

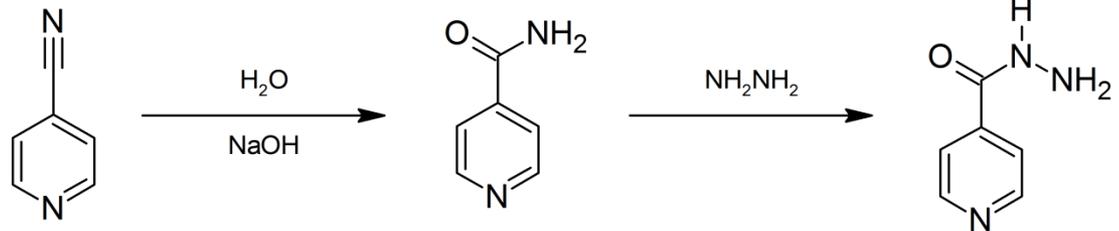
I metaboliti reattivi e il legame covalente a macromolecole

- Isoniazide (INH) è un esempio di come non solo i metaboliti di composti estranei possono essere tossici, ma possono anche attivare sostanze endogene a composti reattivi

- Danni al fegato in pazienti sottoposti a terapia antitubercolare

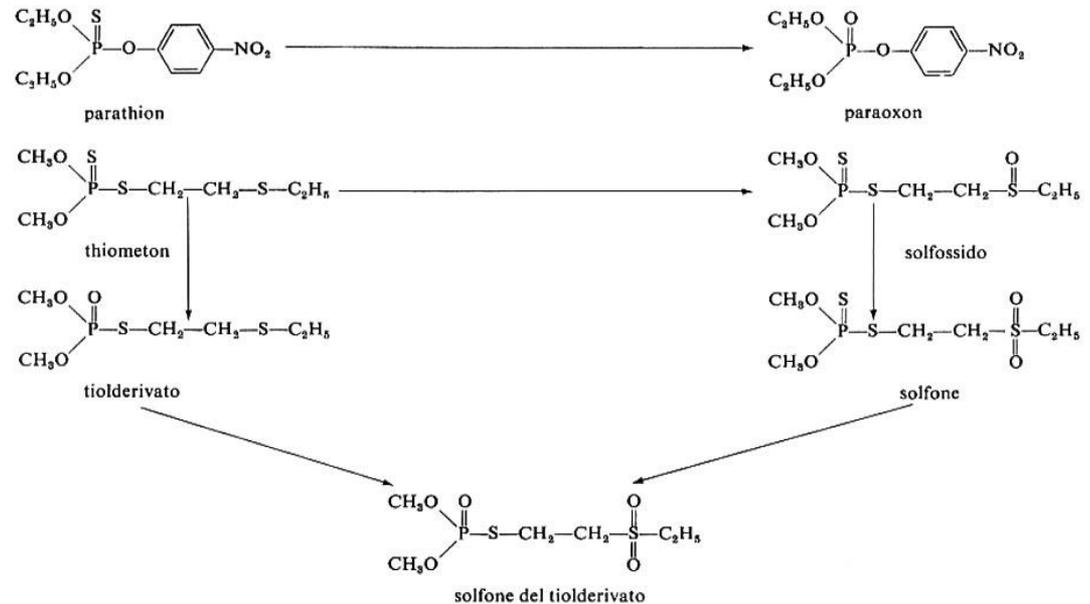
- Ha un'azione inibitoria sul metabolismo epatico a livello del citocromo P450

- Necrosi epatica



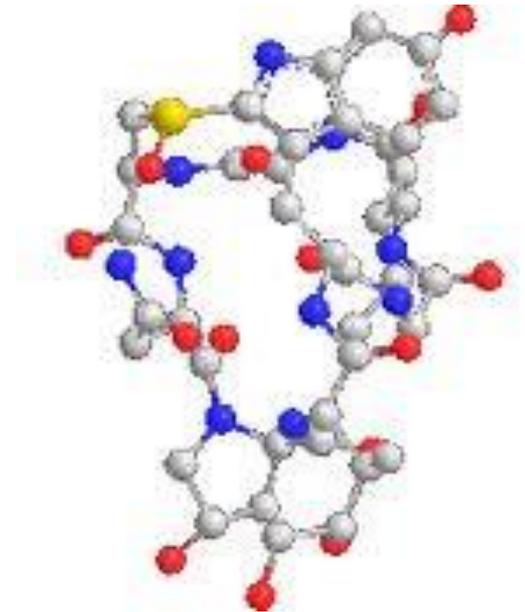
I composti tiolici attivati per S-ossidazione

- Molecole estranee contenenti gruppi SH (R-SH) possono essere idrossilate allo zolfo
- Il primo prodotto intermedio, l'acido solfonico (R-S-OH), è instabile ed estremamente reattivo
- Insetticida parathion
- Attivazione mediata da citocromo P-450 di parathion a paraoxon e zolfo reattivo

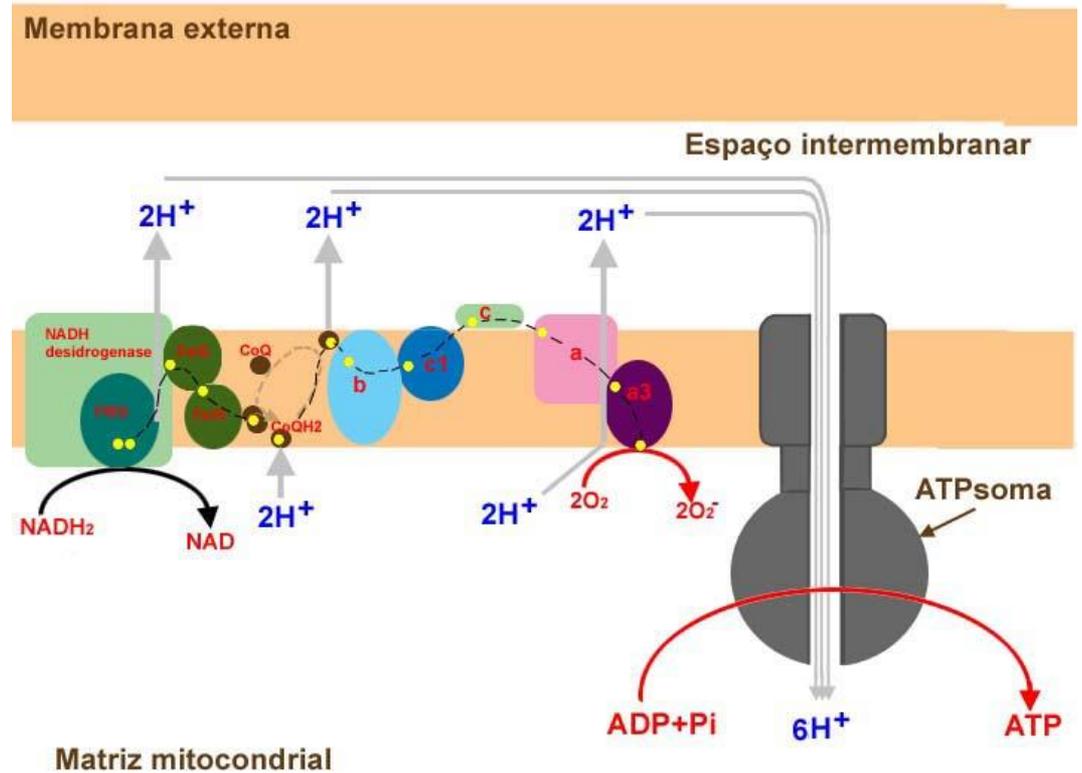


La citotossicità

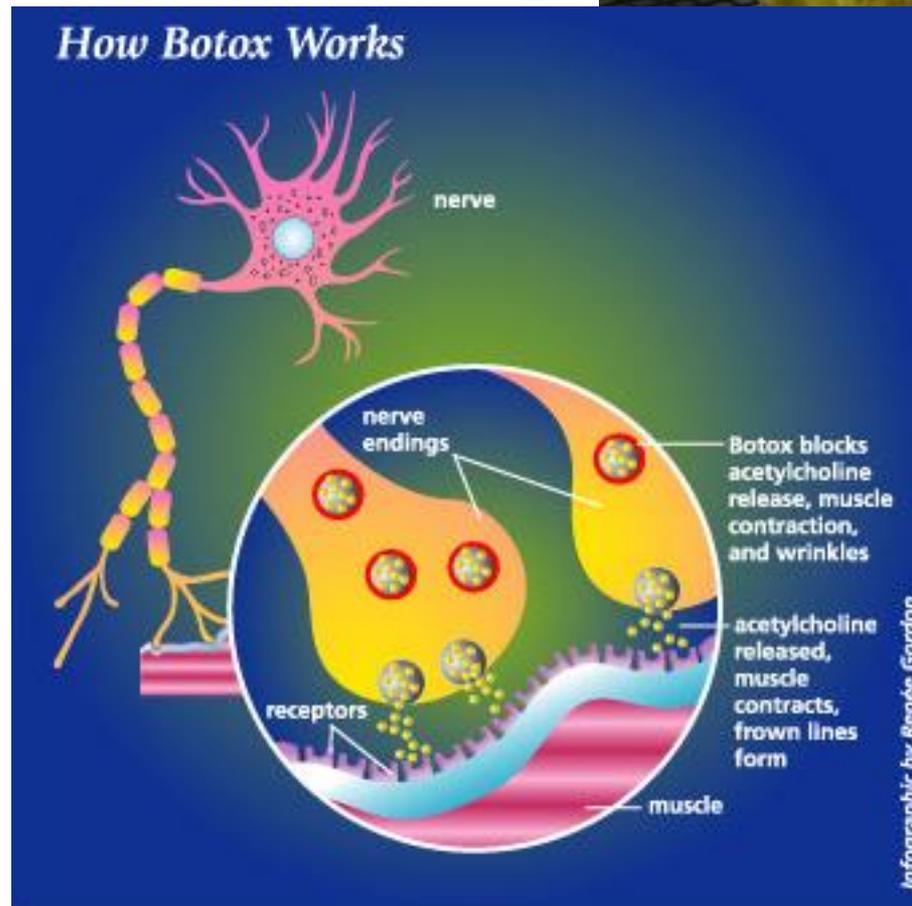
- α -Amanitina
- Presenza nel fungo *Amanita phalloides*
- Octapeptide
- Inibizione della RNA-polimerasi, in particolare della RNA-polimerasi II dipendente da DNA



