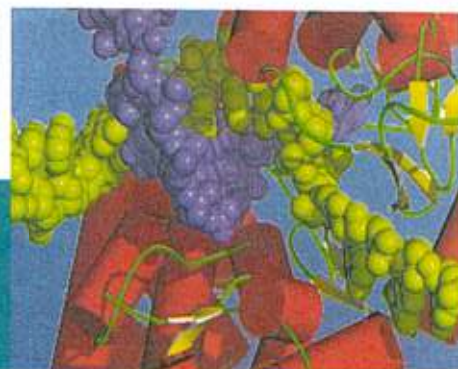


11



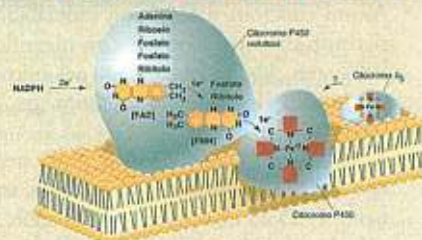
I citocromi P450 e le ossido nitrico sintasi

Linda J. Roman

Associate Professor, University of Texas Health Science Center at San Antonio

Bettie Sue Siler Masters

Robert A. Welch Distinguished Professor in Chemistry, University of Texas Health Science Center at San Antonio



11.1 • INTRODUZIONE 426

11.2 • I CITOCROMI P450: PROPRIETÀ E FUNZIONI 426

11.3 • SISTEMI DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI AI CITOCROMI P450 427

11.4 • I CITOCROMI P450: NOMENCLATURA E ISOFORME 430

11.5 • I CITOCROMI P450: SUBSTRATI E FUNZIONI FISIOLOGICHE 431

11.6 • I CITOCROMI P450: INDUZIONE E INIBIZIONE 440

11.7 • LE OSSIDO NITRICO SINTASI: PROPRIETÀ E FUNZIONI ENZIMATICHE 444

11.8 • LE OSSIDO NITRICO SINTASI: ISOFORME E FUNZIONI FISIOLOGICHE 446

ASPETTI CLINICI

11.1 Iperplasia congenita delle surrenali (CAH): deficit di CYP21A2 435

11.2 Produzione di ormoni steroidei durante la gravidanza 435

11.3 Inibizione dei citocromi P450: interazioni tra farmaci ed effetti indesiderati 438

11.4 Ruolo del citocromo P450 2E1 nella epatotossicità indotta da acetaminofene 440

11.5 Induzione dei citocromi P450: interazioni tra farmaci ed effetti indesiderati 441

11.6 Polimorfismi genetici degli enzimi P450 443

11.7 Polimorfismi genetici della NADPH-citocromo P450 reduttasi: sindrome di Antley-Bixler 443

11.8 Meccanismo d'azione del Sildenafil 449

11.9 Iperproduzione di ossido nitrico nello shock settico 450

11.10 Storia ed effetti biologici della nitroglicerina 451

11.11 Utilizzo terapeutico dell'ossido nitrico somministrato per via inalatoria 452

11.12 Ruolo della eNOS nella disfunzione endoteliale 452

Concetti chiave

- I citocromi P450 catalizzano l'incorporazione di un atomo di ossigeno sia in substrati naturali sia in xenobiotici (composti "estranei"). Contengono un gruppo eme (ferro-protoporfina IX); il ferro è ridotto dagli elettroni ceduti da una reduttasi contenente FAD o FMN. Il loro spettro di assorbimento deriva, in tutte le isoforme, dal quinto legame assiale del ferro dell'eme, instaurato con un residuo di cisteina.
- L'ossigenazione degli steroidi dà origine a prodotti modificati in regioni ben definite e con inserimento stereospecifico dell'ossigeno, prodotti che sono essenziali per il differenziamento sessuale (androgeni ed estrogeni) e per l'equilibrio metabolico ed elettrolitico (corticosteroidi e mineralcorticoidi).

- Alcuni citocromi P450 hanno una minore specificità di substrato e concorrono al metabolismo di composti esogeni, dando origine a prodotti maggiormente polari che vengono eliminati. Alcuni prodotti sono più tossici dei loro substrati originali, ma le loro successive modificazioni metaboliche ne annullano gli effetti nocivi. I farmaci sono, per la maggior parte, metabolizzati nel reticolo endoplasmatico da differenti e specifici citocromi P450. Frequentemente si hanno interazioni tra farmaci.
- Alcuni citocromi P450 sono inducibili, mentre altri sono espressi costitutivamente. Sono state identificate 57 isoforme di P450 nell'uomo; 50 di esse si trovano nel reticolo endoplasmatico e richiedono per la loro attività catalitica una NADPH-citocromo P450 reduttasi.
- L'ossidrilazione mitocondriale degli steroidi necessita di elettroni che il NADPH fornisce, in sequenza, tramite una reduttasi contenente FAD ad una proteina ferro-zolfo, l'adrenodossina, che a sua volta li cede, infine, al citocromo P450.
- È stato dimostrato che nell'uomo, a carico dei citocromi P450 e delle NADPH-citocromo P450 reduttasi, sono riscontrabili polimorfismi genetici. Le mutazioni possono causare un ridotto metabolismo dei farmaci e un anormale metabolismo degli steroidi sessuali.
- L'ossido nitrico (NO) è una molecola "segnale" prodotta tramite una reazione di monossigenazione catalizzata da ossido nitrico sintasi (NOS) che contengono FAD, FMN e un eme in una stessa molecola, attiva sotto forma di omodimero. Il composto NO deriva dal gruppo guanidinico della L-arginina, attraverso la formazione di N-idrossi-L-arginina quale intermedio di reazione.

- Le NOS sono costituite da due distinti domini proteici, uno dei quali contiene FAD e FMN, mentre l'altro contiene un eme. Questi domini sono connessi tra loro da una sequenza dotata di affinità per la calmodulina. Il legame di Ca^{2+} -calmodulina a questa sequenza è essenziale per il trasferimento di elettroni da un dominio all'altro. Sono anche necessari tetraidrobiopterina e Zn.
- Le NOS sono codificate da tre geni distinti, la cui espressione dà luogo a NOSI (NOS neuronale), NOSII (NOS inducibile) e NOSIII (NOS endoteliale). La NOSI è espressa in modo costitutivo principalmente nel muscolo scheletrico e nei neuroni del sistema nervoso sia centrale che periferico. Questa isoforma è attivata dal legame con la calmodulina e le molecole di NO prodotte agiscono da neurotrasmettitori o da modulatori della contrattilità muscolare.
- La NOSII è sintetizzata principalmente dai neutrofilii, dai macrofagi, dagli astrociti e dagli epatociti. La sua sintesi è indotta da citochine; la calmodulina risulta legata alla molecola già in condizioni basali. La NOSII agisce nella risposta immunitaria precoce e l'NO prodotto dalla catalisi funge da agente citotossico contro i patogeni.
- La NOSIII è espressa principalmente nelle cellule endoteliali vascolari, adesa alla membrana delle cavole tramite residui di miristoile e di palmitoile. Espressa in modo costitutivo, è attivata dal Ca^{2+} . Le molecole di NO prodotte dalla NOSIII agiscono da vasodilatatore in quanto, legandosi alla guanilato ciclasi delle cellule muscolari lisce adiacenti, determinano un rilassamento delle pareti dei vasi.

11.1 • INTRODUZIONE

I citocromi P450 costituiscono una particolare famiglia di emoproteine, presenti in batteri, funghi, insetti, piante, pesci, mammiferi e primati, che catalizzano reazioni di monossigenazione (inserimento di un atomo di ossigeno a partire dall'ossigeno molecolare) in un gran numero di composti strutturalmente differenti. Sono substrati di questo sistema enzimatico sia composti endogeni, come il colesterolo, gli ormoni steroidi e gli acidi grassi, sia sostanze esogene, come farmaci, additivi alimentari, sostanze presenti nel fumo di sigaretta, pesticidi e prodotti chimici ingeriti, inalati o assorbiti per via cutanea. I citocromi P450 sono coinvolti (1) nella biosintesi degli ormoni steroidi; (2) nel metabolismo di acidi grassi, prostaglandine, leucotrieni e retinoidi; (3) nell'inattivazione o attivazione di agenti terapeutici; (4) nella conversione di prodotti chimici in molecole altamente reattive che possono causare danni indesiderati alle cellule; e (5) nei processi di inibizione o induzione enzimatica che possono dar luogo ad interazioni tra farmaci, con effetti nocivi per l'organismo.

Le ossido nitrico sintasi sono enzimi con due domini proteici, in quanto posseggono un dominio emico (o ossigenasico) e un dominio flavinico (o reduttasico). Questi enzimi catalizzano la formazione di ossido nitrico, molecola gassosa altamente reattiva nonché radicale libero che, a seconda del tessuto in cui viene prodotto, svolge funzioni nella neurotrasmissione, nella regolazione emodinamica o nella risposta immunitaria. Come i citocromi P450, anche le ossido nitrico sintasi sono enzimi che contengono un gruppo eme e che catalizzano reazioni di monossigenazione dei loro substrati usando meccanismi analoghi di catalisi. Di seguito verranno discussi in dettaglio sia i citocromi P450 sia le ossido nitrico sintasi, focalizzando l'attenzione sulle somiglianze e sulle differenze tra i due sistemi enzimatici.

11.2 • I CITOCROMI P450: PROPRIETÀ E FUNZIONI

I citocromi P450 sono proteine integrali di membrana contenenti un singolo gruppo prostetico, una ferro-protoporfirina IX (eme). Il ferro emico dei citocromi P450 è in grado di formare sei legami di coordinazione, quattro con i quattro atomi di azoto del nucleo tetrapirrollico dell'anello porfirinico e due con ligandi assiali. Uno dei legami assiali (quello denominato

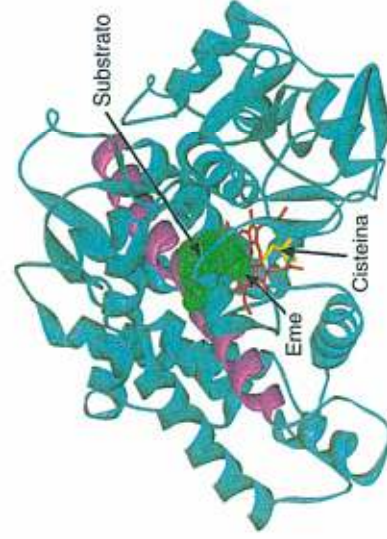


Figura 11.1 Modello del sito attivo del CYP2C5 di mammifero che mostra il gruppo prostetico, la protoporfirina IX (in rosso), con il suo ligando cistein-tiolato (in giallo) legato al ferro emico. Il substrato diclofenac, farmaco antinfiammatorio non steroideo (in verde) è nel sito attivo del P450. L'elica I (in fucsia) attraversa la molecola dell'enzima ed è una delle caratteristiche strutturali che più facilmente permettono l'identificazione dei citocromi P450.

Generato da Protein Data Bank file 1NR6, deposited by M. R. Wester, E. F. Johnson, and C. D. Stout, using WebLab Viewer Lite (Molecular Simulations, Inc.).

“prossimale”) si stabilisce con il gruppo sulfidrilico di un residuo di cisteina posto in prossimità dell'estremità carbossi-terminale del citocromo P450 stesso (Figura 11.1), mentre l'altro sito di legame assiale (denominato “distale”) può essere vuoto - libero da ligando - (dando così origine ad un addotto pentacoordinato, l'eme ad alto spin) oppure occupato da ossigeno, CO, NO, acqua o altri ligandi (dando luogo ad un addotto esacordinato, l'eme a basso spin). Lo stato di spin dell'eme descrive il livello di occupazione degli orbitali *d* del ferro conseguente alla presenza del ligando e ne rende possibile una distinzione spettroscopica.

Tutti i citocromi P450 sono molecole di forma triangolare, come viene mostrato in Figura 11.1, molto simili fra loro. La molecola presenta un 50% di struttura secondaria ad alfa elica, mentre la struttura tridimensionale restante è rappresentata da foglietti beta e da altre strutture secondarie; una lunga elica I attraversa tutta la molecola proteica dietro l'eme. La struttura tridimensionale di base è conservata in tutti i citocromi P450 noti, anche se alcune posizioni amminoisidiche possono essere diverse e alcuni elementi strutturali minori possono mancare. Le proteine di mammifero hanno una sequenza *N*-terminale che permette loro di ancorarsi alla membrana e alcune altre sequenze di associazione alla membrana che rendono possibile un profondo inserimento di queste proteine nella membrana stessa.

I citocromi P450 devono il loro nome al caratteristico spettro di assorbimento che si ottiene quando il CO è legato alla forma ridotta, ferrosa, dell'eme. Lo spettro di assorbimento della molecola mostra un picco con un massimo di assorbimento a circa 450 nm (Figura 11.2); da ciò il nome P450, che sta per pigmento con assorbimento a 450 nm. Questo spettro è caratteristico di una proteina con un gruppo eme ad essa legato tramite un tiolo. Analogamente a ciò che avviene con il ferro emico dell'emoglobina, nei citocromi P450 il CO si lega al ferro dell'eme con maggiore affinità di quanto non avvenga per l'ossigeno ed è perciò un potente inibitore della funzione di questi citocromi.

La reazione generale catalizzata da un citocromo P450 è:



dove NADPH è un donatore di due elettroni e il substrato (S) può essere uno steroide, un acido grasso, un farmaco o un altro composto chimico che abbia un gruppo alchilico (alcane o alchene) o un anello aromatico o eterociclico che possa fungere da sito di ossigenazione. La reazione catalizzata consiste in una monossigenazione e l'enzima è una monossigenasi, dato che catalizza l'incorporazione nel substrato di uno solo dei due atomi dell'ossigeno molecolare.

