

• CERUTTI P.: “Prooxidant states and tumor promotion” **Science** (1985); 227: 375-380.

• CHEESMAN & SLATE: “An introduction to free radical biochemistry” **Br. Med. Bull.** (1993); 49: 481-493.

• CHUNG F.L., WANG M.Y., HECHT S.S.; “Effects of dietary indoles and isothiocyanates on N-nitrosodimethylamine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone alpha-hydroxylation and DNA methylation in rat liver.” **Carcinogenesis** (1985); 6(4):539-43.

- DAI R., JACOBSON K.A., ROBINSON R.C., FRIEDMAN F.K.: “Differential effects of flavonoids on testosterone-metabolizing cytochrome P450s” **Life Science** (1997); 61(7): PL 75-80.
- DAKOVIC-SVAJZER K., SAMOJLIK I., RASKOVIC A., POPOVIC M., LAKOVLJEVIC V.: “The activity of liver oxidative enzymes after single and multiple grapefruit juice ingestion” **Exp. Toxicol. Pathol.** Jul (1999); 51 (4-5): 304-8.
- DAS S., TYAGI A.K., HAUR H.; “Cancer modulation by glucosinolates: a review” **Curr. Science** (2000); 79(12):1665-1670.
- DUTTON D., REED G., PARKINSON A.: “Redox cycling of resorufin catalyzed by rat liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase” **Arch. Biochem. Biophys.** (1989); 268 (2): 605-616.
- EBERHARDT M.V., LEE C.Y. and LIU R.H.: “Antioxidant activity of fresh apples” **Nature** (2000); 405: 903-4.
- FLODSTROM S., WARNGARD I., LJUNGQUIST S., AHLBORG U.G.: „Inhibition of metabolic cooperation in vitro and enhancement of enzyme altered foci incidence in rat liver by the pyrethroid insecticide fenvalerate” **Arch. Toxicol.** Jan (1998); 61 (3): 218-23.
- FOSCHI S., BRUNELLI A., PONTI I.: “Terapia vegetale” (1985), Edagricole Bologna.
- GALLI C.: “Valutazione del rischio tossicologico di xenobiotici assunti con la dieta” **Tossicologia degli alimenti** (1999) (ed.UTET).
- GOLD L.S., BACKMAN G.M., HOOPER N.K., PETO R.: “Ranking the potential carcinogenic hazards to workers from exposures to chemicals that are tumorigenic in rodents” **Environ. Health Perspect.** (1987); 76: 211-219.
- GOLD L.S., DE VECIANA M., BACKMAN G.M., MAGAW R., LOPIPERO P., SMITH M., BLUMENTHAL M., LEVINSON R., BERNSTEIN L., AMES B.N.: “Chronological supplement to the Carcinogenic Potency Database”. Standardized results of animal bioassays published through December 1982. **Environ. Health Perspect.** (1986); 84.

- GOLD L.S., SAWYER C.B., MAGAW R., BACKMAN G.M., DE VECIANA M., LEVINSON R., HOOPER N.K., HAVANDER W.R., BERNSTEIN L., PETO R., PIKE M.C., AMES B.N.: “A carcinogenic potency database of standardized results of animal bioassay” **Environ. Health Perspect.** (1984); 58: 9-319.
- GOLD L.S., SLONE T.H., BACKMAN G.M., EISENBERG S., DA COSTA M., WONG M., MANLEY N.B., ROHRBACH L., AMES B.N.: “Third chronological supplement to the Carcinogenic Potency”. Database Standardized results of animal bioassays published through December 1986 and by the National Toxicology Program Through June 1987. **Environ. Health Perspect.** (1989); 84.
- GRILLI S., ANCORA G., RANI P., VALENTI A.M., MAZZULLO M.: “Cancerogenesi e fitofarmaci” Giornate fitopatologiche (1989) ed.CLUEB.
- GUENGERICH F.P.; “Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites” **CRC Crit. Rev. Toxicol.** (1985); 14(3):259-307.
- GUENGERICH F.P.; “Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity” **Chem. Res. Toxicol.** (2001); 14 (6): 611-650.
- HALLIWELL B.: “Free radical and antioxidants: a personal view” **Nutr. Rev.** (1994); 52: 235-265.
- HARBORNE J.B.: “The role of phytoalexins in natural plant resistance.” In GreenMB, Hedin PA (eds): “Natural Resistance of Plants to Pest. Roles of Allelochemicals (ACS Symposium 296).” Washington, DC: **American Chemical Society** (1986); 22-35.
- HONG J.-Y., PAN J., GONZALES F.J., GELBOIN H.V., YANG C.S.: “The induction of a specific form of cytochrome P450 (P-450j) by fasting” **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1987); 142: 1077-1083.
- ISHIZAKI H., BRADY J.F., NING S.M., YANG C.S.: “Effect of phenethyl isothiocyanate on microsomal N- nitrodimethylamine (NMDA) metabolism and other monooxygenase activities” **Xenobiotica** (1990);20: 255-264.
- KALL M.A., VANG O., CLAUSEN J.: “Effect of dietary broccoli on human in vivo drug metabolism enzymes: evaluation of caffeine,