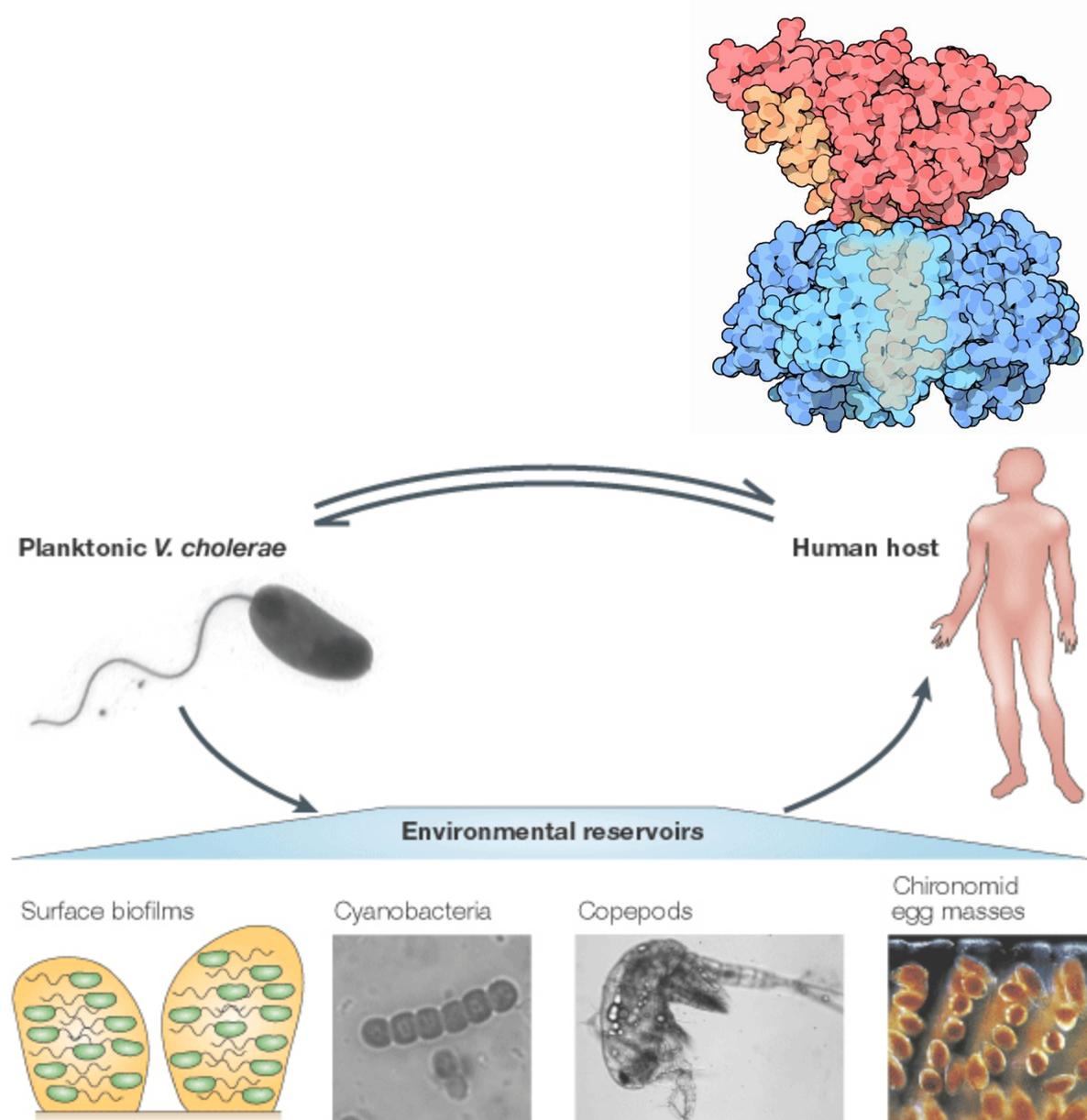
- Antimicina A
- Presenza nel batterio *Streptomyces griseus*
- Inibizione del trasporto di elettroni mitocondriali al citocromo b/c₁



- Tossina A del botulino
- Presenza nel batterio *Clostridium botulinum*
- Inibizione della liberazione di acetilcolina dalle terminazioni presinaptiche dei neuroni

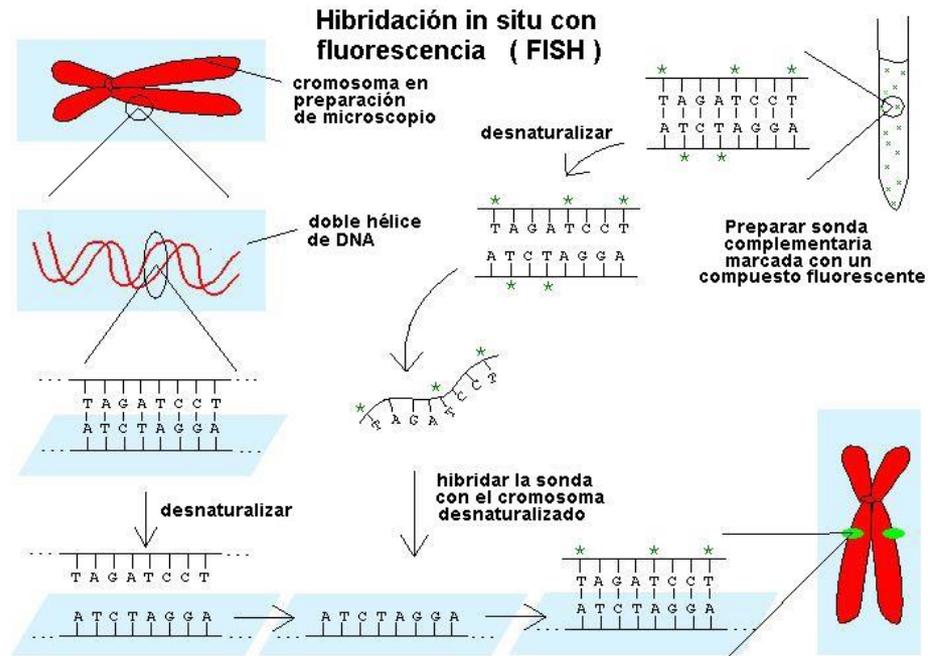
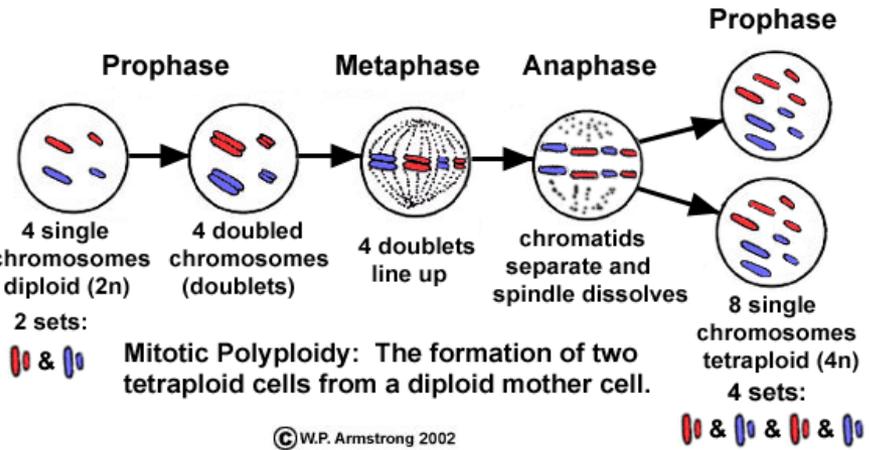
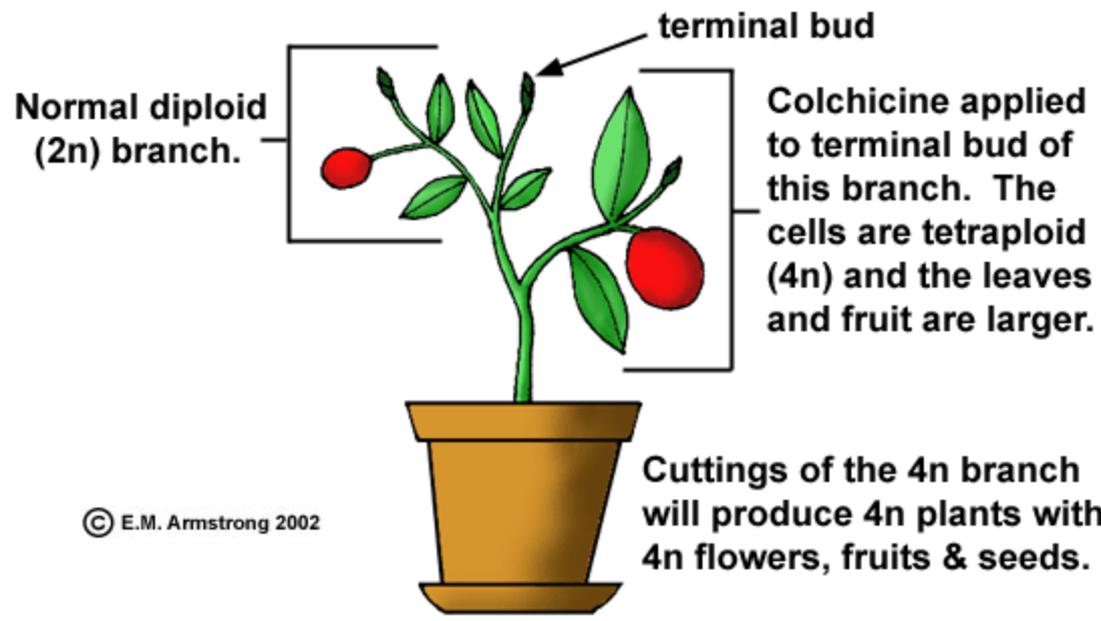