11.3 • SISTEMI DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI AI CITOCROMI P450

I due elettroni richiesti nella reazione complessiva di monossigenazione sono forniti dall'NADPH, ma c'è un problema di base da risolvere, in quanto il NADPH è un donatore di due elettroni, mentre il citocromo P450, con il suo singolo eme, ne può accettare solo uno alla volta. Il problema viene risolto dalla presenza di una reduttasi flavoproteica NADPH-dipendente, che accetta simultaneamente i due elettroni dall'NADPH, ma è in grado di trasferirli uno alla volta o ad un proteina ferro-zolfo che ha funzione di trasportatore intermedio

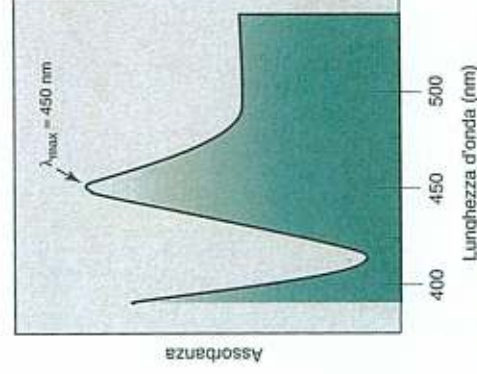


Figura 11.2 Spettro di assorbimento del citocromo P450 saturato con monossido di carbonio. La forma ridotta del citocromo P450 lega il monossido di carbonio formando un addotto con un massimo di assorbimento a circa 450 nm; per questo motivo il citocromo è stato denominato P450.

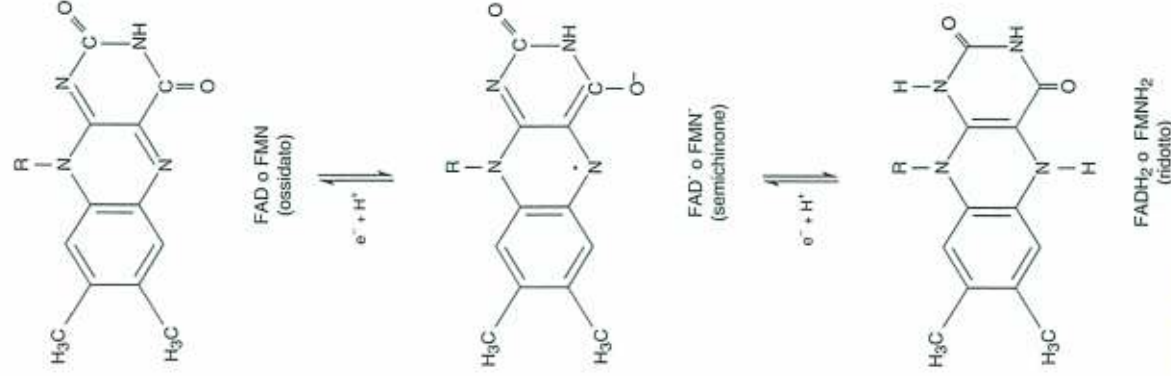


Figura 11.3 L'anello isoloassazinico di FMN o FAD nella forma ossidata, semichinonica (parzialmente ridotto da 1 elettrone) o completamente ridotto (da 2 elettroni).

o direttamente al citocromo P450. Il gruppo redox attivo della flavoproteina è l'anello isoloassazinico, che è specificamente adatto a svolgere questo compito in quanto può esistere sia nello stato completamente ossidato sia in stati ridotti da uno o due elettroni (Figura 11.3). Il trasferimento degli elettroni dal NADPH al citocromo P450 avviene tramite due diversi sistemi di trasporto degli elettroni, presenti esclusivamente l'uno nei mitocondri e l'altro nel reticolo endoplasmatico (i cosiddetti "microsomi").

Nel reticolo endoplasmatico la flavoproteina donatrice di elettroni è necessariamente la NADPH-citocromo P450 riduttasi

Molti citocromi P450 di mammifero sono profondamente inseriti nel lato citoplasmatico del reticolo endoplasmatico (isolabile sperimentalmente come "frazione microsomale") degli epatociti, delle cellule del rene e del corticosurrene, dell'ovaio, del testicolo e del tratto respiratorio. Cinquanta delle 57 isoforme di P450 isolate nell'uomo appartengono al tipo microsomale. I citocromi P450 microsomiali utilizzano un'unica NADPH-citocromo P450 riduttasi, una proteina periferica di membrana con una massa di 76.6 kDa che contiene, quali gruppi prostetici per il trasporto degli elettroni, sia il flavin adenin dinucleotide (FAD) sia il flavin mononucleotide (FMN). La struttura cristallografica dell'isoforma purificata nell'uomo è mostrata in Figura 11.4. Fino alla caratterizzazione delle ossido nitrico sintasi, la P450 riduttasi era l'unica flavoproteina di mammifero conosciuta che contenesse sia FAD che FMN. L'NADPH cede gli elettroni alla porzione contenente FAD della riduttasi e l'FMN funziona da "flavina di uscita", trasferendo i due elettroni, uno alla volta, al citocromo P450. Poiché una singola molecola di flavina può esistere nella forma ridotta con uno o due elettroni e poiché due molecole di flavina sono legate alla riduttasi, l'enzima può ricevere gli elettroni dal NADPH e conservarli tra le due flavine prima di cederli ad uno dei numerosi citocromi P450 microsomiali (Figura 11.5).

Il meccanismo completo grazie al quale i citocromi P450 catalizzano la monossigenazione dei loro substrati è mostrato in Figura 11.6. Il ciclo di reazione inizia con il legame del substrato alla forma nativa, a basso spin ed esacoordinata, dell'eme ferrico, che viene convertita in un eme ferrico ad alto spin pentacoordinato. Solo dopo il legame con il substrato, un primo elettrone viene trasferito all'eme, riducendo il ferro alla forma ferrosa, ad alto spin e pentacoordinata. In assenza di substrato, gli elettroni non possono essere trasferiti all'eme, in quanto il potenziale redox dell'eme (-300 mV) è più negativo, in quelle condizioni, di quello della porzione della flavoproteina contenente FMN (-270 mV) e il trasferimento sarebbe pertanto termodinamicamente sfavorito. In seguito al legame del substrato, si verifica un cambiamento di conformazione nella struttura proteica che circonda il ferro emico, il potenziale redox dell'eme diventa meno negativo (-230 mV) e ciò permette al ferro del P450 di essere ridotto (Figura 11.6). Ora l'ossigeno può legarsi all'eme, che è nella forma ferrosa, e viene così facil-

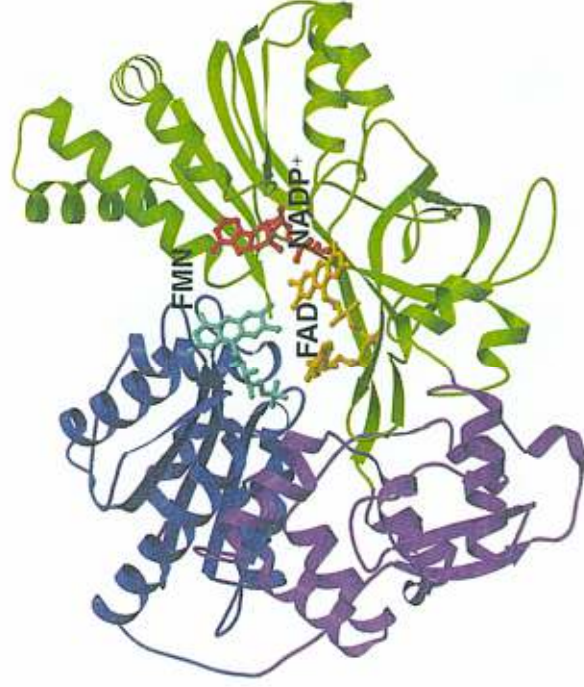


Figura 11.4 Rappresentazione a nastro della citocromo P450 riduttasi umana, basata sulla struttura cristallografica. Sono presenti 3 domini: il dominio che lega l'FMN (in blu), il dominio che lega FAD/NADPH (in verde) e il dominio di collegamento (in viola) interposto tra gli altri due. I cofattori sono rappresentati con modelli a sfere a bastoncini: FMN, azzurro; FAD, giallo; NADP⁺, rosso. La figura è stata ottenuta usando il programma Molscript (Kraulis, P. J. Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24:946, 1991). Fornita da Dr. Jung-Ja P. Kim, Professor of Biochemistry, Medical College of Wisconsin.

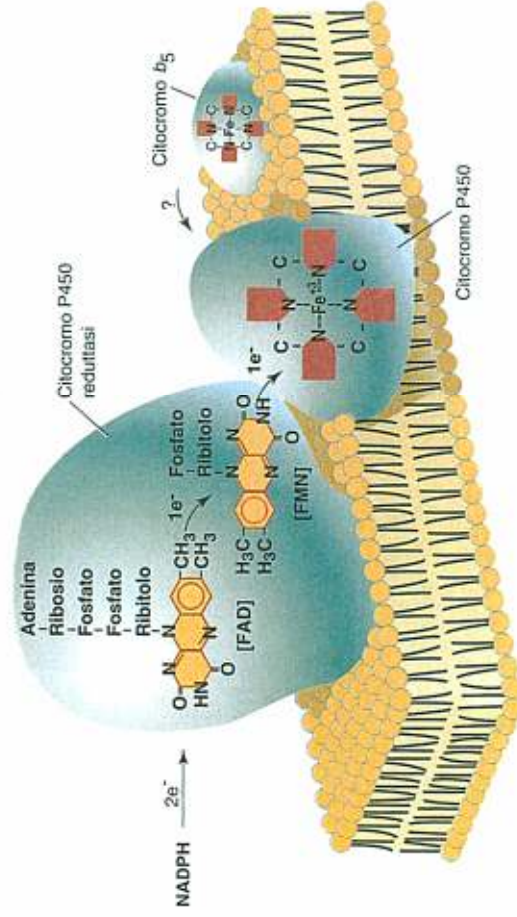
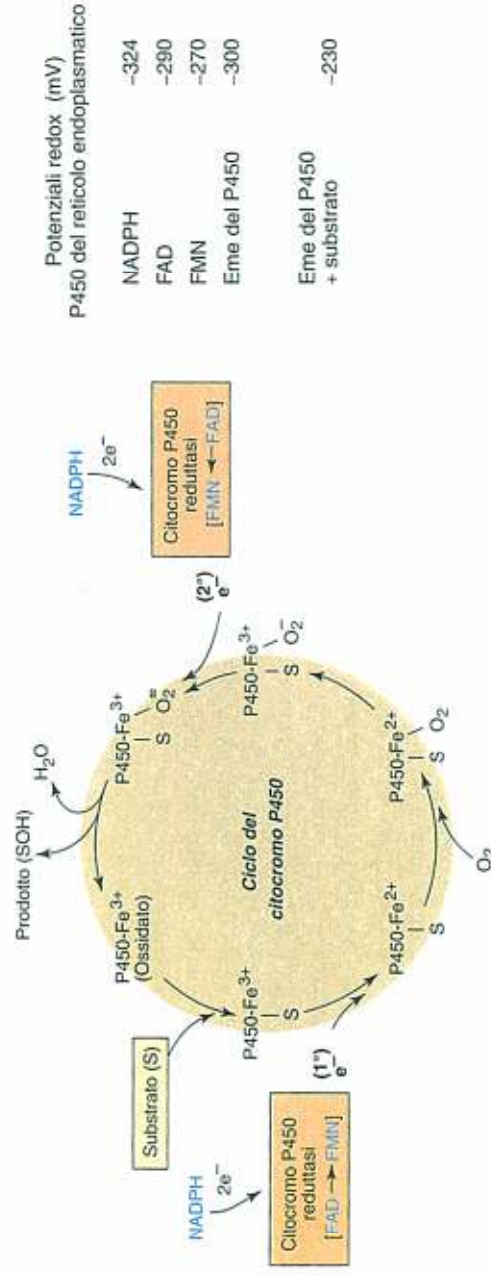


Figura 11.5 Costituenti del sistema del citocromo P450 nel reticolo endoplasmatico (frazione microsomale). La NADPH-citocromo P450 riduttasi è legata alla membrana, come proteina periferica, tramite la sua coda idrofobica, mentre il citocromo P450 è completamente immerso (come proteina integrale) nella membrana stessa. È rappresentato anche il citocromo b_5 , che può partecipare a particolari reazioni mediate dal citocromo P450.



Potenziali redox (mV)
P450 del reticolo endoplasmatico

NADPH	-324
FAD	-290
FMN	-270
Eme del P450	-300
Eme del P450 + substrato	-230

Figura 11.6 Ciclo di reazioni del citocromo P450. Lo schema mostra il legame con il substrato, il trasferimento del primo e del secondo elettrone dalla NADPH-citocromo P450 riduttasi e il legame con la molecola di O_2 . Sono mostrati anche i potenziali redox dei vari componenti del sistema.

tato il trasferimento del secondo elettrone. Successivamente, l'ossigeno molecolare è attivato e scisso; un atomo è inserito nel substrato (monossigenazione), mentre l'altro atomo reagisce con due protoni e due elettroni e forma H_2O .

Il legame tra il citocromo P450 e la riduttasi è di natura più elettrostatica che idrofobica e nel fegato i livelli di P450 sono molto più elevati di quelli della riduttasi: il rapporto tra le due proteine è infatti di 10:1 - 20:1. Se uno specifico citocromo P450 ha una maggiore affinità per la riduttasi, il flusso degli elettroni va preferenzialmente verso questo citocromo. Devono pertanto esservi dei meccanismi in grado di permettere che anche i citocromi con minore affinità per la riduttasi possano ricevere elettroni. In alcuni casi, il legame con il substrato induce un aumento sia dell'affinità sia della velocità di associazione del complesso P450/riduttasi; questo meccanismo appare ragionevole, dato che un P450 "vuoto" che monopolizzasse la riduttasi la sottrarrebbe alla sua funzione e non sarebbe produttivo.

In alcune reazioni il trasferimento del secondo elettrone può non avvenire direttamente tramite la P450 riduttasi, ma può compiersi tramite il citocromo b_5 , una piccola emoproteina (15,2 kDa) che può a sua volta essere ridotta sia dalla P450 riduttasi sia da un'altra flavoproteina microsomale, la NADH-citocromo b_5 riduttasi. Alcune reazioni catalizzate da specifici citocromi P450 richiedono il citocromo b_5 per esprimere il loro livello ottimale di attività enzimatica, probabilmente in quanto il "piccolo" citocromo b_5 (1) altera l'affinità dell'associazione P450/riduttasi, (2) altera l'affinità del P450 per un substrato particolare oppure (3) aumenta la velocità del trasferimento del secondo elettrone all'eme del P450.