oestrone and chlorzoxazone metabolism” **Carcinogenesis** (1996); 17: 793-9.

• KELLERMAN G., SHAW C.R., LUYTEN-KELLERMAN M.: “Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and broncogenic carcinoma” **N. Engl. J. Med.** (1973); 289: 934-937.

• KUO S.M.: “Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism” **Crit. Rev. Oncog.** (1997); 8 (1): 47-69.

• LAMPE J., KING I., LI S., GRATE M., BARALE K., CHEN C., FENG Z. and POTTER J.: “Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P4501A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets” **Carcinogenesis** (2000); 21: 1157-1162.

• LAMPE J.W.: “Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanism of action in human experimental studies” **Am. J. Clin. Nutr.** Sep (1999); 70 (suppl.3): 475s-490s.

• LOWRY O., ROSENBROUGH H., FARR A., RANDAL R.: “Protein measurement with Folin phenol reagent” **J. Biol. Chem.** (1951); 193: 265-275.

• LUBET R., MAYER M., CAMERON J., RAYMOND W., BURKE M., WOLF T., GUENGRICH F.: “Dealkylation of pentoxyresorufin. A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P450 by phenobarbital and other xenobiotics in rat” **Arch. Biochem. Biophys.** (1985); 238: 43-48.

• MARQUIS J.K.: “Contemporary issues in pesticide toxicology and pharmacology” Kanger (1986), Basel.

• MAZEL P.: “Fundamentals of drug metabolism and drug disposition” Baltimore: Williams and Wilkins (1971): 546-550.

• NASH T.: “Colorimetric estimation of formaldehyde by means of Hantzsch reaction” **Biochem. J.** (1993); 55: 416-421.

• NEBERT D.W., NEGISHI M.: „Multiple forms of cytochrome P450 and the importance of their molecular biology and evolution“ **Biochem. Pharmacol.** 31: 2311-2315.

- OMURA T., SATO R.: “The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidences for its hemoprotein nature” **J. Biol. Chem.** (1964); 293: 2370-2378.
- ORELLANA M., GUAJARDO V.; “Cytochrome P450 activity and its alteration in different disease” **Rev. Med. Chile** (2004); 132: 85-94.
- PAN J.-M., HONG J.-Y., MA B.L., XIAO F., PARANAWITHANA S., YANG C.S.: “Transcriptional activation of P450IIB1 gene in rat liver by diallyl sulfide” **FASEB J.** (1991); 5, A1161.
- PAOLINI M., BIAGI G.L., BAUER C., CANTELLI FORTI G.; “On the nature of non-genotoxic carcinogens. A unified theory including NGCs, co-carcinogens and promoters” **Mutat. Res.** (1992); 281(4):245-246.
- PAOLINI M., BIAGI G., CANTELLI FORTI G., BAUER C.: “Futher mechanism of non-genotoxic carcinogenesis” **Trends Pharmacol. Sci.** (1994); 15(9): 322-323.
- PAOLINI M.: “Acetylator genotype and Parkinson’s disease” **Lancet** (1998); 351: 141-142.
- PAOLINI M., CANTELLI-FORTI G., PEDULLI G.F., PEROCCO P., ABDEL-RAHMAN S.Z., LEGATOR M.S.: “Co-cancerogenic effect of β -carotene” **Nature** (1999); 398: 760-761.
- PAOLINI M, ANTELLI A., POZZETTI L., SPETLOVA D., PEROCCO P., VALGIMIGLI L., PEDULLI G.F., CANTELLI-FORTI.G.: “Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats” **Cancerogenesis** (2001); 22(9): 1483.1495.
- PARE’ P.W., TUMLINSON J.H.: “Plants volatiles as a defence against insect herbivores” **Plant. Physiol.** Oct (1999); 121: 325-332.
- PLATT J., MOLITOR E., DOEHMER J., DOGRA S., OESCH F.:”Genetically engineered W79 chinese Hamster cell. Expression of purified cytochrome P4502B1 monooxygenase activity” **Biochem. Toxicol.** (1989);4:1-5.