- Tossina del colera
- Presenza nel batterio *Vibrio cholerae*
- ADP-ribosilazione della proteina G stimolante della adenilato ciclasi con la conseguenza di una maggiore produzione di cAMP

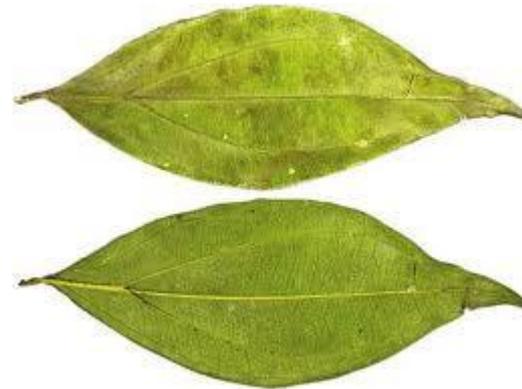


Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

- Colchicina
- Presenza nella pianta colchico
- Inibizione dell'aggregazione dei microtubuli e disturbo della formazione dell'apparato del fuso e quindi della divisione cellulare

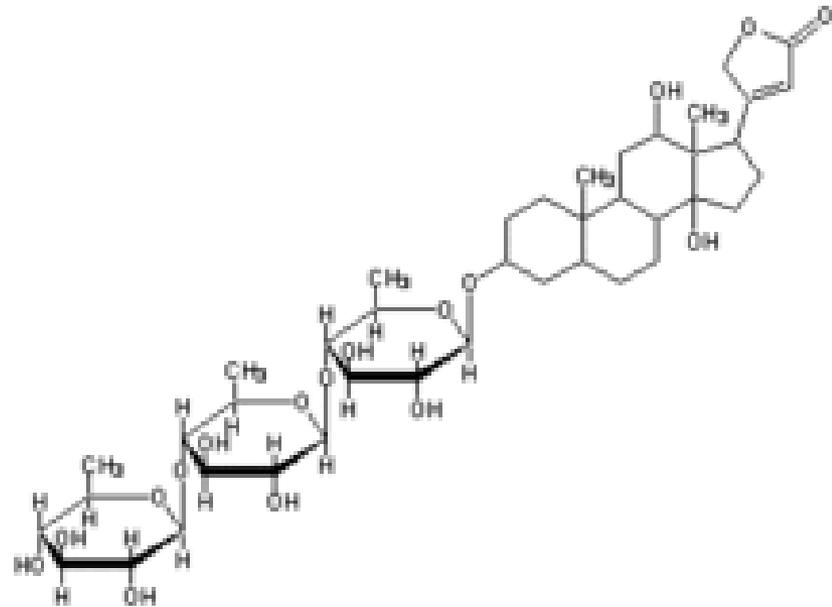


- Curaro
- Presenza nelle piante dei generi *Strychnos* e *Chondrodendron*
- Inibizione del trasferimento dello stimolo del nervo alle cellule muscolari per occupazione del recettore *n*-colina nelle sinapsi neuromuscolari

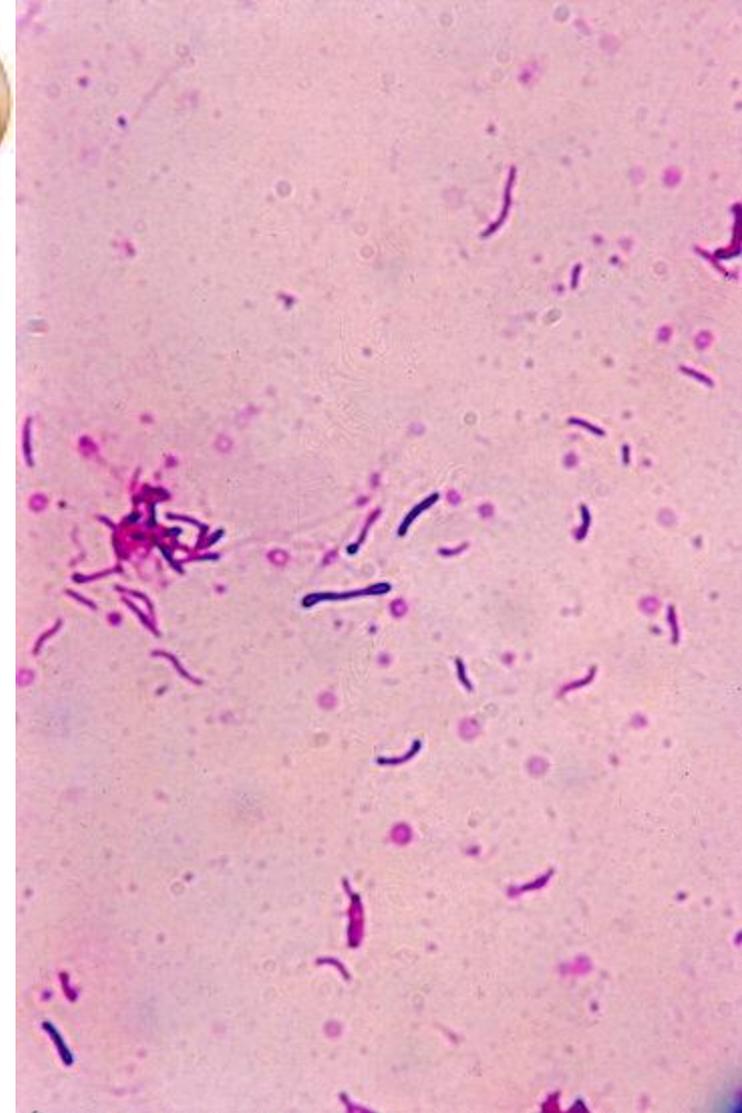
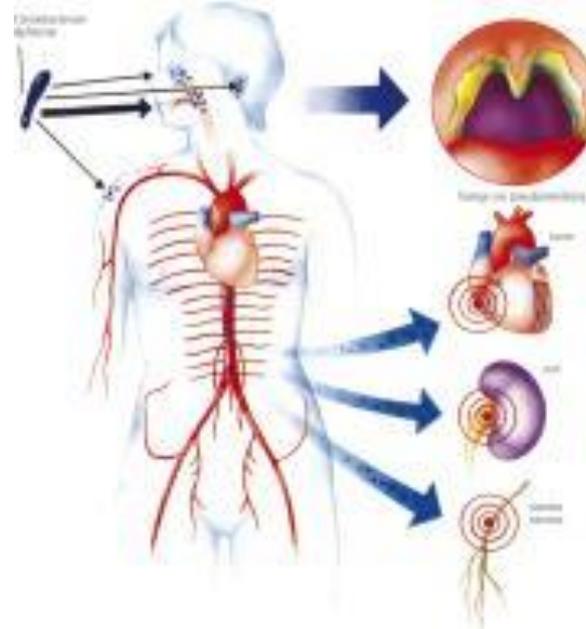




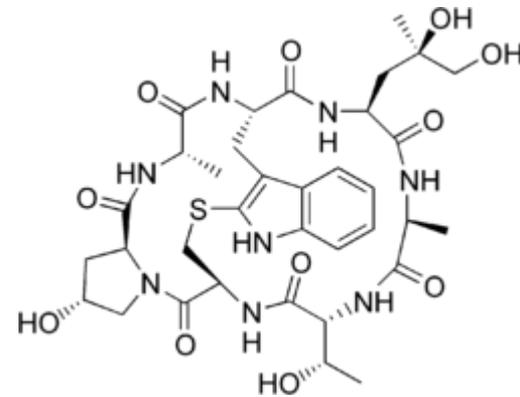
- Digitossina
- Presenza nella pianta digitale
- Inibizione della Na^+/K^+ -ATPasi



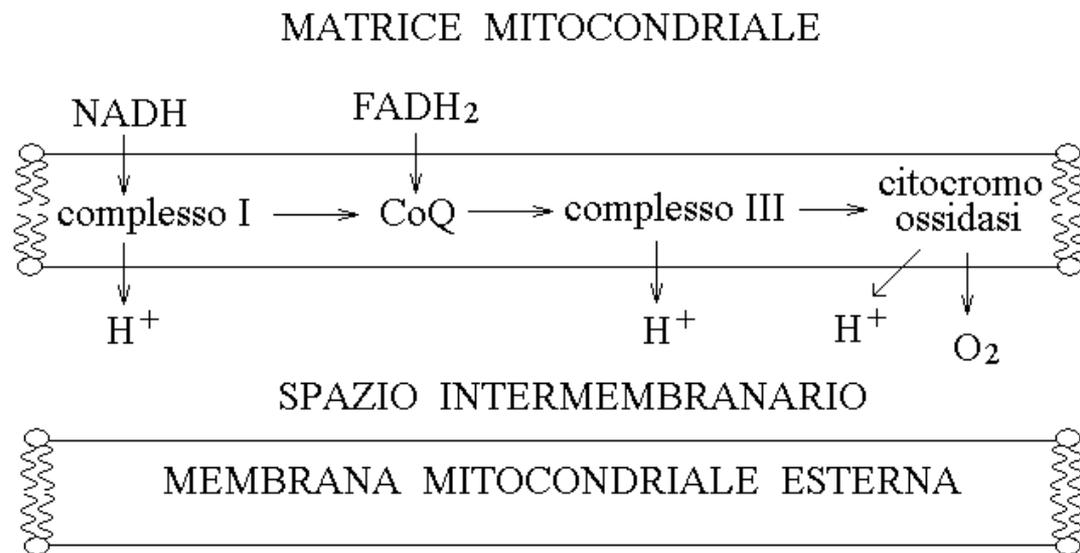
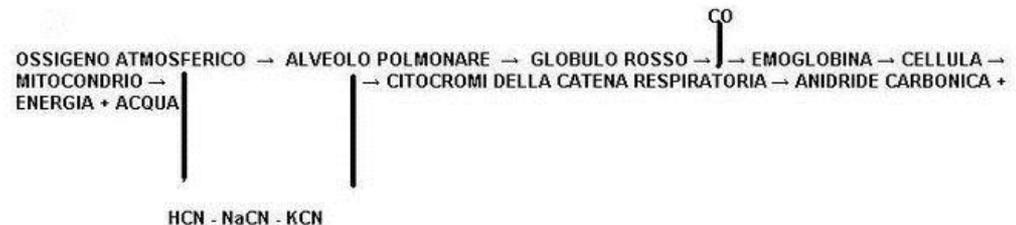
- Tossina della difterite
- Presenza nel batterio *Corynebacterium diphtheriae*
- Inibizione della sintesi delle proteine per ADP-ribosilazione del fattore di allungamento (EF-2)