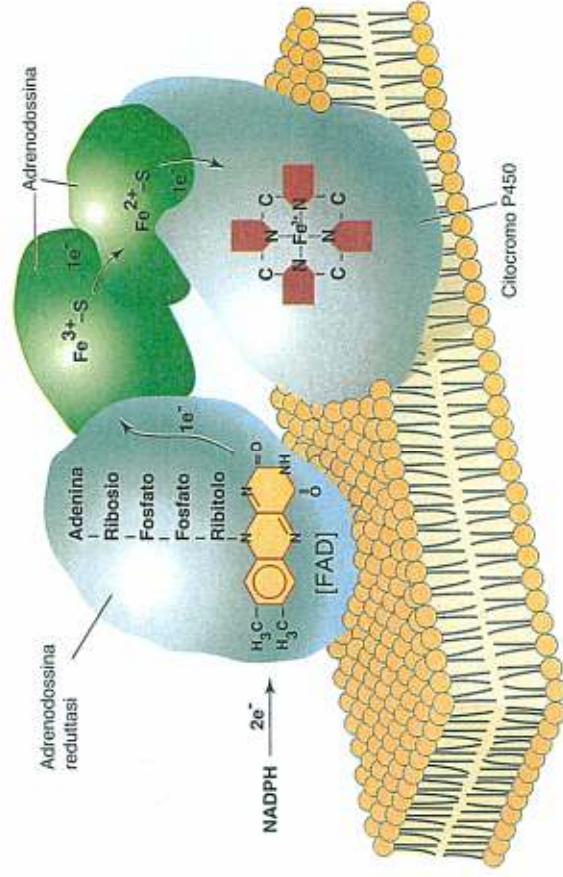


Figura 11.7 **Costituenti del sistema del citocromo P450 nei mitocondri.** Il citocromo P450 è una proteina intrinseca della membrana mitocondriale interna. La NADPH-adrenodossina riducente e l'adrenodossina (ADR) sono proteine periferiche, non immerse nella membrana.

Nei mitocondri, la flavoproteina donatrice di elettroni è la NADPH-adrenodossina riducente

I citocromi P450 mitocondriali, isolati dalle membrane interne dei mitocondri, sono coinvolti nelle reazioni di ossidrilazione degli steroidi. Sette delle 57 isoforme isolate nell'uomo sono di questo tipo. Questo sistema di riduzione richiede due proteine aggiuntive: la NADPH-adrenodossina riducente (con una massa di 51 kDa), che presenta il FAD come unico gruppo prostetico, e l'adrenodossina, una proteina ferro-zolfo (Fe-S) di 12.5 kDa deputata alla formazione del prodotto, il P450 con l'eme ridotto (Figura 11.7). L'adrenodossina riducente è solo debolmente associata alla membrana interna del mitocondrio e non può direttamente cedere né il primo né il secondo elettrone al ferro emico del P450. Una seconda proteina, l'adrenodossina, anch'essa debolmente associata alla membrana mitocondriale interna, contiene un centro ferro-zolfo che si comporta da centro redox per la molecola e funziona da "shuttle" di elettroni tra il FAD dell'adrenodossina riducente e il ferro emico del citocromo P450 mitocondriale. Una molecola di adrenodossina riceve, quindi, un elettrone dal NADPH tramite la sua riducente flavoproteica, dopodiché interagisce con una seconda adrenodossina, che a sua volta trasferirà il proprio elettrone ad uno specifico citocromo P450. I componenti del sistema mitocondriale del citocromo P450 vengono sintetizzati nel citosol come precursori a maggiore peso molecolare, trasportati poi nel mitocondrio e, infine, maturati da proteasi che li trasformano in proteine mature, a minor peso molecolare.

11.4 • I CITOCROMI P450: NOMENCLATURA E ISOFORME

A causa del gran numero di citocromi P450 che sono stati identificati (più di 7000 fino a febbraio 2008), è stato necessario elaborare una classificazione di questi enzimi in gruppi funzionalmente distinti e una loro nomenclatura. Il sistema scelto si basa su una prima suddivisione che tiene conto delle identità relative delle sequenze amminoacidiche. Innanzitutto, la superfamiglia del citocromo P450 è suddivisa in famiglie i cui membri presentano un'identità di sequenza maggiore del 40%. La singola famiglia viene designata dal prefisso "CYP" (acronimo derivante da *cytochrome P450*), seguito da un numero arabo (es. CYP1, CYP2, CYP3, ecc.). Le famiglie sono ulteriormente divise in sottofamiglie, in cui l'identità di sequenza tra le varie proteine è maggiore del 55%. Le sottofamiglie si identificano per l'aggiunta al numero arabo di una lettera maiuscola (es. CYP1A, CYP1B, CYP1C, ecc.). Ancora, i singoli membri di ciascuna sottofamiglia sono numerati nell'ordine con cui sono stati identificati (es. CYP1A1, CYP1A2, CYP1A3, ecc.). Sebbene i citocromi P450 siano enzimi, i termini "isoenzima" o "isozima" non sono generalmente usati per descrivere queste proteine, mentre sono usati i termini "forma" o "isoforma".

Nelle Tabelle 11.1 e 11.2 sono riportate le isoforme note dei citocromi P450 umani. Ci

TABELLA 11.1 • Citocromi P450 umani coinvolti nel metabolismo di composti esogeni

Famiglia di CYP	Isoforme	Substrati specifici	Inibitori specifici	Induttori specifici	
1	1A1	Benzo(a)pirene, diclofenac	Ketoconazolo	Benzo(a)pirene	
	1A2	Benzo(a)pirene, warfarina	Ciprofloxacina	Erba di San Giovanni	
	1B1	Benzo(a)pirene, aflatoxina B1	Tamoxifene	NC*	
	2	2A6	Acetaminofene, nicotina	Cannabidolo	Desametazone
		2A7	NC	NC	NC
		2A13	Esametilfosforamide	NC	NC
		2B6	Diazepam, mefenitoina	Ketoconazolo	Rifampicina
3	2C8	Taxolo, ibuprofene, verapamil	Chinino	Fenobarbital	
	2C9	Amitriptilina, naprossene	Sulfafenazolo	Rifampicina	
	2C18	Imipramina, metadone	NC	Rifampicina	
	2C19	Diazepam, omeprazolo	Isoniazide	Rifampicina	
	2D6	Fluvastatina, codeina, risperidone	Chinidina	Dimetilsolfossido	
	2E1	Acetaminofene, alotano	Nasturzio d'acqua	Isoniazide, etanolo	
	2F1	Naftalene, stirene	NC	NC	
	2J2	Bufuralolo	NC	NC	
	2R1, 2S1	NC	NC	NC	
	2U1, 2W1	NC	NC	NC	
3	3A4	Eritromicina, nifedipina, codeina, warfarina, terfenadina	Troleandomicina, ketoconazolo	Cortisolo, rifampicina, fenobarbital	
	3A5	Verapamil, prevastatina	NC	Desametazone	
	3A7	Acido retinoico, codeina, cortisolo	DHEA	NC	
	3A43	Testosterone	NC	NC	

*NC, non ben caratterizzato.

sono 57 isoforme suddivise in 18 famiglie e 41 sottofamiglie. Il genoma umano presenta, inoltre, altri 58 pseudogeni *CYP* che non danno luogo a proteine funzionalmente attive. La Tabella 11.1 riporta le isoforme che risultano attive principalmente su substrati esogeni, come farmaci o xenobiotici; ciascuna di queste isoforme metabolizza una grande varietà di substrati. La Tabella 11.2 elenca le isoforme coinvolte nel metabolismo di composti endogeni; queste isoforme riconoscono solo uno o due substrati specifici, che sono riportati nella tabella stessa.

11.5 • I CITOCROMI P450: SUBSTRATI E FUNZIONI FISIOLOGICHE

I citocromi P450 metabolizzano una gran varietà di composti lipofili, di origine sia endogena che esogena. Come mostrato nella Figura 11.8, i citocromi P450 possono catalizzare reazioni di ossidrilazione di un atomo di carbonio facente parte o di un gruppo metilico o di un gruppo metileno presente in un alcano, reazioni di ossidrilazione di un anello aromatico che viene trasformato in fenolo o reazioni di addizione di un atomo di ossigeno ad un doppio legame per dare un epossido. I citocromi P450 possono anche catalizzare reazioni di dealchilazione, in cui vengono rimossi gruppi alchilici legati ad atomi di ossigeno, di azoto o di zolfo. Alcune isoforme catalizzano, inoltre, reazioni di ossidazione di atomi di azoto (ammine primarie e secondarie), di zolfo o di fosforo, nonché reazioni di dealogenazione.

Sono metabolizzati da citocromi P450 sia substrati endogeni (come il colesterolo, gli steroidi di in genere, le prostaglandine e gli acidi grassi), sia substrati esogeni (gli *xenobiotici*, "composti estranei alla vita"), inclusi molti farmaci, prodotti chimici, contaminanti ambientali e additivi alimentari. I citocromi P450 di questo gruppo sono meno specifici rispetto ai substrati da trasformare e ossidano le sostanze a carattere sostanzialmente lipofilo (idrofobico) per renderle maggiormente idrosolubili (idrofile) e adatte ad essere escrete.

TABELLA 11.2 • Citocromi P450 umani coinvolti nel metabolismo di composti endogeni

Famiglia di CYP	Isoforme	Substrati	Attività
4	4A11	Acidi grassi	ω -Idrossilasi
	4B1	Acido arachidonico	1,2-Idrossilasi
	4F2	Acido arachidonico, leucotriene B ₄	ω -Idrossilasi
	4F3	Leucotriene B ₄	ω -Idrossilasi
	4F8	Acido arachidonico, prostaglandine	18-Idrossilasi
	4F12	Acido arachidonico	ω -Idrossilasi
	4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1	Sconosciuto	Sconosciuto
5	5A1	Prostaglandina H ₂	Trombossano A ₂ sintasi
	7A1	Colesterolo	7- α -Idrossilasi
7	7B1	Pregnenolone, deidroepiandrosterone (DHEA)	7- α -Idrossilasi
	8A1	Prostaglandina H ₂	Prostaciclina sintasi
	8B1	Steroli	12- α -Idrossilasi
11	11A1	Colesterolo	Taglio della catena laterale
	11B1	11-Desossicortisolo, 11-desossicorticosterone	11- β -Idrossilasi
	11B2	Corticosterone	18-Idrossilasi
17	17A1	Pregnenolone, progesterone	17- α -Idrossilasi
		17-Idrossipregnenolone, 17-idrossiprogesterone	17-20 Liasi
19	19A1	Androstenedione, testosterone	Aromatasi
	20A1	Sconosciuto	Sconosciuto
21	21A2	Progesterone, 17-idrossiprogesterone	21-Idrossilasi
	24A1	25-Idrossi-vitamina D ₃	24-Idrossilasi
26	26A1	Acido retinoico	4-Idrossilasi
	26B1	Acido retinoico	Sconosciuto
26C1	26C1	Sconosciuto	Sconosciuto
	27A1	Sterolo	27-Idrossilasi
27B1	27B1	Vitamina D ₃	25-Idrossilasi
	27C1	Vitamina D ₃	1- α -Idrossilasi
39	39A1	Sconosciuto	Sconosciuto
	46A1	24-Idrossicolesterolo	7-Idrossilasi
46	46A1	Colesterolo	24-Idrossilasi
	51A1	Lanosterolo	14- α -Demetilasi

I citocromi P450 partecipano alla sintesi degli ormoni steroidei e all'ossigenazione di composti endogeni

L'importanza delle reazioni catalizzate dai citocromi P450 nei confronti di sostanze endogene è illustrata dalla sintesi degli ormoni steroidei, partendo dal colesterolo come substrato, nella corticale delle ghiandole surrenali e negli organi sessuali. Entrambi i sistemi dei citocromi P450, sia quello microsomale (del reticolo endoplasmatico) sia quello mitocondriale, sono necessari per convertire il colesterolo in aldosterone e cortisolo nella corticale del surrene, in testosterone nei testicoli e in estradiolo nelle ovaie.

I citocromi P450 catalizzano, nelle surrenali, diversi passaggi della sintesi dell'aldosterone, un ormone mineralocorticoide che regola il bilancio idroelettrolitico, e del cortisolo, un ormone glucocorticoide che presiede al metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine. I citocromi P450 catalizzano, inoltre, sempre nelle surrenali, la sintesi di piccole quantità di androstenedione, un ormone androgeno che regola l'espressione dei caratteri sessuali secondari e che è precursore sia degli estrogeni sia del testosterone. La Figura 11.9 riassume queste reazioni.

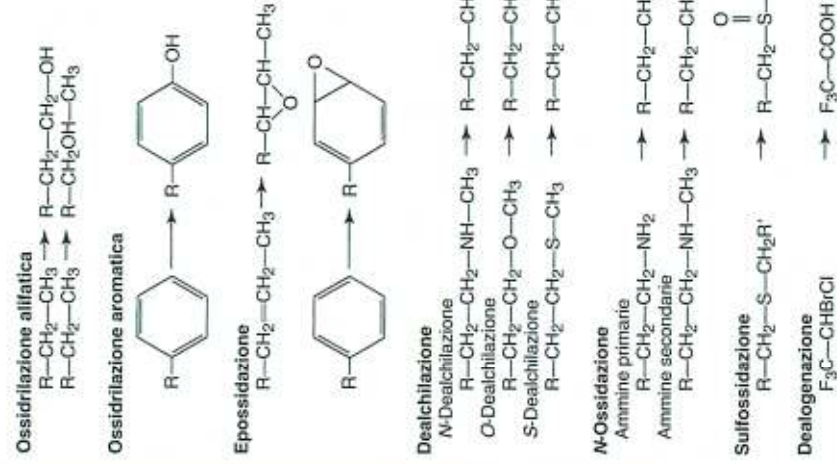


Figura 11.8 Tipiche reazioni catalizzate dai citocromi P450.