- PLUMB G.W., CHAMBERS S.J., LAMBERT N., WANIGATUNGA S., WILLIAMSON G.: "Influence of fruit and vegetable extracts on lipid peroxidation in microsomes containing specific cytochrome P450s" **Food Chem.** (1997); 60(2): 161-164.
- REINKE L., MAYER M.: "p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol" **Drug Metab. Disp.** (1985); 13: 548-552.
- RESTANI P.: "La catena alimentare: importante veicolo e sistema di concentrazione delle sostanze tossiche" **Tossicologia degli alimenti** (1999) (ed.UTET).
- ROCK C.L., LAMPE J.W., PATTERSON R.E.: "Nutrition, genetics and risks of cancer" **Ann. Rev. Pub. Health** (2000); 21: 47-64.
- SAVAS U., GRIFFIN K., JOHNSON E.: "Molecular mechanisms for cytochrome P450 induction by xenobiotics: an expanded role for nuclear hormone receptors" **Mol. Pharmacol.** (1999); 56: 851-857.
- SCHEDIN P., ELIAS A. "Multistep tumorigenesis and the microenvironment" **Breast Cancer Res.** (2004); 6:93-101.
- SCHUSTER I.: "Cytochrome P450: biochemistry and biophysics" **Taylor and Francis** (1989), London.
- SHIMADA T., YAMAZAKI H., SHIMURA H., TANAKA R., GUENGERICH F.P.; "Metabolic deactivation of furylfuramide by cytochrome P450 in human and rat liver microsomes" **Carcinogenesis** (1990); 11(1):103-110
- SIESS M.H., LECLERC J., CANIVENC-LAVIER M.C., RAT P., SUSCHETET M.: "Heterogeneous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes" **Toxicol. Appl. Pharmacol.** (1995); 130(1): 73-78.
- SONG B.-J., GELBOIN H.V., PARK S.S., YANG C.S., GONZALES F.J.: "Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P450: transcriptional regulation of the rat enzyme" **J. Biol. Chem.** (1986); 261: 16689-16697.

- SPENCER S., XUE L.A., KLENZ E.M., TALALAY P.: “The ptency of inducers of NAD(P)H: (quinone-acceptor) oxydoreductase parallels their efficiency as substratesfor glutathione transferases. Structural and electronic correlation” **Biochem. J.** (1991); 2273: 711-714.
- STEINMETZ K.A., POTTER J.D.: “Vegetables, fruit and cancer. II. Mechanisms” **Cancer Causes Control** (1991); Nov 2 (6): 427-42.
- TALALAY P., FAHEY J.W.; “Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism” **J. Nutr.** (2001); 131:3027s-3033s.
- TEEL R.W., HUYNH H.: “Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-linked enzyme activity” **Cancer Lett.** (1998) Nov(27); 133(2): 135-41.
- TEPHPLY T.R. and BURCHELL B.: “UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes” **TIPS Reviews Jul** (1990); 11: 276-279.
- TEYSSIER C., AMIOT M.J., MONDY N., AUGER J., KAHANE R., SIESS M.H.: “Effect of onion consumption by rats on hepatic drug-metabolism enzymes” **Food Chem. Toxicol.** Oct (2001); 39(19): 981-7.
- TSAO A.S., Kim E.S., HONG W.K., “Chemioprevention of cancer. **CA Cancer J. Clin.** (2004); 54: 150-180.
- VAN DER HOEVEN T.: “Assay of hepatoc microsomal tetosterone hydroxylase by high-performance liquid chromatografy” **Anal. Biochem.** (1984); 138: 57-65.
- VELONA’ T.: “Gli additivi involontari: residui tossici derivanti dalle materie prime o dalla contaminazione dell’ecosistema” **Tossicologia degli alimenti** (1999) (ed.UTET).
- YANG C.S., BRADY J.F., HONG J.-Y.: “Dietary effects on cytochrome P450, xenobiotic metabolism, and toxicity” **FASEB J.** Jan (1992); 6: 737-744.