- Falloidina
- Presenza in *Amanita phalloides*
- Stabilizzazione dell'attinofilamento

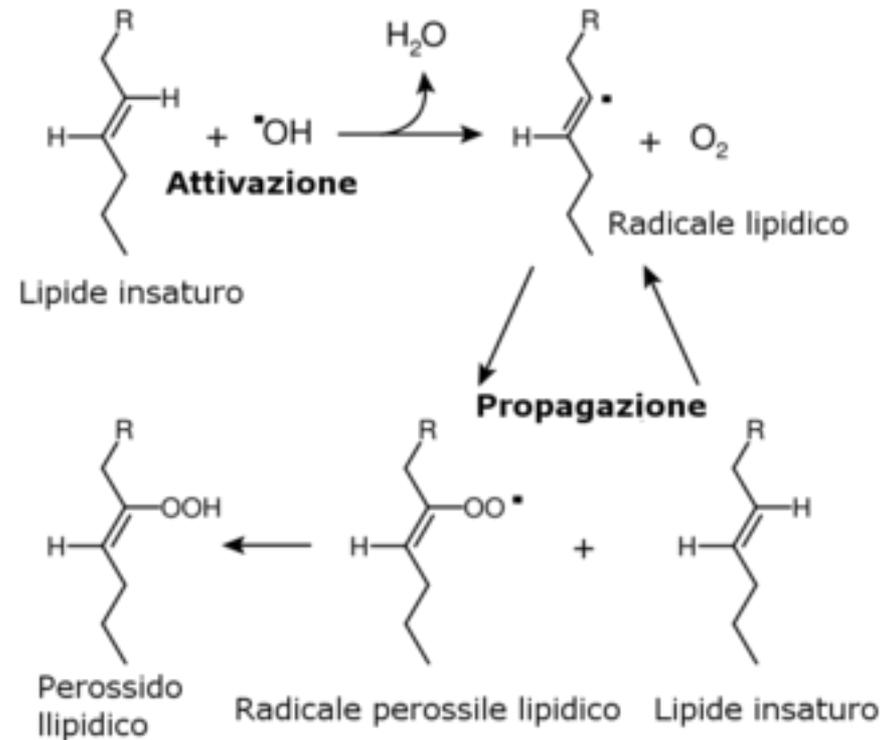


- Sono poche le sostanze di sintesi in grado di esibire la loro azione tossica mediante il danneggiamento di singole funzioni cellulari.
- Acido cianidrico.
- Inibizione del trasporto di elettroni dei mitocondri mediante il legame a Fe^{3+} della citocromoossidasi.



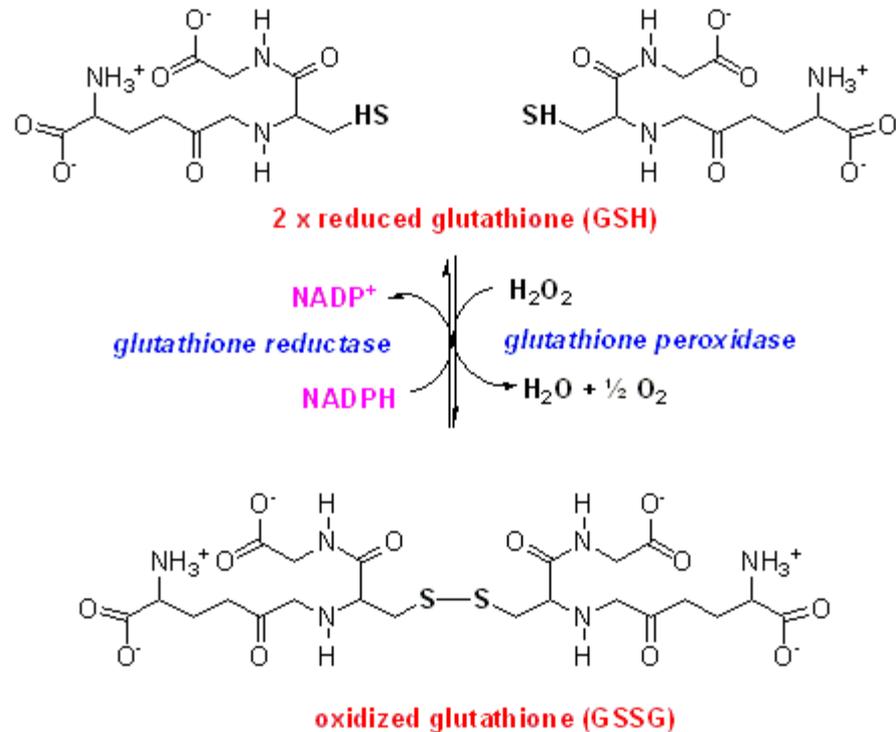
La perossidazione lipidica

- Si formano tra gli altri composti etano e pentano, che sono rintracciabili anche nell'aria espirata
- Vengono distrutti componenti della membrana
- Non è provocata solo da forti ossidanti, ma può verificarsi quando l'equilibrio redox di una cellula dell'organismo viene disturbato
- La dimostrazione che una sostanza chimica provoca la perossidazione lipidica non significa necessariamente che questo processo abbia un ruolo centrale anche nella sua azione citotossica
- Spesso non è possibile stabilire se una perossidazione lipidica individuata è la causa primaria o solo la conseguenza del danno cellulare



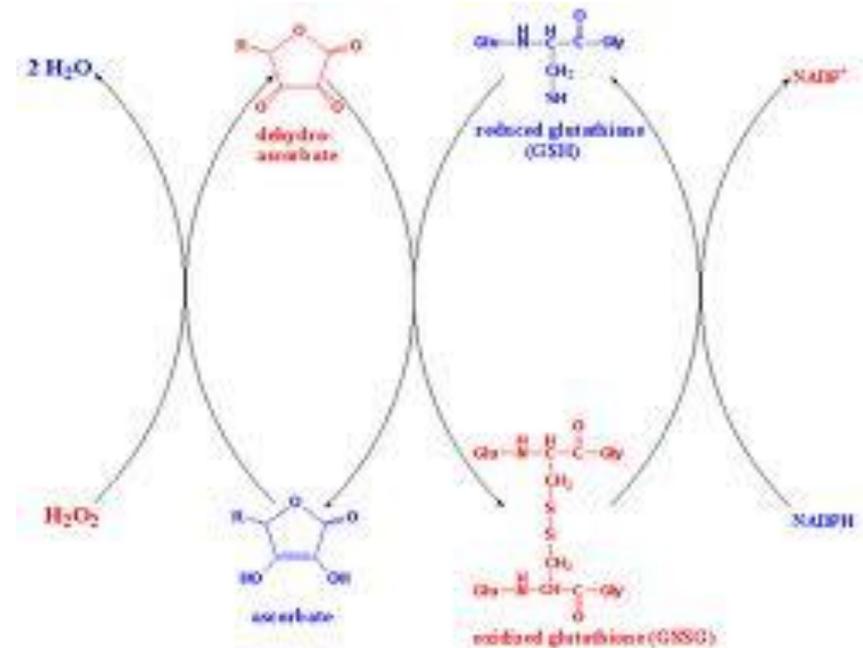
Il danneggiamento di sistemi redox

- Sistemi redox: coenzimi trasportatori di H NAD, NADP e riboflavine, le coppie substrato-prodotto lattato/piruvato, acetaldeide/acido acetico e acido ascorbico/acido deidroascorbico, il sistema glutatione e le proteine contenti gruppi tiolici
- La modifica dello stato redox avviene attraverso enzimi che catalizzano il trasferimento di un elettrone
- La concentrazione e la frazione relativa di coenzima e substrati ossidati e ridotti determinano lo stato redox della cellula