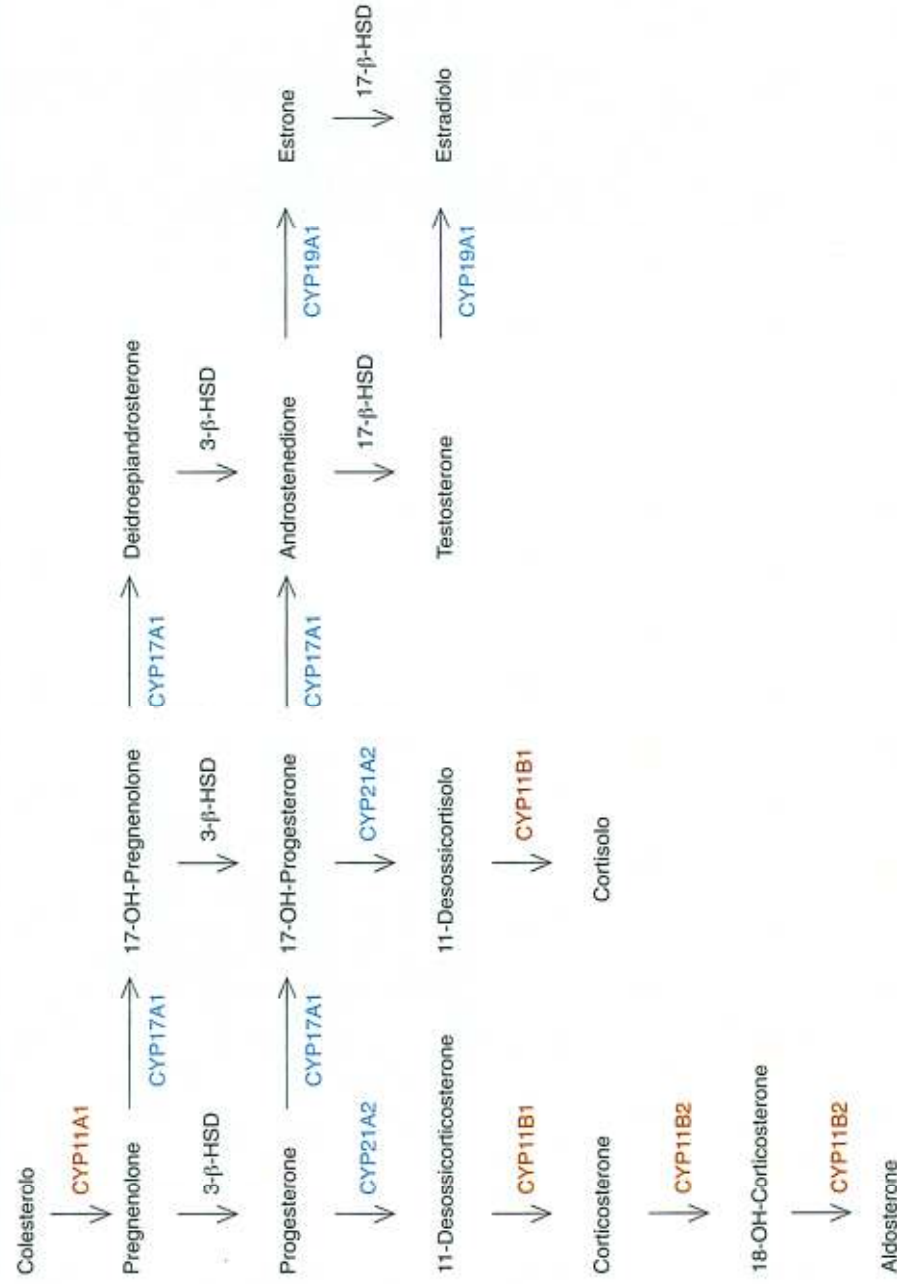


Figura 11.9 Sintesi degli ormoni steroidei nella ghiandola surrenale. I citocromi P450 (CYP) coinvolti nelle reazioni mitocondriali (in rosso) sono 11A1, 11B1 e 11B2. Quelli del reticolo endoplasmatico (in blu) sono 17A1,

19A1 e 21A2. Sono indicati anche altri enzimi, 3- β -HSD e 17- β -HSD, che sono idrossisteroide deidrogenasi.

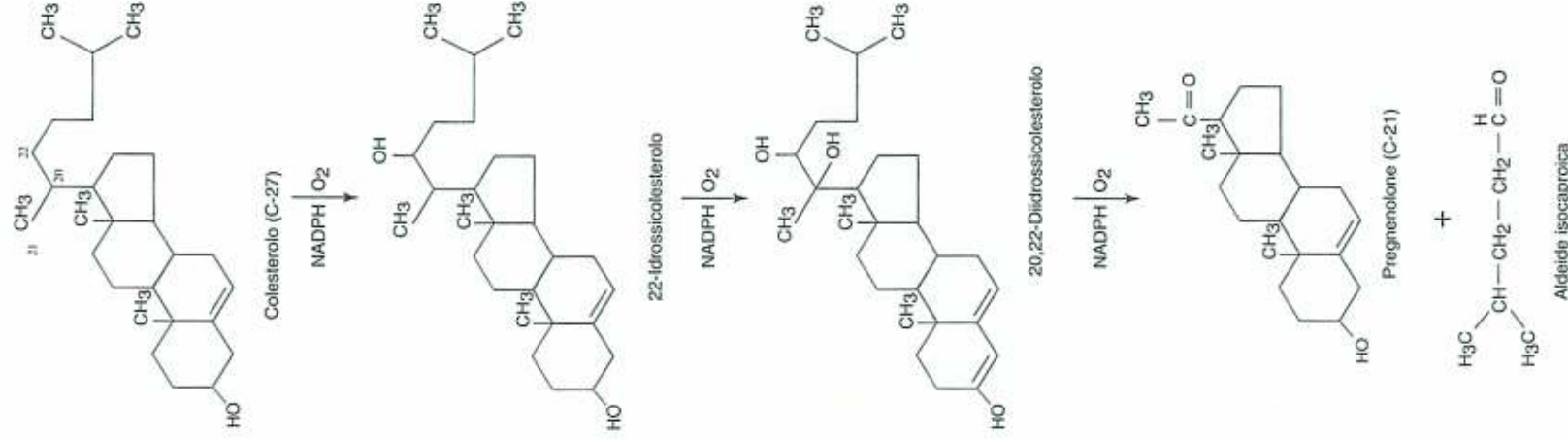


Figura 11.10 Il taglio della catena laterale del colesterolo. Tre reazioni in sequenza catalizzate dal CYP11A1 portano alla formazione di pregnenolone e aldeide isopropenica.

Nei mitocondri delle surrenali, un citocromo P450 (CYP11A1) catalizza la reazione di allontanamento della catena laterale, che converte così il colesterolo in pregnenolone, passaggio chiave per la biosintesi degli ormoni steroidei. Questa reazione comprende, in sequenza, l'ossidrilazione del C22 e del C20 con produzione, rispettivamente, del 22-idrossicolesterolo e del 20,22-diidrossicolesterolo (Figura 11.10). Il CYP11A1, quindi, catalizza la rottura del legame carbonio-carbonio tra il C20 e il C22 con produzione di pregnenolone, uno steroide a 21 atomi di carbonio. La completa sequenza di reazioni, che richiede tre molecole di NADPH e tre molecole di O₂, è catalizzata dal CYP11A1.

Il pregnenolone è prodotto nei mitocondri, ma si sposta nel citosol, dove viene ossidato a progesterone dalla 3-β-idrossisteroide deidrogenasi Δ^{4,5}-isomerasi. Il progesterone, a sua volta, è ossidrilato dal P450 microsomale (CYP21A2) nella posizione C21 del nucleo steroideo, si trasforma in desossicortisterone (DOC). Il DOC, successivamente ossidrilato nella posizione C11 dal CYP11B1 mitocondriale, si trasforma in corticosterone, che è infine ossidrilato nella posizione C18 da un altro P450 mitocondriale (CYP11B2), formando il mineralcorticoid aldosterone (Figura 11.9).

Il cortisolo è sintetizzato sia dal progesterone sia dal pregnenolone e il primo passaggio di questa sintesi consiste in una ossidrilazione in C17, catalizzata da un P450 microsomale, il CYP17A1. L'ossidrilazione nella posizione C21 del 17α-idrossiprogesterone da parte del CYP21A2 porta alla formazione dell'11-desossicortisolo, che è trasferito nei mitocondri, dove è ulteriormente ossidrilato dal CYP11B1 a livello del C11 per dare cortisolo (Figura 11.9). Mutazioni nel gene che codifica CYP21A2 portano ad alcune deficienze congenite, che sono discusse negli Aspetti clinici 11.1.

La sintesi di steroidi a 19 atomi di carbonio partendo dal 7α-idrossipregnenolone o dal 17α-idrossiprogesterone prosegue con la perdita del gruppo acetile in C17. La deacetilazione è catalizzata dal CYP17A1 (attraverso una reazione di lisi 17,20), vale a dire dallo stesso citocromo che ossidila gli steroidi in C17. Non è ancora chiaro se il P450 in questione catalizzi solo l'ossidrilazione per produrre 17-idrossipregnenolone o catalizzi l'ulteriore rottura del legame C17-C20, sebbene sembra sia permesso al CYP17A1 stesso di catalizzare, in presenza del citocromo b₅, la reazione di "taglio" C17-C20 nelle gonadi. I prodotti che si formano per rimozione dell'acetile sono sia il deidroepiandrosterone (DHEA) dal 17α-idrossipregnenolone sia l'androstenedione dal 17α-idrossiprogesterone. Il DHEA può essere poi deidrogenato a livello dell'ossidrilabile in C3 ad androstenedione, uno steroide a elevata attività androgenica.

Gli estrogeni derivano dagli androgeni attraverso una reazione detta di aromatizzazione, in quanto l'anello A dello steroide precursore viene trasformato in un anello aromatico. In questa reazione complessa, uno stesso P450, il CYP19A1 o aromatasi, catalizza ossidrilazioni multiple per dare l'anello aromatico dell'estradiolo con la rimozione del metile in C19. In Figura 11.11 sono riportati i dettagli della reazione di aromatizzazione. Tramite due successive ossidrilazioni, il metile in C19 è convertito in un gruppo aldeidico, che viene poi eliminato per attacco perossidativo assieme ad un atomo di idrogeno per ottenere l'anello aromatico dell'estradiolo. Le tre reazioni di ossidrilazione in sequenza sono catalizzate dal CYP19A1. Negli Aspetti clinici 11.2 sono illustrati sia la complessità della produzione degli ormoni steroidei durante la gravidanza sia il ruolo svolto dalle varie isoforme di P450.

I citocromi P450 metabolizzano anche altri composti endogeni coinvolti in processi fisiologici e ne regolano così l'attività. Per esempio, l'acido arachidonico è metabolizzato dal P450 per dare gli acidi 19- e 20-idrossicicosatetraenoici (HETE), gli acidi epossicicosatetraenoici (EET) e gli acidi diidroscicosatetraenoici (DiHETE). Questi metaboliti sono coinvolti sia nella regolazione dei sistemi vascolare, renale, polmonare e cardiaco sia nelle risposte infiammatorie e di crescita. Così il 20-HETE, che si forma nell'uomo dal metabolismo dell'acido arachidonico tramite reazioni catalizzate da vari CYP4A e CYP4F, è un potente vasocontrittore, mentre i differenti EET, formati sempre nell'uomo dall'azione catalitica di CYP1A, CYP2B, CYP2C e CYP2J, sono vasodilatatori di origine endoteliale. Vari CYP4A catalizzano, infine, reazioni di ossidrilazione delle prostaglandine e degli acidi grassi, attivando o inattivando così questi importanti fattori di regolazione.

I P450 producono metaboliti essenziali per il mantenimento dell'omeostasi anche in altri sistemi. Nel fegato il CYP7A1 catalizza la reazione iniziale della sintesi degli acidi biliari, passaggio cinematicamente critico ("rate limiting step") che determina la velocità con cui procede l'intera via metabolica. La 25-idrossivitamina D₃, formata nel fegato, subisce nel rene l'os-

ASPETTI CLINICI 11.1

Iperplasia congenita delle surrenali (CAH): deficit di CYP21A2

La corticale del surrene è il sito di maggiore sintesi di ormoni steroidei durante la vita fetale e adulta. Durante la vita fetale essa è metabolicamente più attiva e può produrre 100-200 mg di steroidi al giorno rispetto ai 20-30 mg di steroidi prodotti da una ghiandola surrenale di un individuo adulto non stressato. Sono noti difetti enzimatici congeniti che riguardano tutte le tappe della sintesi del cortisolo. Le patologie associate ad insufficiente produzione di cortisolo sono note come iperplasie congenite delle surrenali (CAH, Congenital Adrenal Hyperplasias). La più comune deficienza enzimatica nei soggetti affetti da CAH è il deficit di CYP21A2, una 21-idrossilasi, responsabile della diminuita trasformazione del 17 α -idrossiprogesterone in 11-desossicortisolo, che il CYP11B1 converte poi in cortisolo. Non essendo abbastanza cortisolo, aumenta la secrezione di ACTH, l'ormone ipofisario che regola la produzione di cortisolo. Periodi prolungati di aumentata produzione di ACTH causano iperplasia delle surrenali, con conseguente aumento della produzione di ormoni androgeni, il deidroepiandrosterone (DHEA) e l'androstenedione.

I problemi clinici compaiono a causa della produzione di steroidi an-

drogeni addizionali che causano virilizzazione nella donna, sviluppo precoce degli organi sessuali nei maschi in età prepubere o difetti dell'equilibrio salino legati a scarsa produzione di aldosterone. Conseguenze cliniche di un deficit grave sono evidenti già alla nascita, soprattutto nelle femmine, poiché la sintesi eccessiva di androgeni porta ad un abnorme sviluppo dei loro genitali. Nei neonati maschi, un deficit di 21-idrossilasi può passare inosservato, poiché i genitali appaiono normali, ma ci sarà una virilizzazione precoce, con ripercussioni anche sul successivo sviluppo fisico. Nella CAH a comparsa tardiva, i sintomi clinici possono essere assai vari, quali una precoce comparsa di peli a livello pubico, una precoce calcificazione delle cartilagini epifisarie che causa un prematuro arresto della crescita o la comparsa, nelle donne, della calvizie tipica degli individui di sesso maschile.

Donohoue, P. A., Parker, K. and Migeon, C. J. Congenital adrenal hyperplasia. In Scriver, C. S., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw Hill, 7th ed., Vol. 2, 1995, Chap. 94, 2929; White, P. C. and Speiser, P. W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 21: 245, 2000.

ASPETTI CLINICI 11.2

Produzione di ormoni steroidei durante la gravidanza

I citocromi P450 hanno un ruolo fondamentale nella sintesi degli estrogeni. Durante la gravidanza vi è necessità di una singolare interazione tra i citocromi P450 nei differenti organi per sintetizzare la grande quantità di ormoni che viene richiesta dall'organismo. La produzione di ormoni steroidei aumenta considerevolmente: a termine, la donna gravida produce nelle 24 ore 15-20 mg di estradiolo, 50-100 mg di estriolo e circa 250 mg di progesterone, quantità che sono 1000 volte maggiori rispetto a quelle prodotte da una donna in pre-menopausa non gravida.

Il corpo luteo ovarico è la sede principale della sintesi di estrogeni nelle prime settimane di gravidanza, ma a partire approssimativamente dalla quarta settimana di gestazione la placenta inizia a sintetizzare e secernere estrogeni e progesterone. Dopo l'ottava settimana, la placenta diviene l'organo principale per la sintesi di progesterone. La placenta umana è priva di CYP17, che catalizza la 17 α -ossidazione e la rottura del legame C17-C20 e, quindi, non può sintetizzare estrogeni dal colesterolo. Tuttavia, la placenta è in grado di catalizzare la reazione che porta all'eliminazione di parte della catena laterale del colesterolo, che

può essere così convertito in pregnenolone, e di ossidare il pregnenolone a progesterone, che è secreto nel circolo materno. Come può allora la placenta produrre estrogeni se non ha la capacità di sintetizzare DHEA o androstenedione dal progesterone? Interviene la ghiandola surrenale del feto, un organo che produce steroidi molto attivamente, che catalizza la sintesi di DHEA dal colesterolo e lo libera nel circolo fetale. Una grande quantità di DHEA fetale viene metabolizzata nelle surrenali e nel fegato del feto a 16 α -idrossi-DHEA, che sarà convertito nella placenta, per azione catalitica del CYP19, nell'estrogeno estriolo. Questa è una elegante dimostrazione della cooperazione esistente fra i sistemi di ossidazione P450-dipendenti che operano nel feto e negli organi materni, di cui si avvale la madre per assicurarsi una progressiva formazione di estrogeni durante la gravidanza.

Cunningham, F. G., MacDonald, P. C., Gant, N. F., Leveno, K. J., et al. The placental hormones. In *Williams Obstetrics*, 20th ed. East Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1997, Chapt.6, 125.

sidrilazione in C1 catalizzata dal CYP27B1 per produrre la forma attiva di questo ormone: il metabolita 1,25-ossidrilato, importante nello sviluppo e nel mantenimento dell'osso, mentre il CYP24A1 è coinvolto nella degradazione e nell'inattivazione dei metaboliti della vitamina D. Nel sistema immunitario il leucotriene B4, fattore chemiotattico per i leucociti polimorfonucleati, è ossidrilato dal CYP4F3 per dare la forma meno attiva 20-idrossileucotriene B4, essenziale per l'inattivazione della risposta immunitaria. L'acido retinoico, infine, è trasformato dal CYP26A1 nel derivato 4-ossidrilato che può avere, in alcuni organi in cui assume un ruolo nel ciclo cellulare e nelle risposte cellulose-mediate, un'attività maggiore dell'acido retinoico stesso. Nella Tabella 11.2 sono riportati i citocromi P450 dell'uomo con i substrati endogeni specifici e le relative funzioni enzimatiche.

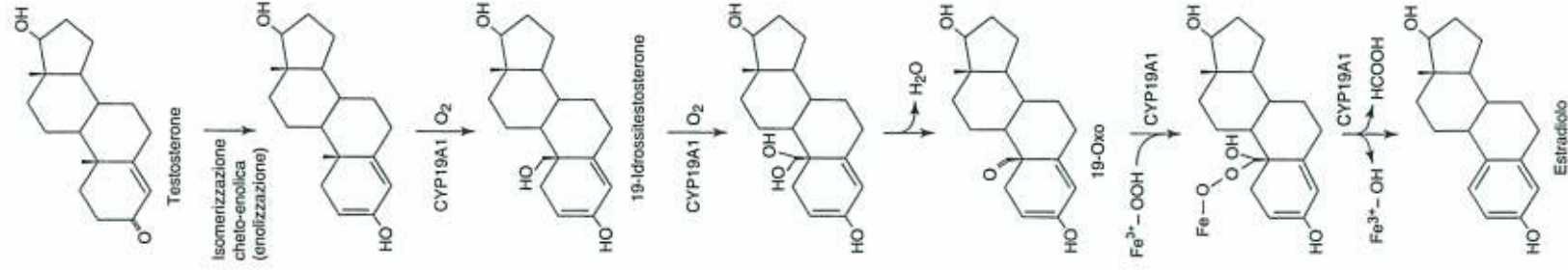


Figura 11.11 Sequenza delle reazioni di aromatizzazione degli androgeni a estrogeni.

Adattato da Graham-Lorence, S., Amarneh, B., White R. E., Peterson, J. A., and Simpson E. R., A three dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Science* 4: 1065, 1995.

I citocromi P450 ossidano composti esogeni lipofili

Tra i substrati esogeni metabolizzati dai P450 sono compresi farmaci usati in terapia, prodotti chimici presenti nei luoghi di lavoro, rifiuti industriali che diventano contaminanti ambientali e alcuni additivi alimentari. Nella Tabella 11.1 sono riportati i citocromi P450 umani coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici. Questi citocromi hanno un'ampia specificità di substrato, in quanto ossidano una grande varietà di composti, soprattutto se lipofili. Le ossidazioni rendono i composti maggiormente polari e, di conseguenza, più solubili nell'ambiente cellulare acquoso. Molti composti esogeni altamente lipofili tendono ad accumularsi nelle cellule e potenzialmente potrebbero interferire con le funzioni cellulari, a meno che non siano trasformati in prodotti maggiormente idrofili.

È stato calcolato che nel metabolismo dei farmaci usati in terapia sono coinvolti il CYP3A4 per il 50%, il CYP2D6 approssimativamente per il 20%, CYP2C9 e CYP2C19 per il 15%, CYP1A2, CYP2A6 e CYP2B6 per il restante 15%. Nella specie umana il CYP3A4 è la forma di citocromo P450 che più spesso metabolizza i farmaci. Esso è presente nel tratto gastroenterinale e nel fegato ed è responsabile della scarsa biodisponibilità di molti farmaci introdotti per via orale. A causa della scarsa specificità di substrato del P450, uno stesso composto esogeno può essere metabolizzato in differenti distretti dell'organismo e da più di una isoforma di P450, come mostrato in Figura 11.12 per il diazepam.

I farmaci e gli xenobiotici sono metabolizzati principalmente tramite due vie: Fase I (reazioni ossidative che portano alla formazione di gruppi funzionali) e Fase II (reazioni biosintetiche). Queste modificazioni metaboliche possono realizzarsi entrambe o singolarmente. Se un P450 metabolizza un farmaco secondo la Fase I, un gruppo funzionale, quale ad esempio un gruppo ossidrilico, verrà o introdotto o esposto sul farmaco stesso dai citocromi P450 (oltre che da altri sistemi enzimatici; Tabella 11.13). Enzimi coinvolti nella Fase II, in molti casi, uniranno il gruppo funzionale ad un sostanza endogena come, per esempio, acido glucuronico, solfato, glutatone, amminoacidi o acetato. Il risultato di una o di entrambe queste modificazioni sarà quello di rendere il composto estraneo più solubile in acqua e, in tal modo, più

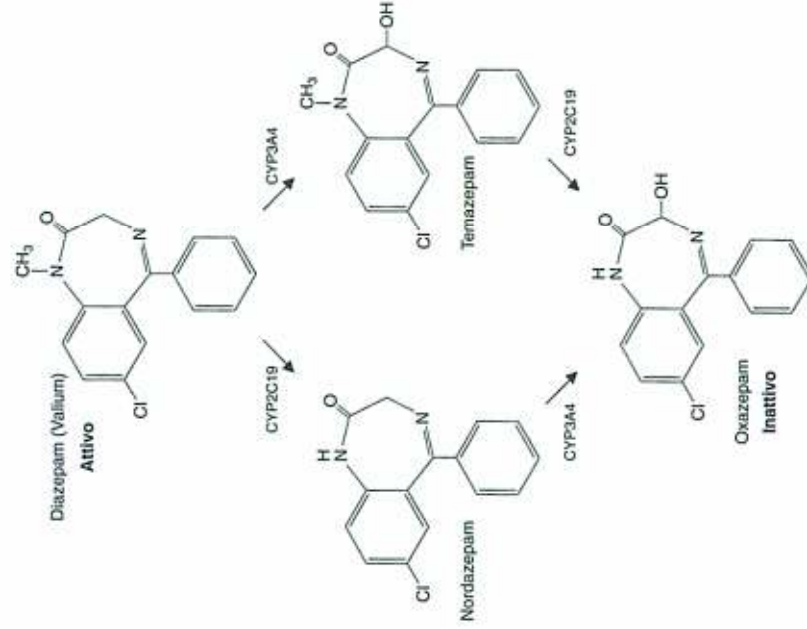


Figura 11.12 Metabolismo del diazepam per azione dei CYP3A4 e 2C19. Il diazepam può essere metabolizzato da più di un citocromo P450. I prodotti formati dal composto dipenderanno dalla quantità delle isoforme di P450 espresse nei tessuti.

TABELLA 11.3 • Reazioni ed enzimi del metabolismo dei composti xenobiotici

<i>Tipo di reazione</i>	<i>Nome generale dell'enzima</i>	<i>Reazione enzimatica generale</i>
Ossidazione	Deidrogenasi Monossigenasi flaviniche (FMO) Monoammino ossidasi Citocromo P450	Ossidazione di gruppi alcolici o aldeidici Ossidazione di ammine primarie, secondarie e terziarie, nitroni, tioeteri, tiocarbammati e fosfine Rimozione di un'ammina tramite deaminazione ossidativa Vedi Tabelle 11.1 e 11.2 e Fig. 11.7 per le reazioni catalizzate da enzimi P450
Riduzione	Aldeide e chetone reductasi Azoreductasi Chinone reductasi Epossido idrolasi	Riduzione di un gruppo carbonilico a gruppo ossidrilico Riduzione di un gruppo azo per formare ammine primarie Riduzione di chinoni a idrochinoni
Idrolisi		Addizione di acqua a gruppi arenossido o epossido per formare gruppi ossidrilici contigui
Coniugazione	Carbossilesterasi Ammidasi N-Acetiltrasferasi UDP-glucuroniltrasferasi Solfotrasferasi Metiltrasferasi Glutazione S-trasferasi	Addizione di acqua a un legame estereo Addizione di acqua a un legame amidico Addizione di CoA dall'acetil-CoA ad ammine aromatiche o a composti contenenti idrazine Addizione di acido glucuronico dall'uridin-5'-difosfato (UDP)-glucuronato a gruppi carbossilici o fenolici, a ossidrilii alifatici, ad ammine aromatiche o alifatiche o a gruppi sulfidrilici Addizione di gruppi solfato dal fosfoadenosil-fosfolato a gruppi fenolici, ad alcoli alifatici o ad ammine aromatiche Addizione di un gruppo metile dalla S-adenosilmetionina a composti contenenti fenoli, catecoli, ammine alifatiche o aromatiche o gruppi sulfidrilici Coniugazione di composti contenenti eteroatomi elettrofili, ioni nitrenio, ioni carbonio, radicali liberi, epossidi o gruppi arenossidi

facilmente escreto, generalmente attraverso l'emuntorio renale, ma anche entrando a far parte dei componenti della bile, attraverso l'intestino. I citocromi P450 sono coinvolti nel metabolismo delle sostanze estranee mediante reazioni di Fase I, ma non mediante reazioni di Fase II. Nella Tabella 11.3 sono indicati esempi generici di enzimi che metabolizzano gli xenobiotici, con le reazioni corrispondenti.

I citocromi P450 possono metabolizzare gli xenobiotici con tre effetti sui substrati: **inattivazione, attivazione o formazione di metaboliti tossici**. L'inattivazione consiste nella conversione del farmaco in una sua forma inattiva, meno biodisponibile, oppure – nel caso di xenobiotici potenzialmente dannosi – nella diminuzione degli effetti nocivi (es. nel caso del fenobarbital). Il diazepam (conosciuto come Valium, prescritto come sedativo) viene, per esempio, metabolizzato sia dal CYP2C19 (che ne catalizza la *N*-deacilazione) sia dal CYP3A4 (che ne catalizza l'ossidilazione), per essere infine trasformato nel prodotto biologicamente inattivo oxazepam (Figura 11.12) che, prima di essere eliminato, passa attraverso la coniugazione di Fase II con l'acido glucuronico.

Altri farmaci, invece, sono inattivi finché non vengono metabolizzati dal citocromo P450 che li rende biologicamente attivi. Il farmaco terfenadina (detto comunemente Seldane, un an-

ASPETTI CLINICI 11.3

Inibizione dei citocromi P450: interazioni tra farmaci ed effetti indesiderati

Il ruolo dei citocromi P450 nel metabolismo dei farmaci e le serie conseguenze delle interazioni tra farmaci possono essere esemplificati da due farmaci, la terfenadina (Seldane) e il cisapride (Propulsid), quando il loro metabolismo risulta inibito dalla contemporanea assunzione di altri farmaci. Una modesta percentuale di fruitori ha sperimentato effetti indesiderati che hanno costretto le ditte farmaceutiche e la FDA a mettere in guardia sull'assunzione contemporanea di più farmaci che inibiscono il CYP3A4. L'importanza di alcuni effetti indesiderati ha costretto la FDA a ritirare dal commercio alcuni farmaci.