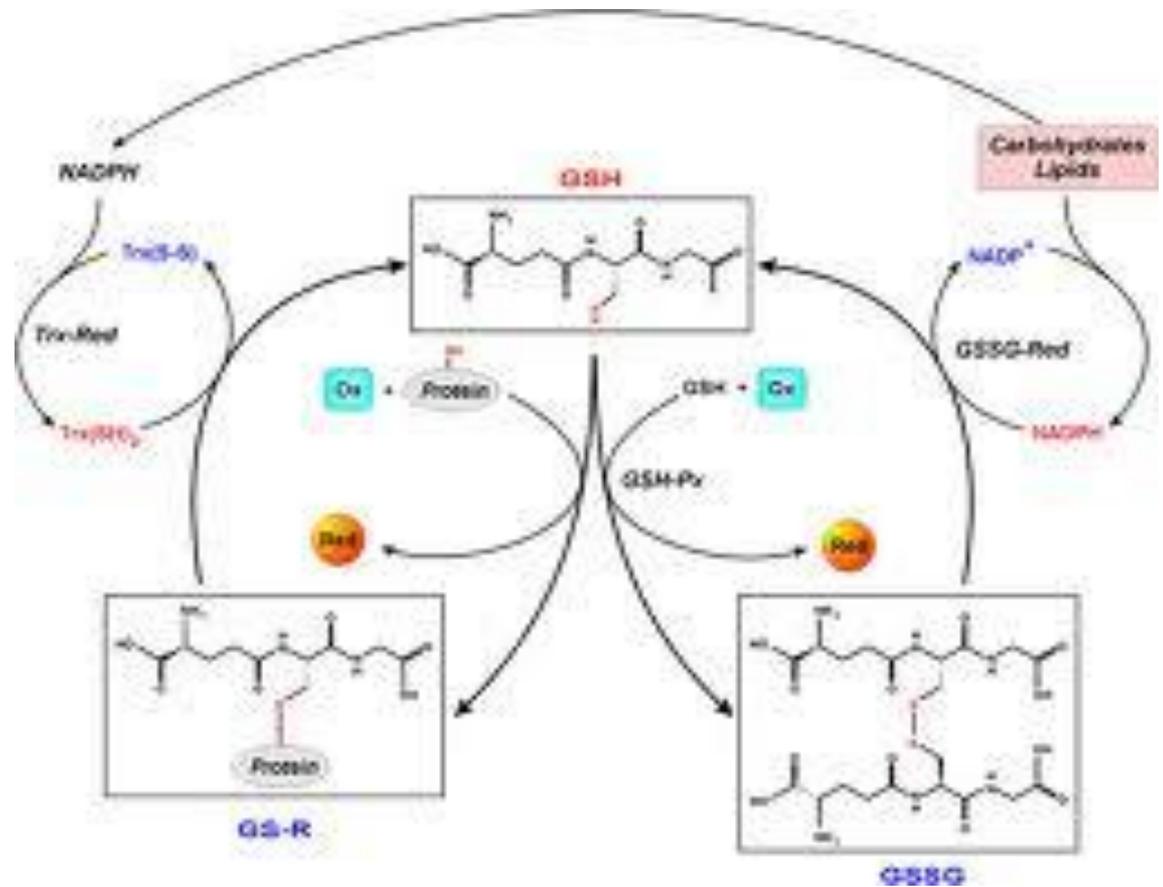


Effetti sulla vitalità delle cellule:

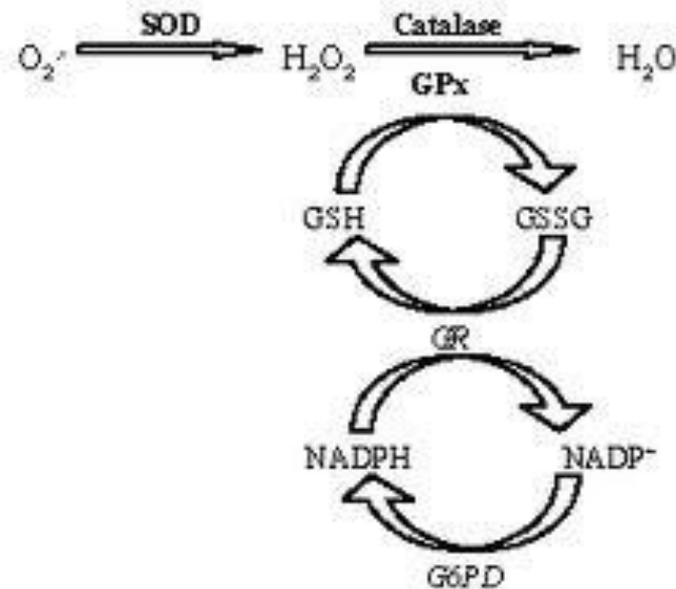
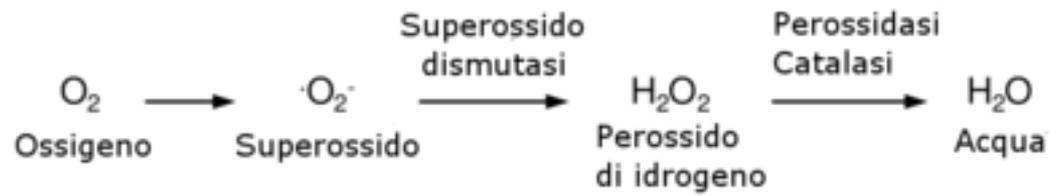
1. Diminuzione del rapporto GSH/GSSG
2. Perossidazione lipidica
3. Ossidazione di tioli delle proteine e perdita dell'attività di proteine (enzimatiche)
4. Rottura di catene del DNA
5. Stress ossidativo



- La formazione del radicale anionico superossido e altre specie ossigenate reattive per ciclo redox di composti chimici
- Le reduttasi possono essere la NADPH-citocromo P-450 reduttasi, l'aldeidereduttasi e la chetoreduttasi



La cellula si protegge dalle ROS o dai loro prodotti di reazione cellulari, come perossidi lipidici, attraverso gli enzimi superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi e anche gli antiossidanti β -carotene e α -tocoferolo



- SOD scavenges gli anioni superossido
- GPX e CAT detossificano H_2O_2 , riducendola ad acqua e ossigeno
- GPX utilizza il potere riducente del glutathione (GSH) e 2 molecole di GSH sono ossidate per formare GSSG, riducendo una molecola di perossido
- CAT usa la stessa H_2O_2 come molecola donatrice di elettroni
- ROS servono come segnale per l'induzione dell'apoptosi attivando una serie di molecole di segnale cellulare, quali caspasi e chinasi

- Le ROS possono reagire anche con il DNA, causando rotture del filamento di DNA
- Se la frazione di GSSG aumenta, si arriva all'inibizione della sintesi proteica e della divisione cellulare
- La cellula si protegge dall'alterazione dello stato redox dei gruppi tiolici attraverso il trasporto attivo di GSSG all'esterno della cellula
- Questo può portare in condizioni estreme a una diminuzione della concentrazione di GSH

ROS

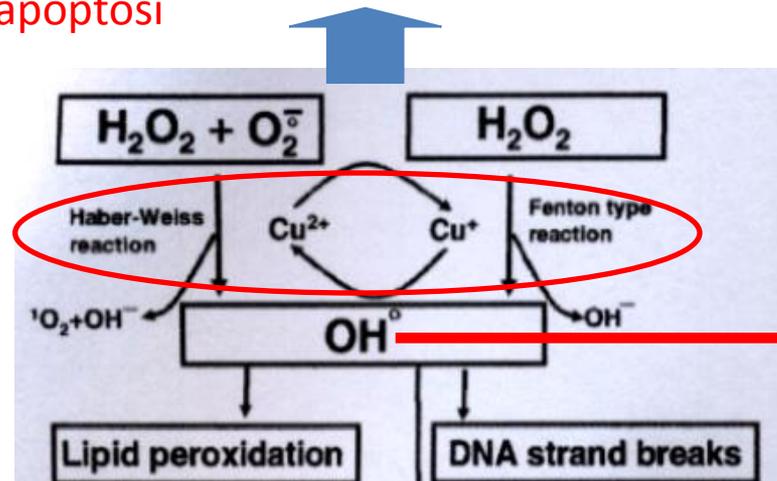
- radicale superossido $O_2^{\cdot-}$
- radicale idrossile OH^{\cdot}
- perossido d'idrogeno H_2O_2
- ossigeno singoletto O_2^*

non inattivati, reagiscono con i
costituenti della cellula

STRESS OSSIDATIVO

- perossidazione dei lipidi di membrana
- danni al DNA e conseguenti mutazioni
- ossidazione e disattivazione di proteine ed enzimi
- apoptosi

Cu in eccesso:



il radicale idrossile è
estremamente reattivo

Stress ossidativo

Quando l'azione dei radicali liberi è così fortemente espletata da non poter essere controllata dai meccanismi di difesa cellulari (o questi scarseggiano per quantità e/o efficacia) si verifica la condizione di “stress ossidativo” in cui si attuano i danni causati dalle ROS:

- Perossidazione dei lipidi di membrana
- Disattivazione di enzimi e proteine per ossidazione dei gruppi ossidabili (come i gruppi sulfidrilici –SH)
- Alterazioni del DNA
- Processi apoptotici e/o necrotici

- Stress ossidativo e infiammazione cronica in relazione con un aumentato rischio di cancro
- Malattie con un sovraccarico di ossiradicali, come coliti ulcerative, epatiti virali, pancreatiti, emocromatosi e malattia di Wilson, sono associate ad un aumentato rischio di tumore
- In particolare, l'emocromatosi, malattia genetica caratterizzata da un eccessivo deposito di Fe a livello epatico, risulta in cirrosi, insufficienza epatica e carcinoma epatocellulare

L'inibizione della formazione di ATP

- Gli inibitori della formazione di ATP portano all'arresto del metabolismo cellulare
- “Disaccoppiamento” della sintesi di ATP dal trasporto di elettroni
- I “disaccoppianti” provocano un trasporto protonico passivo attraverso la membrana e possono quindi fare diminuire il potenziale di protoni elettrochimico
- A causa della perdita della forza protonomotrice i mitocondri non sono più in grado di sintetizzare ATP

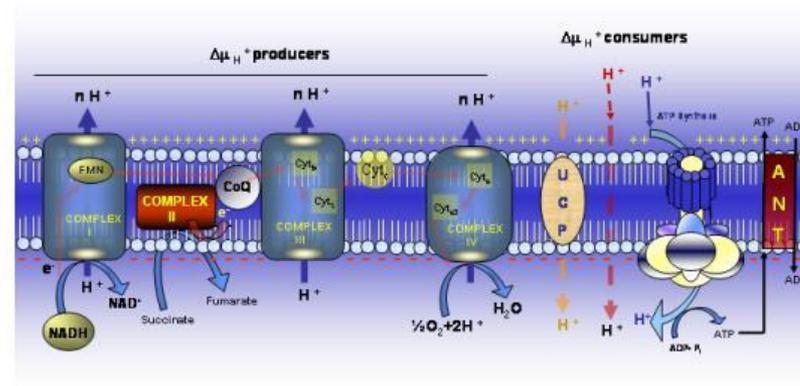


Fig 2 Schematic representation of mitochondrial respiratory chain and uncoupling.

Apoptosi

(o morte cellulare programmata)
contribuisce al
modellarsi delle
strutture portando
a morte selettiva di
gruppi di cellule

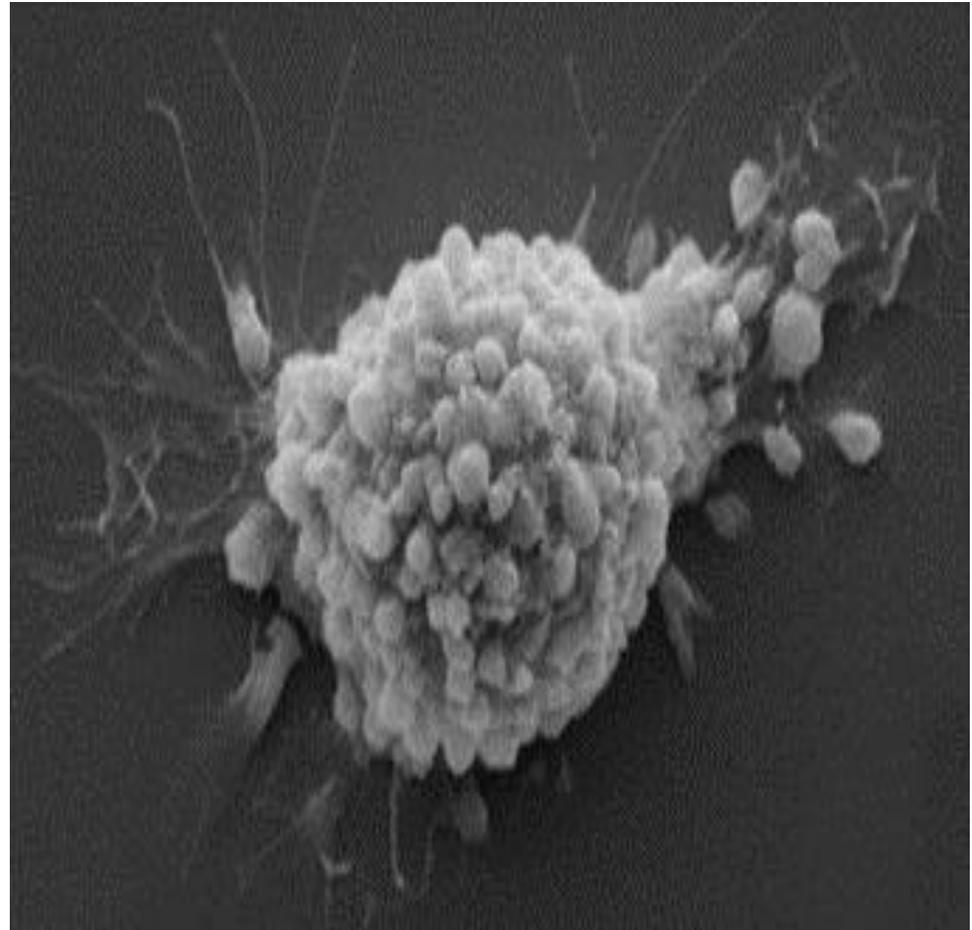


Apoptosi

(o morte cellulare programmata)

**processo fisiologico di
tutti gli organismi
eucariotici
pluricellulari**

**adottata per eliminare
attivamente le cellule
“indesiderate”**

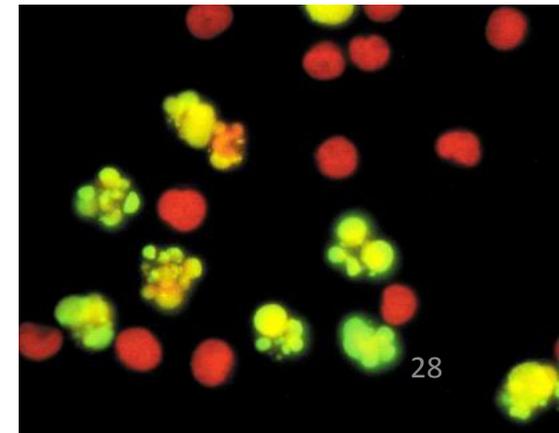
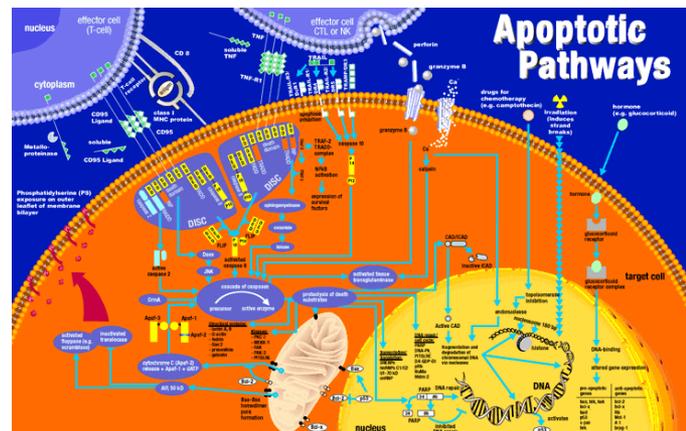


Programma apoptotico complesso :

- regolazione coordinata di prodotti genici specifici
- serie controllata di reazioni cellulari



molteplici eventi morfologici, biochimici e molecolari



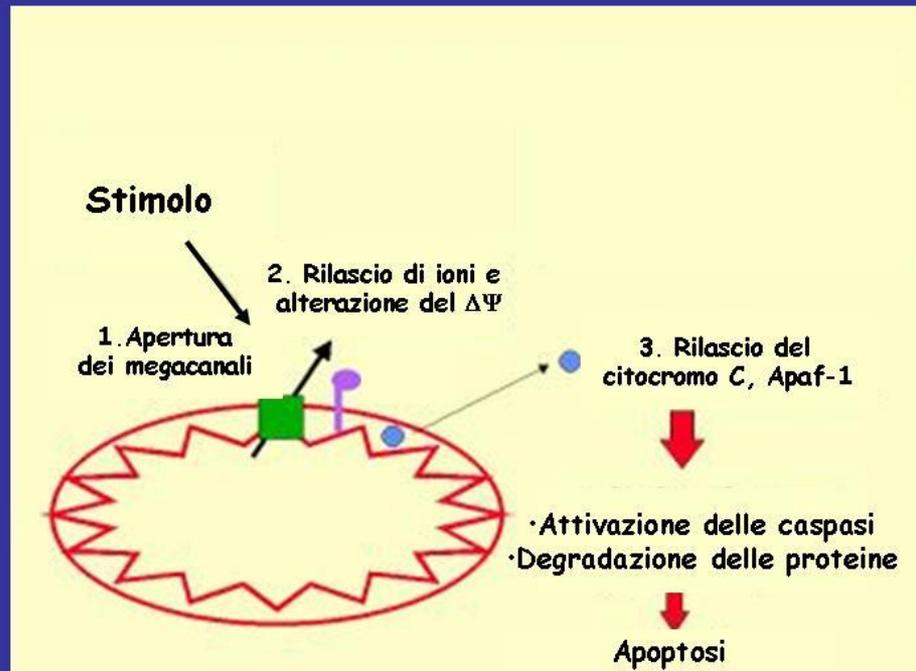
Perdita dell'asimmetria dei fosfolipidi

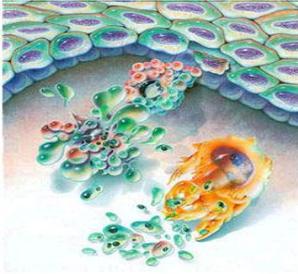


Esposizione dei residui di fosfatidilserina sulla membrana plasmatica esterna e può servire come innesco di fagocitosi