La FDA aveva approvato nel 1985 la terfenadina, un antistaminico anti-H1 di seconda generazione, per il trattamento delle allergie stagionali. La terfenadina è rapidamente metabolizzata dal CYP3A4, nel fegato, a fexofenadina, come mostrato in Figura 11.13, con il risultato che subito dopo l'ingestione il livello della terfenadina è basso, ma gli effetti terapeutici sono causati dalla fexofenadina. Poiché molti altri farmaci sono substrati o inibitori del CYP3A4, il metabolismo della terfenadina è potenzialmente passibile di inibizione. Gli individui che assumevano il farmaco con un antibiotico, ad esempio un macrolide come l'eritromicina, o con un antimicotico, il ketoconazolo, entrambi forti inibitori del citocromo in questione, avevano livelli significativamente elevati di terfenadina nel plasma. Una bassa percentuale di individui che assumevano il farmaco in oggetto andava incontro a seri problemi cardiaci poiché il farmaco non metabolizzato era responsabile di alterazioni dei canali del potassio e aumentava il rischio di una rara tachicardia ventricolare, detta "torsade de pointes". Alcuni individui sono morti per problemi

cardiaci insorti dopo aver assunto la terfenadina con l'eritromicina o con il ketoconazolo. Poiché le proprietà terapeutiche della terfenadina erano da attribuirsi al suo metabolita non tossico (la fexofenadina), quest'ultimo composto è stato testato direttamente come farmaco e ne è stata richiesta l'approvazione dalla FDA. Ora è messo in commercio con la denominazione Allegra.

Il cisapride è stato approvato nel 1993 per pazienti che a seguito di reflusso gastroesofageo (GERD) soffrivano di pirosi gastrica notturna. L'eliminazione di questo farmaco dall'organismo è conseguente al suo metabolismo CYP3A4-dipendente e, se somministrato da solo o con altri farmaci che non inibiscono il CYP3A4, il cisapride non si accumula nel plasma. Quando invece è assunto con farmaci inibitori o substrati del sistema enzimatico CYP3A4, il suo metabolismo è ridotto e con la successiva assunzione si accumula. Ciò causa in alcuni individui aritmie cardiache. Alla fine del 1999 sono stati riportati ben 341 casi di pazienti che avevano riportato alterazioni del ritmo cardiaco in seguito all'assunzione del cisapride e 80 erano deceduti. Perciò dal 2000 le stesse case farmaceutiche ne hanno sospeso la distribuzione.

Terfenadine: Proposal to withdraw approval of two new drug applications and one abbreviated new drug application. Fed. Reg. 62: 1889, 1997. This document may be accessed from the internet site for the Federal Register at http://www.access.gpo.gov/su_docs/aces/aces140.html; Desta, Z., Soukhova, N., Mahal, S. K., and Flockhart, D. A. Interaction of cisapride with the human cytochrome P450 system: Metabolism and inhibition studies. *Drug Metab. Disp.* 28: 789, 2000.

tagonista dei recettori H1 dell'istamina, prescritto nelle allergie stagionali) è in realtà la forma inattiva di un farmaco, detta anche profarmaco, che, tramite una ossidrilazione catalizzata dal CYP3A4 a fexofenadina, è attivata, cioè trasformata nel composto desiderato funzionalmente attivo (Figura 11.13). Problemi associati ad interferenze con l'attivazione della terfenadina sono trattati negli Aspetti clinici 11.3.

Oltre all'attivazione o inattivazione degli xenobiotici, il metabolismo mediato dai P450 può occasionalmente causare la formazione di composti tossici. Il benzo[*a*]pirene è un potente cancerogeno prodotto dalla combustione del catrame, dalla combustione di sostanze contenute nel tabacco, da cibi arrostiti su barbecue o da trasformazioni industriali. Modificato enzimaticamente da alcuni CYP - 1A1, 1A2 e 1B1 - in benzo[*a*]pirene-7,8-diidrodio-9,10-epossido, risulta essere un cancerogeno molto più potente (Figura 11.14). In particolare, il benzo[*a*]pirene è trasformato in 7,8-epossido dal CYP1A1. La successiva idrolisi da parte dell'epossido idrolasi forma il derivato benzo[*a*]pirene-7,8-diidrodio-9,10-epossido da parte di CYP1A1 e CYP3A4 forma il prodotto benzo[*a*]pirene-7,8-diidrodio-9,10-epossido. Quest'ultimo può a sua volta formare addotti con delle guanine presenti nel DNA, reazione da cui derivano modificazioni funzionali dei geni e, conseguentemente mutazioni. Nell'uomo, l'interazione del benzo[*a*]pirene-7,8-diidrodio-9,10-epossido con il gene di p53 è un passaggio critico nel meccanismo per cui il benzo[*a*]pirene è cancerogeno. Il benzo[*a*]pirene si lega anche al recettore degli idrocarburi arilici (AhR) e induce la sintesi delle stesse isoforme di P450, incrementando così il loro stesso metabolismo.

L'acetaminofene, comunemente usato come analgesico e antipiretico, è convertito da CYP2E1 in *N*-acetil-*p*-benzochinoneimmina (NAPQI), un composto molto reattivo che crea addotti con le proteine, genera stress ossidativo e tossicità. Di solito, l'acetaminofene è principalmente trasformato, attraverso glucuronazione e solfitazione, in coniugati polari, inattivi, che sono rapidamente escreti (Figura 11.15, pannelli in alto e in basso, rispettivamente). La quantità di acetaminofene che è metabolizzata dal CYP2E1 è generalmente bassa rispetto

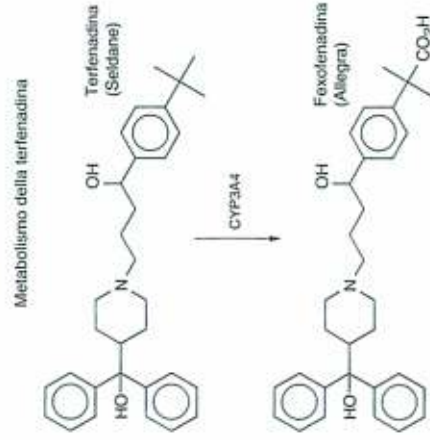
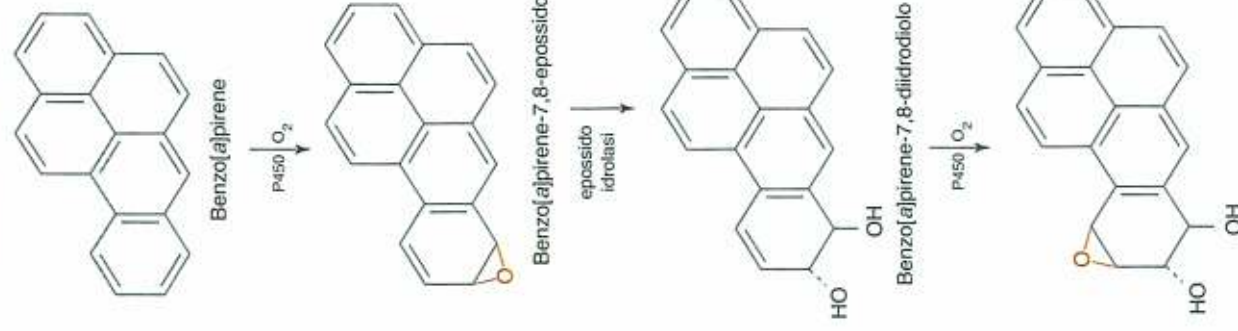


Figura 11.13 Metabolismo della terfenadina: trasformazione in fexofenadina, il composto bioattivo.

a quella sottoposta a glucuronazione e solfatizzazione. Occasionalmente, le piccole quantità di NAPQI formatesi sono rapidamente coniugate con il glutatone per formare metaboliti non tossici. Comunque, se i livelli di glutatone sono ridotti, una certa quantità di NAPQI formatosi sfuggirà alla coniugazione con glutatone e reagirà con i componenti delle cellule epatiche dando luogo a danni cellulari. Normalmente, i livelli di CYP2E1 sono bassi rispetto alle altre forme di P450 e la produzione di NAPQI, quando si assumono le normali dosi di acetaminofene, è modesta. Invece, l'assunzione di dosi elevate del farmaco causeranno una maggiore produzione di NAPQI. Un altro fattore da considerare nell'induzione della tossicità epatica dell'acetaminofene è l'assunzione di bevande alcoliche che determinano la sintesi di CYP2E1, che a sua volta induce la produzione di NAPQI. L'alcol, comunque, essendo anche substrato per questo citocromo, inibirà la modificazione enzimatica a carico di altri composti. Il grado di danno epatico dipende dalla durata delle somministrazioni e dalla quantità di acetaminofene assunto. Nei centri antiveleno degli Stati Uniti le chiamate per overdose da acetaminofene sono superiori a quelle di qualsiasi altra sostanza farmacologica; per di più il 35% dei danni epatici, secondo la Fondazione Americana per lo studio del Fegato (American Liver Foundation), sono causati da avvelenamento da acetaminofene. Negli Aspetti clinici 11.4 sono descritti gli effetti dell'alcol sul metabolismo dell'acetaminofene.

Come esemplificato per il benzo[*a*]pirene e per l'acetaminofene, il sistema enzimatico dei citocromi P450 può produrre metaboliti tossici, la cui formazione, tuttavia, non sempre causa danni cellulari o tumori. Altri processi cellulari determinano l'importanza del danno; per esempio, la coniugazione del benzo[*a*]pirene-7,8-diidrodio-9,10-epossido ad opera di una glutatone transferasi gioca un ruolo significativo nell'inibire la formazione di addotti con il DNA e nel ridurre l'attività cancerogena. L'azione detossificante di vari sistemi enzimatici, comprese le reazioni di coniugazione quali la glucuronazione e la solfatizzazione, lo stato del sistema immunitario, lo stato nutrizionale dell'individuo, la sua predisposizione genetica e



Benzo[*a*]pirene-7,8-diidrodio-9,10-epossido
Figura 11.14 Metabolismo del benzo[*a*]pirene ad opera del citocromo P450 e della epossido idrolasi con formazione di benzo[*a*]pirene-7,8-diidrodio-9,10-epossido.

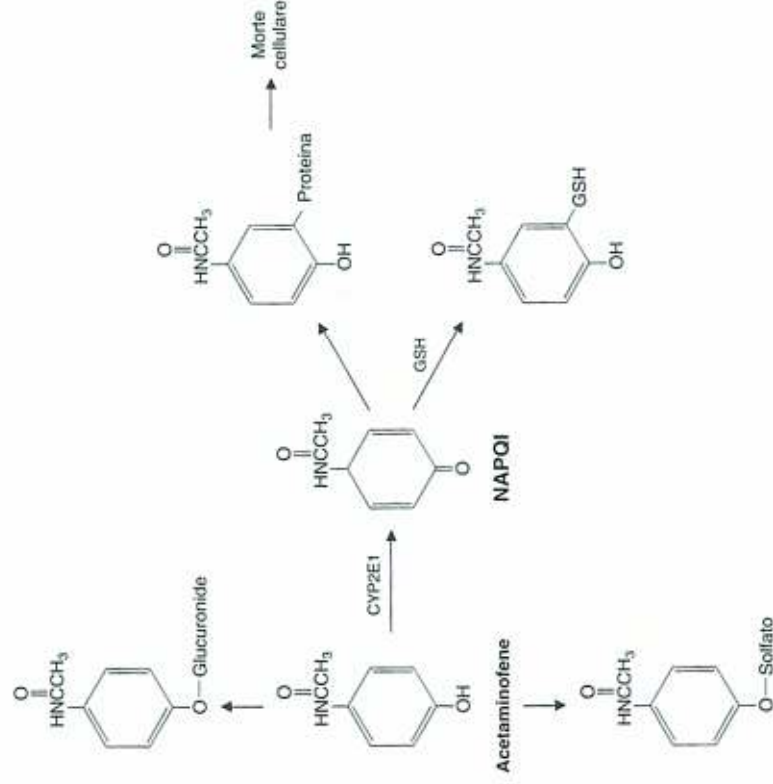


Figura 11.15 L'acetaminofene può essere metabolizzato dagli enzimi di Fase II solifotrasferasi e glucuroniltrasferasi e dal CYP2E1. Le reazioni metaboliche catalizzate dal CYP2E1 portano alla produzione di *N*-acetil-*p*-benzochinoniminina (NAPQI). Quando la produzione di NAPQI è bassa, la NAPQI può essere coniugata al glutatone con formazione di un metabolita non tossico; se, invece, la quantità di NAPQI è eccessiva, può in parte sfuggire alla coniugazione con il glutatone e, reagendo con costituenti delle cellule epatiche, può causare danno cellulare.