Questo evento precede la perdita dell'integrità della membrana

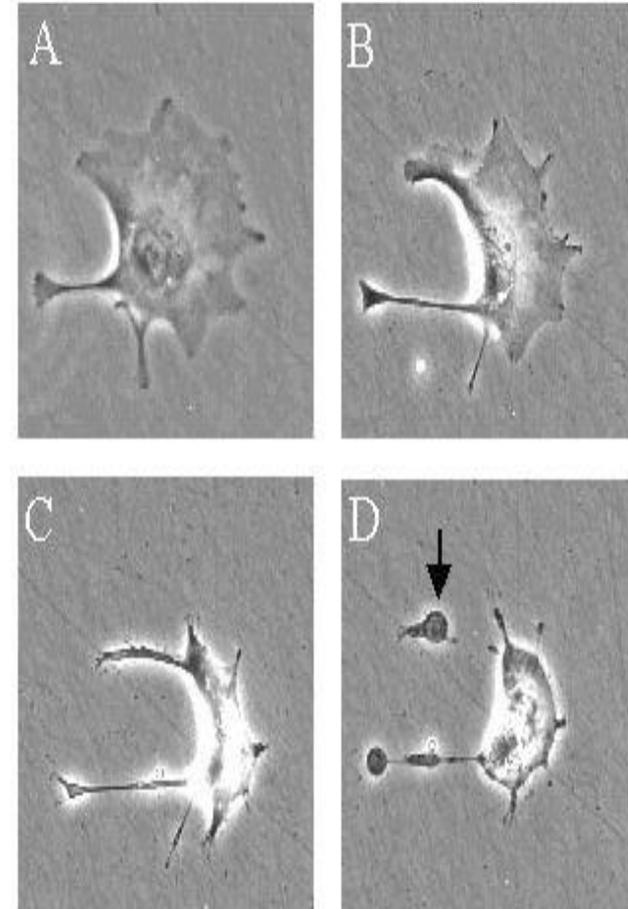
EVENTI APOPTOTICI



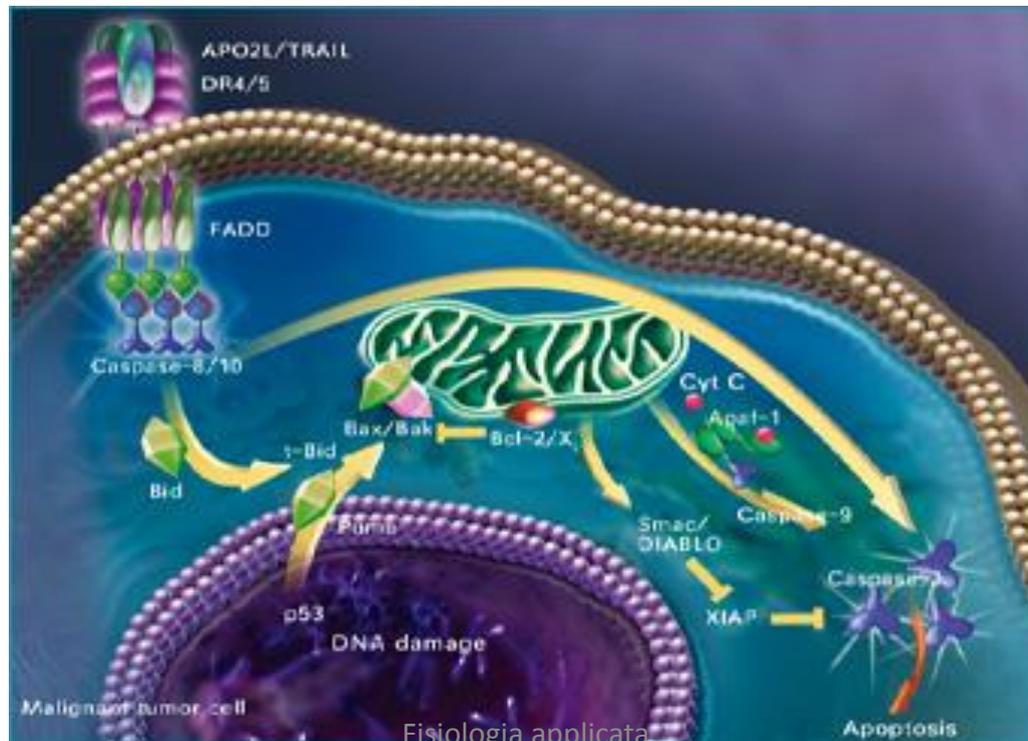


Con l'Apoptosi, la cellula subisce:

- condensazione
- aumento della concentrazione citosolica
- frammentazione del nucleo
- permeabilità delle membrane mitocondriali (PTP)
- rilascio del *citocromo c*
- avvio della cascata di attivazione delle *caspasi*
- “blebbing”
- fagocitosi



Diversi sono gli stimoli e diverse le vie che possono portare all'apoptosi.
Una di queste è la **via intrinseca**.



Bax (*Bcl-2 Associated X protein*)

funzione pro-apoptotica, attivatore
costituita da 3 domini BH

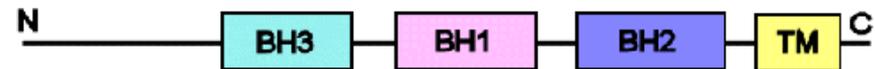
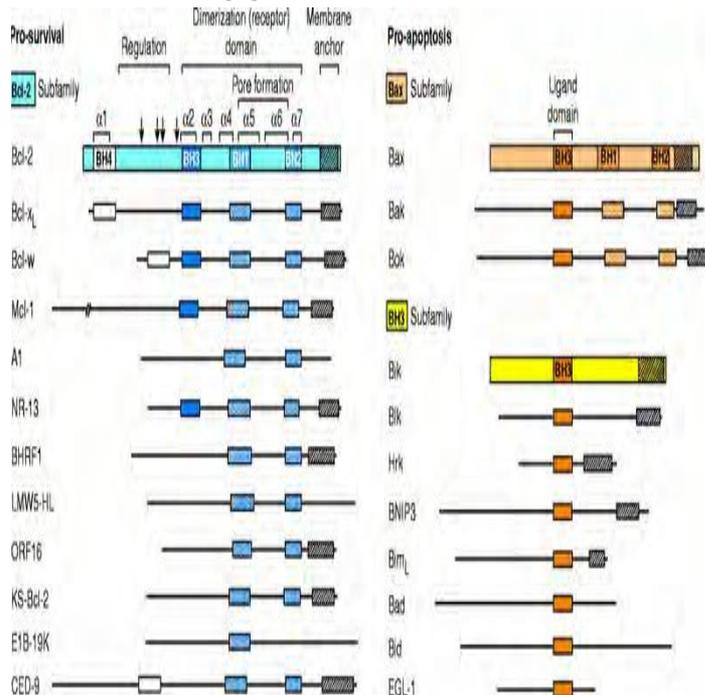
formando omodimeri Bax:Bax
stimola la morte cellulare (sembra
vadano a formare l'mtPTP)



FAMIGLIA DI BCL-2

-sequenze simili (BH1 e 2)

-funzioni opposte



dominio "suicida"

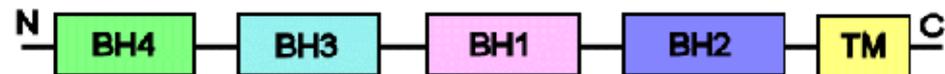
Bcl-2 (*B-Cell Leukemia/Lymphoma* 2)



**funzione anti-apoptotica, soppressore
costituita da 4 domini BH**

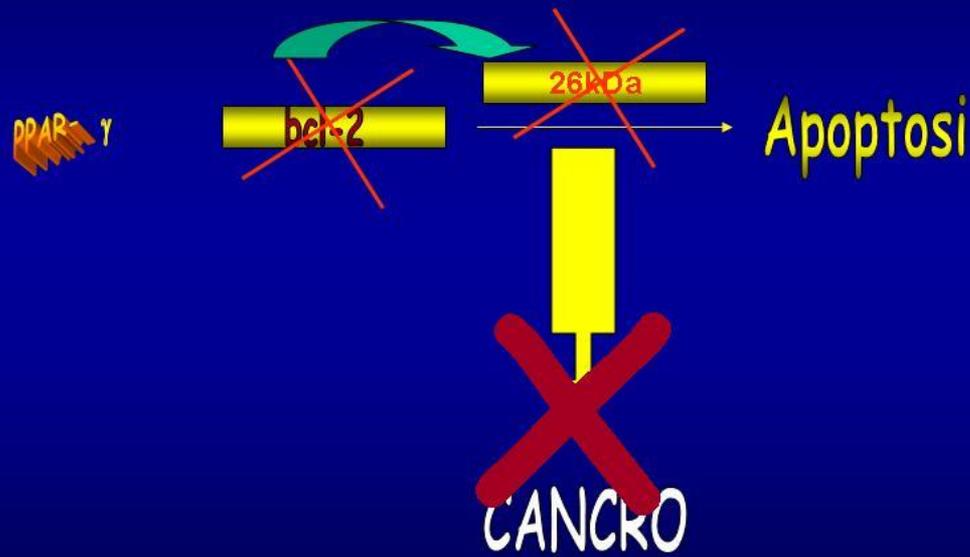
**proteina in forma α : si ancora in
membrana con la regione C-terminale
idrofobica**

**formando eterodimeri Bax:Bcl-2
impedisce il rilascio del citocromo c
dai mitocondri**



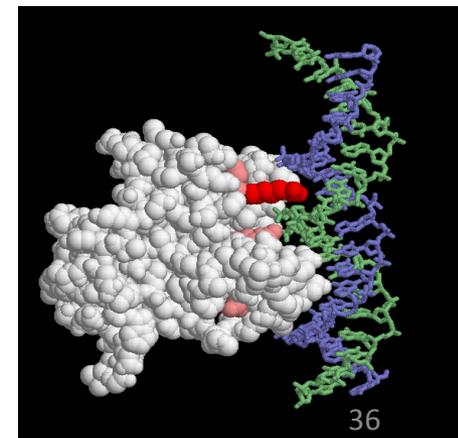
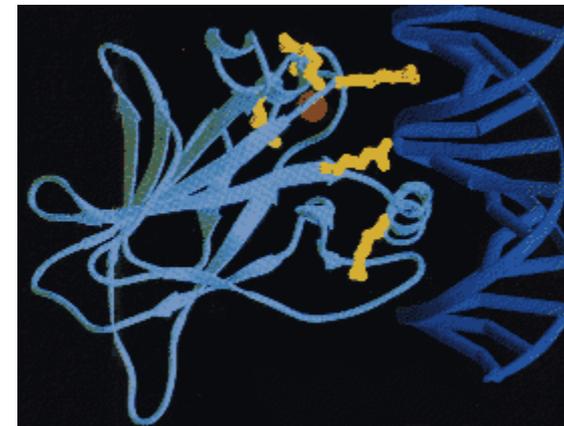
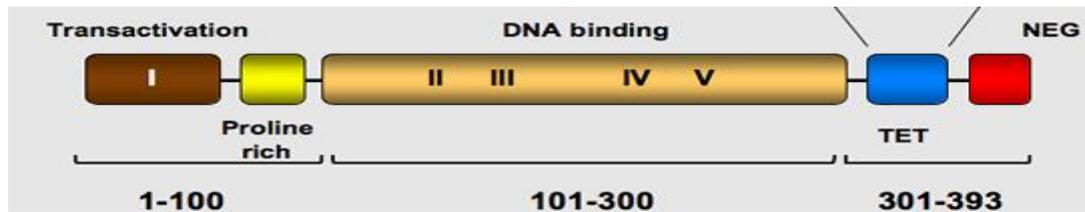
FAMIGLIA DI BCL-2
-sequenze simili (BH1 e 2)
-funzioni opposte