Ruolo del citocromo P450 2E1 nella epatotossicità indotta da acetaminofene

L'acetaminofene è, tra i farmaci da banco, uno dei più comuni analgesici (sostanze che alleviano il dolore) e antipiretici (sostanze che riducono la febbre). Si può assumere da solo o come componente di oltre 100 farmaci che non necessitano di prescrizione medica. Nella Figura 11.15 sono mostrate le varie tappe del metabolismo del farmaco. Il consumo di alcol, sostanza che è sia substrato sia induttore della sintesi del CYP2E1, ha grande rilevanza sugli effetti del farmaco. Un elevato consumo di alcol (equivalente a 750 ml di vino, 2 l di birra o 250 ml di un liquore a 80 gradi) dà luogo ad un aumento del 22% del metabolismo dell'acetaminofene CYP2E1-mediato. Tale maggiore metabolismo, che si manifesta molte ore dopo l'assunzione dell'alcol, prosegue per un periodo di 6-7 ore. Perciò l'intervallo tra l'assunzione dell'alcol e dell'acetaminofene sarà veramente critico per l'insorgenza del danno epatico indotto da questo farmaco. In una persona che beve alcolici, il metabolismo dell'acetaminofene, se assunto insieme all'alcol oppure poco dopo aver bevuto, sarà rallentato, poiché l'etanolo, come il farmaco, è sia substrato sia induttore della sintesi del CYP2E1 e, pertanto, compete con il farmaco per il legame al citocromo. Negli alcolisti, il CYP2E1 risulta aumentato a seguito della sua induzione e, di conseguenza, vengono prodotte grandi quantità di *N*-acetil-*p*-benzochinoniminina (NAPQI); tuttavia, l'alcol, essendo un substrato del CYP2E1, può proteggere il fegato dal danno in-

dotto dall'acetaminofene. Invece, se il farmaco è assunto molte ore dopo l'ingestione di alcol, l'alcol sarà già stato metabolizzato e gli aumentati livelli del CYP2E1 indotto produrranno un'elevata quantità di NAPQI che sarà responsabile del danno epatico. Così alte dosi dell'analgesico aumentano il rischio di danno epatico dal momento che sarà elevata la quantità di farmaco metabolizzabile dal CYP2E1. Sia la solifatazione sia la glucuronazione sono essenziali nel determinare la quantità di acetaminofene da metabolizzare; inoltre, dal momento che i prodotti della coniugazione del NAPQI con il glutatone proteggono il fegato da questo metabolita reattivo, i livelli di glutatone sono determinanti per il destino dell'acetaminofene. In presenza di elevati livelli di NAPQI, il glutatone è rapidamente consumato nella coniugazione del metabolita e non può a lungo proteggere dal danno.

Brunner, L. J., McGuinness, M. E., Meyer, M. M., and Munar, M. Y. Acute acetaminophen toxicity during chronic alcohol use. *U.S. Pharmacist September:HS11-HS19*, 1999. This article may be accessed at <http://www.uspharmacist.com/>; Thummel, K. E., Slattery, J. T., Ro, H., Chien, J. Y., et al. Ethanol and production of the hepatotoxic metabolite of acetaminophen in healthy adults. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67: 591, 2000; Slattery, J. T., Nelson, S. D., and Thummel, K. E. The complex interaction between ethanol and acetaminophen. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60:241, 1996.

l'esposizione a differenti composti chimici presenti nell'ambiente assumono un ruolo chiave nel determinare l'entità del danno cellulare e la tossicità P450-mediata. Sebbene possa sembrare controproducente che un organismo vivente possieda enzimi che potrebbero produrre composti altamente tossici, la finalità del sistema P450 è quella di aggiungere o esporre gruppi funzionali rendendo la molecola maggiormente polare e/o più suscettibile ad essere metabolizzata da parte di altri sistemi di detossificazione; la sintesi di metaboliti tossici è una conseguenza indesiderata di tale processo.

Sebbene la maggior parte dei substrati (Tabella 11.1) di questi citocromi P450 sia costituita da composti esogeni, è stato ipotizzato che tali citocromi siano attivi anche su substrati endogeni. I citocromi CYP1A1 e 1A2 sembrano funzionalmente attivi, rispettivamente, nel catabolismo dell'eme e nel metabolismo dell'estradiolo. Ci sono anche evidenze che i membri delle sottofamiglie CYP2A, 2B, 2C e 3A siano coinvolti nel metabolismo del testosterone, mentre quelli delle sottofamiglie 2D e 2E prendono parte, rispettivamente, al metabolismo delle catecolammine e alla via metabolica della gluconeogenesi.

11.6 • I CITOCROMI P450: INDUZIONE E INIBIZIONE

Da quanto sinora esposto risulta chiaro che i livelli e l'attività dei citocromi P450 influenzano ampiamente l'effetto di un particolare farmaco o xenobiotico in un dato individuo. Così, sia i composti che inibiscono o inducono l'attività del P450 sia i polimorfismi di un gene per P450 possono dar luogo ad effetti inattesi.

Interazioni tra farmaci

Molti farmaci inducono la sintesi di citocromi P450 in grado di metabolizzarli, altri invece ne inibiscono l'attività. L'alterazione della velocità del metabolismo di un farmaco può essere causa di effetti inaspettati e nocivi e ciò può essere particolarmente significativo in individui che assumono una combinazione di più farmaci. I farmaci che dipendono dalle modificazioni apportate dai P450 per essere escreti possono accumularsi in seguito all'inibizione dell'attività del citocromo P450 e possono risultare tossici. Al contrario, l'induzione della sintesi dell'iso-



forma di P450 richiesta per metabolizzare una particolare sostanza farmacologica può risultare in un suo metabolismo eccessivo e in una concentrazione sub-eficace.

Per interazione tra farmaci (P450-correlata) si intende quella particolare situazione per la quale si hanno effetti inaspettati di una terapia allorché, con la somministrazione di un secondo farmaco, i livelli dei P450 sono aumentati, per induzione della sintesi, o diminuiti, se inibiti nella loro attività catalitica. Se farmaci induttori della sintesi o inibitori dell'attività dei P450 sono somministrati insieme ad altri farmaci, a loro volta metabolizzati dai P450, la conseguenza dell'interazione sarà un'alterazione dell'emivita di questi ultimi. Le conseguenze possono anche essere letali, qualora i farmaci agiscano su funzioni indispensabili per la sopravvivenza dell'individuo. Il CYP2E1, per esempio, è indotto dall'alcol e dall'isoniazide e metabolizza alcuni anestetici, quali l'alorano e l'enflurano, trasformandoli in sostanze che danneggiano le proteine del fegato. Il sistema immunitario, allora, non riconoscendole più, attacca queste proteine anomale e ciò porta all'insorgenza di una particolare forma di epatite. Gli individui in cui l'assunzione di alcol ha determinato un'attività del CYP2E1 più alta della norma sono a maggior rischio di epatite in seguito alla somministrazione di questi anestetici.

Interazione tra farmaci si può avere anche con il CYP3A4, uno dei citocromi P450 maggiormente coinvolti nel metabolismo dei farmaci e il P450 la cui espressione è maggiormente abbondante nel fegato e nell'intestino tenue. I livelli di CYP3A4 sono aumentati per induzione da parte della rifampicina, di composti anticonvulsivanti come carbamazepina e fenitoina e di glucocorticoidi come il desametasone, mentre gli stessi citocromi risultano inibiti nell'espletamento delle loro funzioni da antimicotici come il ketoconazolo, da inibitori delle proteasi dell'HIV, dai calcio-antagonisti, dalla ciclosporina, da antibiotici come l'eritromicina, da antidepressivi (SSRI), così come dal succo di pompelmo. Nella Tabella 11.1 vengono elencati solo alcuni tra i molti composti metabolizzati dal sistema del CYP3A4.

Attualmente è ben chiaro che somministrando induttori e/o inibitori del CYP3A4 insieme a vari farmaci (che possono essi stessi esserne induttori o inibitori) si corre il rischio di avere effetti inaspettati o peggio ancora letali. Assumendo rifampicina, induttore di CYP3A4, assieme a contraccettivi orali, metabolizzati dallo stesso CYP3A4, si può avere uno scarso effetto contraccettivo fino a giungere ad una gravidanza indesiderata. Assumendo ketoconazolo oppure bevendo succo di pompelmo, sostanze che inibiscono entrambe l'attività del CYP3A4, assieme alla warfarina, assunta per le sue proprietà anticoagulanti, si può andare incontro ad un eccessivo sanguinamento. Negli Aspetti clinici 11.3 e 11.5 sono descritte alcune conseguenze cliniche dell'induzione della sintesi o dell'inibizione dell'attività di enzimi che metabolizzano i farmaci.

Il meccanismo di induzione dei P450 può operare a livello sia trascrizionale che post-trascrizionale (tramite maggiore stabilità degli mRNA o minore degradazione della proteina stessa). Non è possibile predire il meccanismo responsabile dell'induzione in base al composto "inducente". La complessità del processo può essere esemplificata dalle modalità di induzione del CYP2E1 nel fegato dell'uomo o del ratto. Nelle due specie animali la sintesi della proteina è indotta da piccole molecole organiche come l'eranolo, l'acetone o il pirazolo o, ancora, in caso di obesità o di diabete mellito. Nell'uomo, con l'induzione del CYP2E1, non viene modificata l'emivita dell'RNA messaggero, mentre viene probabilmente rallentata la degradazione proteolitica della proteina (CYP2E1). Nel ratto diabetico, invece, l'induzione di sei volte della proteina si correla con un aumento dell'RNA messaggero di 10 volte, senza un corrispondente aumento della trascrizione genica. Il meccanismo di induzione perciò sembra, in questo secondo caso, legato ad una maggiore stabilità dell'mRNA. Sono stati identificati specifici recettori citosolici per alcuni composti in grado di indurre la sintesi dei P450.

Uno dei più studiati è il recettore degli idrocarburi aromatici (AhR), il cui ligando è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), che causa l'induzione della sintesi di CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1. Questo è un esempio di composto che persiste nella componente lipidica dell'ambiente cellulare per lunghi periodi di tempo e può indurre cancerogenesi. Gli idrocarburi policiclici aromatici, legandosi allo stesso recettore, formano un complesso che viene traslocato da un traslocatore specifico (Arnt: traslocatore nucleare del recettore dei composti arilici) nel nucleo. Qui esso si lega a specifici elementi di risposta in regioni regolatorie poste a monte dei geni dei P450. Nella Figura 11.16 viene descritto questo processo.

Un altro sistema recettoriale dei geni dei P450 è il recettore X del pregnano (PXR), recettore che regola la trascrizione del gene del CYP3A. I pregnani sono steroidi a 21 atomi di carbonio, quali il metabolita del progesterone, 5 α -pregnano-3,20-dione, che legandosi al PXR, si comporta

Induzione dei citocromi P450: interazioni tra farmaci ed effetti indesiderati

L'induzione di uno specifico P450 può diminuire gli effetti terapeutici dei farmaci, poiché aumentando a livello epatico la quantità del citocromo specifico aumentano anche la velocità dei processi metabolici catalizzati e, quindi, l'inattivazione e/o l'eliminazione dei relativi farmaci. L'induzione del sistema enzimatico P450 può dar luogo ad effetti indesiderati a causa dell'aumentata formazione di metaboliti tossici (Aspetti clinici 11.4).

L'induzione del CYP3A4, per esempio, da parte di un farmaco antitubercolare, la rifampicina, può aumentare fortemente l'eliminazione del contraccettivo orale etinilestradiolo, portando i livelli di farmaco nel plasma a concentrazioni sub-eficaci, con il rischio di una gravidanza indesiderata. Terapie con farmaci anticonvulsivanti, fenitoina e carbamazepina, possono indurre il CYP3A4 e ridurre anche in questo caso l'efficacia contraccettiva dell'etinilestradiolo. Una donna che assuma il farmaco suddetto a scopo contraccettivo insieme ad un composto induttore la sintesi del CYP3A4 deve aumentare la dose per avere l'effetto desiderato oppure utilizzare un altro metodo contraccettivo o ancora assumere un altro tipo di farmaco.

Anche la molto usata "erba di San Giovanni" (l'iperico), che può essere acquisite senza prescrizione medica, induce l'attivazione del CYP3A4, aumentando il pericolo, per gli individui che ne fanno uso, di non trarre appieno benefici da quei farmaci che sono substrati del citocromo P450 attivato. Si può avere una riduzione dei livelli plasmatici dei contraccettivi orali, dei farmaci antipticosi dell'HIV, del farmaco ad attività immunosoppressiva ciclosporina o di alcuni tipi di statine assunte per abbassare i livelli di colesterolo, dal momento che tutti questi medicinali sono substrati del CYP3A4. Poiché l'erba di San Giovanni è considerata un rimedio naturale piuttosto che un farmaco, gli individui ne fanno uso senza comunicarlo al loro medico o senza conoscerne gli effetti sull'efficacia di altri farmaci che stanno assumendo.

Roby, C. A., Anderson, G. D., Kantor, E., Dwyer, D. A., and Bursstein, A. H. St. John's wort: Effect on CYP3A4 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67:451, 2000; Shadler, R. L. and Osterheld, J. R. Contraceptive effectiveness: Cytochromes and induction. *J. Clin. Psychopharmacol.* 20:119, 2000.

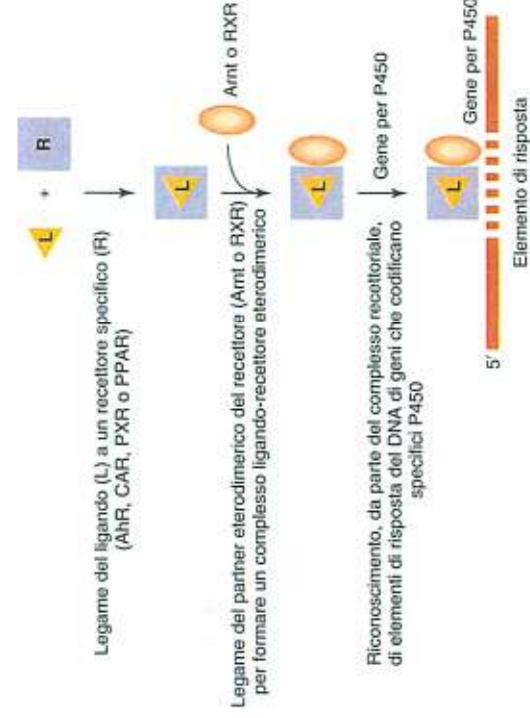


Figura 11.16 L'interazione di un ligando con il recettore e con un partner del recettore per formare un complesso eterodimerico dà inizio all'induzione della sintesi di isoforme di citocromo P450.

da potente induttore della sintesi del CYP3A4 nell'uomo. Altri composti, strutturalmente differenti dagli steroidi a 21 atomi di carbonio, come la carbamazepina (farmaco somministrato nel trattamento degli episodi convulsivi) o la rifampicina (utilizzata nel trattamento della tubercolosi), così come l'erba di San Giovanni (galenico a base di iperico utilizzato nei disturbi dell'umore), sono ligandi del PXR. Quest'ultimo, a sua volta, si lega al recettore X dell'acido retinoico (RXR) per formare eterodimeri (PXR-RXR) che interagiscono con elementi di risposta specifici nella regione 5' non tradotta dei geni dei CYP3A. Bisogna sottolineare che tali citocromi sono responsabili delle modificazioni enzimatiche P450-correlate del 50% dei farmaci prescritti correntemente.