RUOLO DI BCL-2 NELL'APOPTOSI E NEL CANCRO

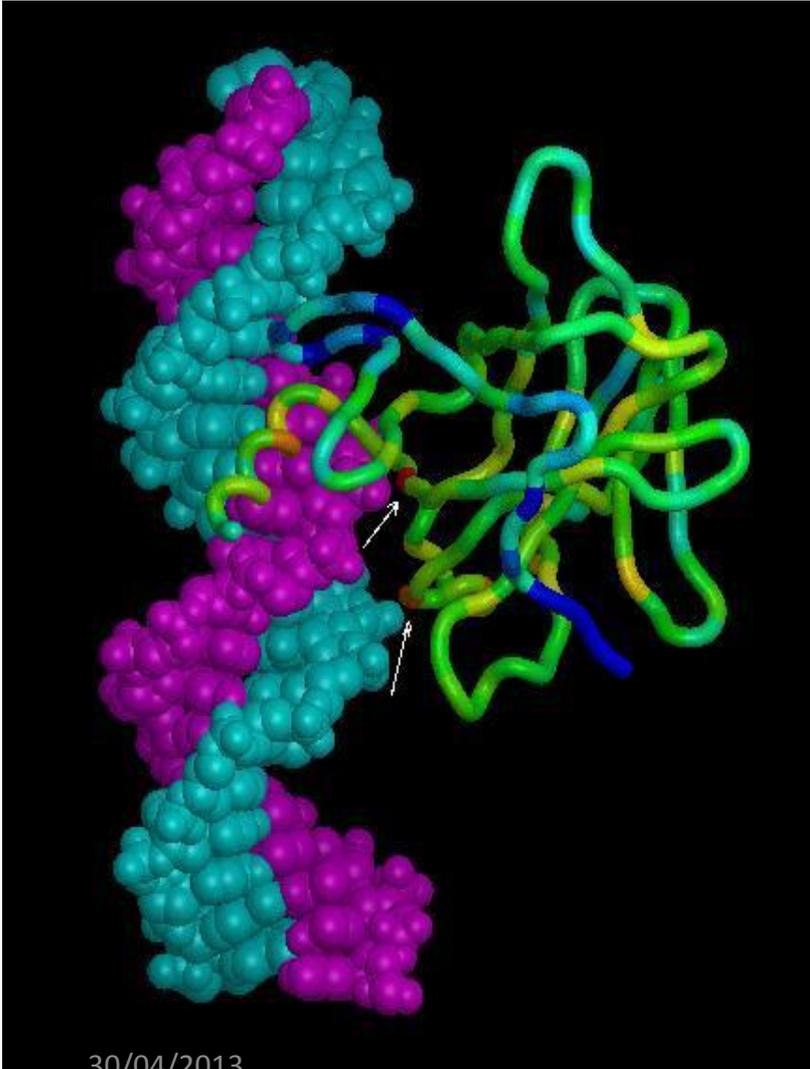


p53

- funzione pro-apoptotica (oncosoppressore)
- partecipa a gran parte dei processi apoptotici
- segnali di stress cellulare (es. danno al DNA) favoriscono la sua trascrizione
- stabilizzata da fosforilazione
- controlla il ciclo cellulare (G1) per la riparazione dei danni
- fattore di trascrizione (anche di Bax)



p53

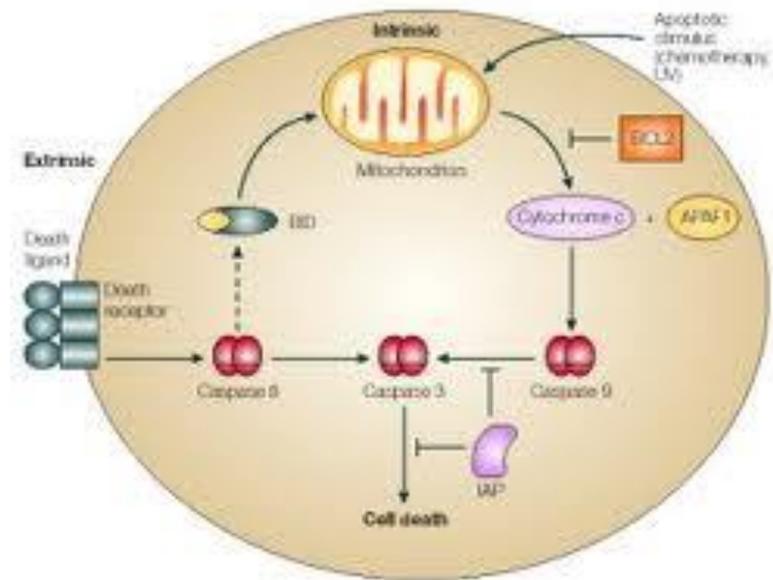
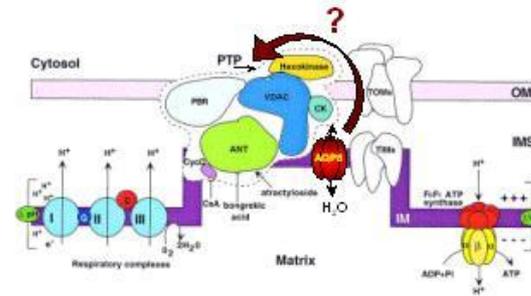


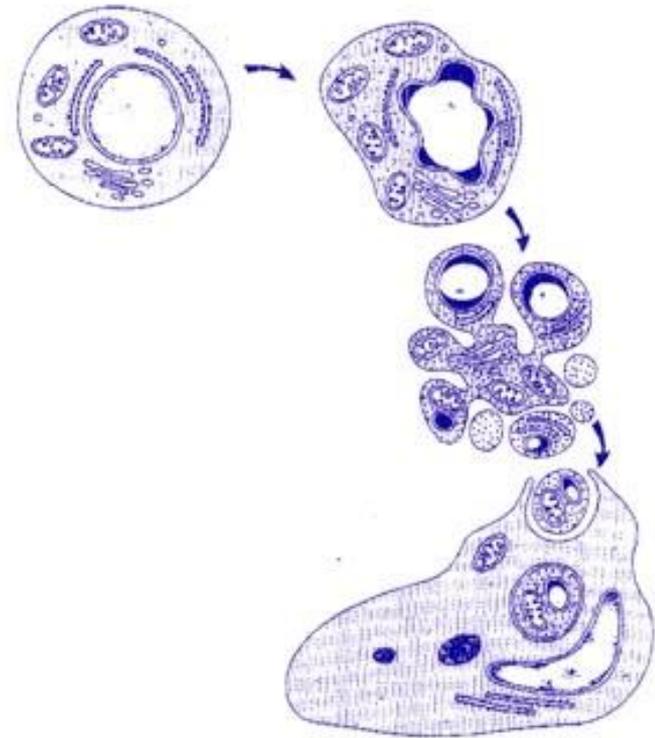
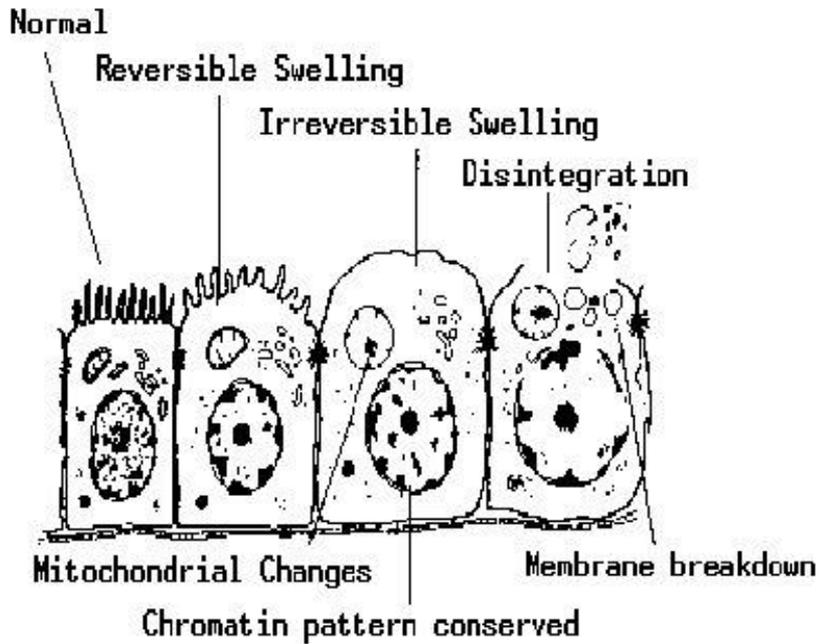
- ❖ soppressore tumorale
 - Induce l'apoptosi
 - Inibisce la divisione e proliferazione cellulare non programmata
- ❖ fattore trascrizionale
- ❖ coinvolta nella riparazione del DNA danneggiato
 - Preserva l'integrità e stabilità del genoma
 - Previene le mutazioni
 - Regola in ciclo cellulare in G1

Nel 50% dei tumori p53 risulta mutata

Il danneggiamento dell'omeostasi cellulare del calcio in rapporto alla morte cellulare

- L'apoptosi gioca un ruolo importante nella rimozione di tessuti embrionali, regolazione delle dimensioni degli organi ed eliminazione di cellule danneggiate e precancerose
- L'apoptosi e la necrosi mostrano un quadro morfologico differente e diversi meccanismi di induzione





Necrosi

vs

Apoptosi

- Trasformazioni morfologiche nell'ambito del nucleo cellulare
- Condensazione cromatina = picnosi
- Altri organuli rimangono intatti
- Progressiva contrazione volume cellulare
- Fagocitosi da parte di un'altra cellula

Tabella I: Principali induttori di apoptosi

Danno al DNA irreparabile
Perturbazione del ciclo cellulare
Aberrazioni del metabolismo cellulare
Perdita di molecole extracellulari che inibiscono la morte cellulare o promuovono la sopravvivenza cellulare
Ligandi di morte, per es. Fas ligando
Sottrazione di fattori di crescita
Influsso di calcio
Glucocorticoidi
Radicali liberi
Shock termico
Infezioni virali e tossine batteriche
Radioterapia
Chemioterapia

- Aumento di volume
- Cambiamento vistoso degli organuli cellulari
- RE e mitocondri sono gonfiati
- Creste mitocondriali spariscono
- Si accumula nei mitocondri materiale flocculento e cristallino: proteine denaturate e idrossipatiti
- Nucleo non mostra alcun cambiamento
- Talvolta cariolisi (danneggiamento del nucleo)
- Disintegrazione progressiva della membrana e della cellula
- Gli organuli passano nel fluido extracellulare