Un altro induttore a livello genico dei P450 è il fenobarbital. L'induzione è mediata dal legame ad un recettore costitutivo dell'androstano (CAR). Anche quest'ultimo può formare un complesso eterodimerico con RXR per interagire con l'elemento di risposta specifico nella regione 5' non tradotta dei geni dei CYP2B. Due steroidi endogeni della serie dell'androstano, l'androstano e l'androsteno, legano anch'essi specificamente il CAR e, in tal modo, prevengono l'interazione del complesso recettoriale CAR-RXR con la proteina SRC-1. Questa proteina è il coattivatore di recettori nucleari necessari per l'attivazione CAR-mediata della trascrizione. La somministrazione di fenobarbital o di induttori simili a questo composto, "spiazzando" i ligandi androstanici, consente il legame di SRC-1 e la conseguente trascrizione del gene per CYP2B.

Polimorfismi genetici dei citocromi P450

Oltre che per l'esposizione a vari agenti inducenti, che possono cambiare il "pattern" di espressione dei P450 nel fegato e in altri organi, gli individui possono differire tra loro anche per la velocità con cui metabolizzano un certo composto chimico poiché posseggono particolari geni o alleli per i P450: quando si verifica questa eventualità si parla di polimorfismi. Un polimorfismo è più precisamente una variazione di sequenza del DNA trovata nell'1% o più della popolazione. Queste differenze di sequenza possono essere associate a differenze nel metabolismo dei farmaci. Essendo variazioni genetiche, molte ricorrono in particolari gruppi etnici, per i quali, perciò, alcuni farmaci risultano essere più frequentemente nocivi. È stato calcolato che nella specie umana è polimorfico il 40% dei vari P450 che metabolizzano xenobiotici.

I polimorfismi genetici del CYP2D6 sono stati ampiamente studiati e sono stati riconosciuti 65 alleli differenti. In funzione dei livelli di espressione del CYP2D6, la popolazione è stata suddivisa in *metabolizzatori rapidi* e *lenti*. Se non c'è un sistema alternativo per eliminare il farmaco, questo stesso può divenire tossico a causa della scarsa attività di P450 nei metabolizzatori lenti, mentre nel caso dei metabolizzatori rapidi l'effetto terapeutico del farmaco può mancare.

Molti individui di origine etiope o dell'Arabia Saudita esprimono fortemente il CYP2D6. Questa isoforma di citocromo, pertanto, rende inefficaci per loro una gran varietà di farmaci, che vengono metabolizzati più efficacemente. Molti antidepressivi o neurolettici possono essere considerati esempi significativi del fenomeno, mentre farmaci inefficaci, indicati come "pro-farmaci", possono risultare attivati: la codeina, ad esempio, viene attivamente trasformata in morfina.



Polimorfismi genetici degli enzimi P450

Sono stati trovati alleli multipli per circa il 40% dei geni dei citocromi P450 dell'uomo e questi polimorfismi possono come conseguenza far sintetizzare proteine difettive. Negli Aspetti clinici 11.1 è stato descritto il polimorfismo del CYP21 e la sua importanza nel metabolismo di un composto endogeno. La mancanza di attività di un citocromo P450 può causare molti problemi legati all'accumulo della forma attiva di un farmaco che non può essere adeguatamente metabolizzata. La scoperta di un soggetto che lamentava esagerati effetti ipotensivi quando assumeva debrisoquina, un farmaco antipertensivo, ha permesso la caratterizzazione di soggetti che metabolizzano in modo inefficiente i substrati del citocromo CYP2D6. Circa il 5-10% degli individui di popolazioni caucasiche, l'8% di quelli di popolazioni africane e afro-americane e l'1% degli asiatici presentano un deficit della forma cataliticamente attiva di CYP2D6. Altri farmaci metabolizzati dalla CYP2D6 sono, oltre alla debrisoquina, la sparteina, l'amitriptilina, il dextrometorfano e la codeina. In individui con il gene del CYP2D6 normale circa il 10% di una dose di codeina viene *O*-demetilata a morfina e tale trasformazione è responsabile degli effetti analgesici di questo farmaco, mentre individui privi del CYP2D6 funzionale sono incapaci di catalizzare tale reazione e, quindi, di ottenere l'effetto analgesico associato all'assunzione della codeina.

In individui che mostrano una scarsa capacità di metabolizzare la morfina, un antiepilettico, è stato dimostrato un altro polimorfismo genetico relativo al CYP2C19, citocromo che catalizza l'ossidazione in C4 dell'enantiomero *S* della mefenitoina, inattivandone gli effetti fisiologici. Gli individui metabolizzatori lenti, quando assumono normali dosi terapeutici del farmaco, lamentano effetti sedativi molto più marcati.

Circa il 14-22% dei soggetti di origine asiatici, il 4-7% di africani e afro-americani e il 3% della popolazione caucasica mancano della forma attiva del CYP2C19.

Polimorfismi genetici del CYP2C9 sono presenti in meno dello 0,003% di africani e afro-americani, nello 0,08% degli asiatici nonché nello 0,36% delle popolazioni caucasiche. L'assenza del CYP2C9 funzionale può avere importanti conseguenze, ad esempio, sul metabolismo della *S*-warfarina, somministrata per via orale al fine di inibire la coagulazione del sangue in pazienti che abbiano avuto un attacco cardiaco o un ictus, per prevenire, con la somministrazione del farmaco, recidive di coaguli insidiosi per la loro vita. I livelli plasmatici della *S*-warfarina debbono rimanere entro un range ben definito poiché quantità eccessive potrebbero causare sanguinamento incontrollato e potenzialmente anche la morte. La warfarina, per essere escreta, deve essere metabolizzata dal CYP2C9. Il CYP2C9*3, una variante allelica in cui una isoleucina sostituisce la leucina 359 nella proteina, è responsabile di una sostanziale perdita dell'attività catalitica. Individui che sono carenti del CYP2C9 canonico debbono, di conseguenza, assumere 0,5-1 mg di warfarina a settimana anziché i 4-5 mg al giorno che vengono prescritti agli individui con il citocromo in questione normalmente attivo. Se i 5 mg al giorno venissero assunti da chi esprime un CYP2C9 difettivo, una semplice ferita potrebbe portare ad una emorragia incontrollabile.

Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M., and McLellan, R. A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: An opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmac. Sci.* 20:342, 1999.



Polimorfismi genetici della NADPH-citocromo P450 riduttasi: sindrome di Antley-Bixler (OMIM 207410)

In alcuni individui sono state trovate mutazioni a carico della NADPH-citocromo P450 riduttasi. Questi pazienti presentavano un fenotipo con malformazioni scheletriche caratterizzate da craniosinostosi, sinostosi radio-ulnare o radio-omale e/o femori incurvati, un gruppo di malformazioni cliniche che va sotto la denominazione di sindrome di Antley-Bixler. Questi stessi pazienti presentavano anche steroidogenesi alterata e iperplasia congenita delle surrenali (CAH). Come descritto negli Aspetti clinici 11.1, un difetto del CYP21A2 è la causa più comune di CAH. Dal momento che una riduzione della citocromo P450 riduttasi influenza l'attività di tre isoforme coinvolte nella steroidogenesi (CYP19A e 17A, CYP21A, Figura 11.8), si poteva osservare in questi casi un pattern anormale di ormoni steroidei, che consisteva in ipo- o ipervirilizzazione rispettivamente nei maschi e nelle femmine. In alcuni pazienti con una limitata disponibilità di NADPH-citocromo P450 riduttasi si osservava che le vie di sviluppo scheletrico dell'embrione erano significativamente modificate e che il metabolismo di alcuni farmaci citocromo P450-dipen-

denti era compromesso. Poiché non vi è ridondanza nella porzione che trasferisce elettroni nel sistema microsomiale del P450, ci si aspetta che vi siano difetti, variabili o pleiotropici, relativi alla riduttasi, a seconda di quanto sia grave l'effetto sull'attività dell'enzima. Oltre a ciò, diversi citocromi P450 possono interagire con differenti residui aminoacidici posti sulla superficie della riduttasi ed essere, pertanto, influenzati in maniera diversa dalle mutazioni di questi residui. A seconda, dunque, della localizzazione della mutazione nella struttura della riduttasi e a seconda delle conseguenti alterazioni delle attività enzimatiche o delle interazioni proteina-proteina, le mutazioni possono variare sensibilmente in gravità e in fenotipo.

Flück, C. E., Tajima, T., Pandey, A. V., Aft, W., et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat. Genet.* 36:228, 2004; Scott, R. R. and Miller, W. L. Genetic and clinical features of P450 oxidoreductase deficiency. *Horm. Res.* 69:266, 2008.

Molti individui, invece, mancano di isoforme funzionalmente attive di CYP2D6. Questi pazienti sono predisposti, con l'uso di alcuni antidepressivi o neurolettici, alla "tossicità da farmaco", ma quando assumono codeina questa è inefficace. Per lo stesso motivo, infatti, essi hanno perduto la capacità di una qualsivoglia attivazione, in quanto manca l'attività del CYP2D6.

La perexilina (un bloccante dei canali del calcio) è stata ritirata dal commercio in seguito ad alcuni casi di neuropatie insorte in individui in cui il 2D6 era inattivo. Il propranololo, un beta-bloccante non cardiosellettivo, può non essere efficace nei casi in cui sia carente la medesima isoforma. Negli Aspetti clinici 11.6 sono discussi gli effetti dei polimorfismi genetici.

Sebbene il polimorfismo genetico di un particolare citocromo P450 influenzi il metabolismo di un discreto numero di composti, ci si può aspettare che i polimorfismi della citocromo P450 reductasi, unico e obbligato riducente per i 50 citocromi P450 microsomiali, abbiano effetti complessivi e drammatici sul metabolismo di substrati endogeni e xenobiotici. Se invece viene inattivato completamente il gene della reductasi (knockout genico) in un modello animale, questa strategia risulta letale già nell'embrione. Recentemente sono state descritte nell'uomo mutazioni che, alterando l'attività del gene, provocano effetti molto importanti (Aspetti clinici 11.7).

Inibizione terapeutica dei citocromi P450

Poiché in quasi tutti gli organismi esistono i citocromi P450 e poiché essi svolgono un ruolo così importante nei riguardi dell'omeostasi cellulare, una inibizione selettiva di questi enzimi può essere di importanza clinica. Inibitori azolici (ketoconazolo, itraconazolo e fluconazolo), per esempio, sono usati per controllare le infezioni da lieviti contratte da pazienti con HIV, da malati di cancro in chemioterapia e da pazienti trattati con immunosoppressori. Nel lievito, CYP51 catalizza la demetilazione della molecola di sterolo per la sintesi dell'ergosterolo, un importante lipide di membrana. Nell'uomo, la forma correlata di P450, CYP51A1, catalizza la demetilazione del lanosterolo, reazione essenziale per la sintesi del colesterolo. Sebbene le proteine CYP51 dell'uomo e del lievito siano simili, ci sono tuttavia sufficienti differenze perché gli antifungini azolici siano efficaci inibitori della formazione dell'ergosterolo. Come discusso precedentemente, del resto, questi composti possono anche indurre o inibire la forma nativa del citocromo P450 nell'uomo, causando eventualmente fenomeni di interazione tra farmaci.

Alcuni tumori, come il cancro della mammella, dipendono dagli estrogeni per il loro sviluppo; prevenire la sintesi degli estrogeni senza bloccare gli altri ormoni steroidei può pertanto essere un utile strumento chemioterapico selettivo per ridurre o eliminare il tumore. Il CYP19A1, citocromo che catalizza la trasformazione dell'androstenedione in estradiolo, è un bersaglio interessante per questo tipo di intervento. Un tipo di inibitore particolarmente selettivo è quello basato sul meccanismo d'azione, o inibitore suicida. Questi composti mostrano una grande somiglianza con il substrato dell'enzima, ma durante la catalisi formano un prodotto di inibizione irreversibile con il gruppo prostetico o con la stessa proteina enzimatica. Tali inibitori potrebbero essere altamente specifici per una certa forma di P450 e rappresenterebbero una buona strategia nella fase di progettazione di un farmaco.

È evidente che, senza conoscere il metabolismo di un farmaco e le interazioni P450-mediate, non si possono prescrivere i farmaci in sicurezza, soprattutto se si devono somministrare, come nel caso di pazienti anziani, più farmaci contemporaneamente. È quindi critico determinare come siano metabolizzati i farmaci usati in terapia e se le isoforme di P450 saranno inibite dalle differenti sostanze. Le cure farmacologiche approvate dalla "Food and Drug Administration" (FDA) richiedono che sia presentato uno studio approfondito sul metabolismo dei farmaci prima che essi siano definitivamente approvati per il loro utilizzo nell'uomo.

11.7 • LE OSSIDO NITRICO SINTASI: PROPRIETÀ E FUNZIONI ENZIMATICHE

Le ossido nitrico sintasi (NOS) sono enzimi, contenenti gruppi prostetici di natura sia flavinica che emica, che catalizzano la sintesi dell'ossido nitrico (NO) tramite due successive reazioni di monossigenazione, analoghe a quelle catalizzate dai citocromi P450. Le NOS svolgono la loro attività catalitica in forma dimerica e posseggono due domini principali: quello in cui si trova l'eme, dominio ossigenasico e strutturalmente non correlato a quello dei citocromi P450, e quello flavinico, reductasico, che ha una struttura che ricorda quella della P450 reductasi (Figura 11.17). Gli elettroni che derivano dal NADPH vengono trasferiti su FAD e FMN prima di ridurre un gruppo ferro-eme sul quale una molecola di O₂ viene, quindi, legata e attivata. I due domini, reductasico e ossigenasico, sono collegati da una porzione della proteina che possiede un sito di legame per la calmodulina e solo quando quest'ultima si lega i due siti diventano funzionalmente attivi.