

# I fattori tossicocinetici nella suscettibilità dei bambini

Emanuela Testai

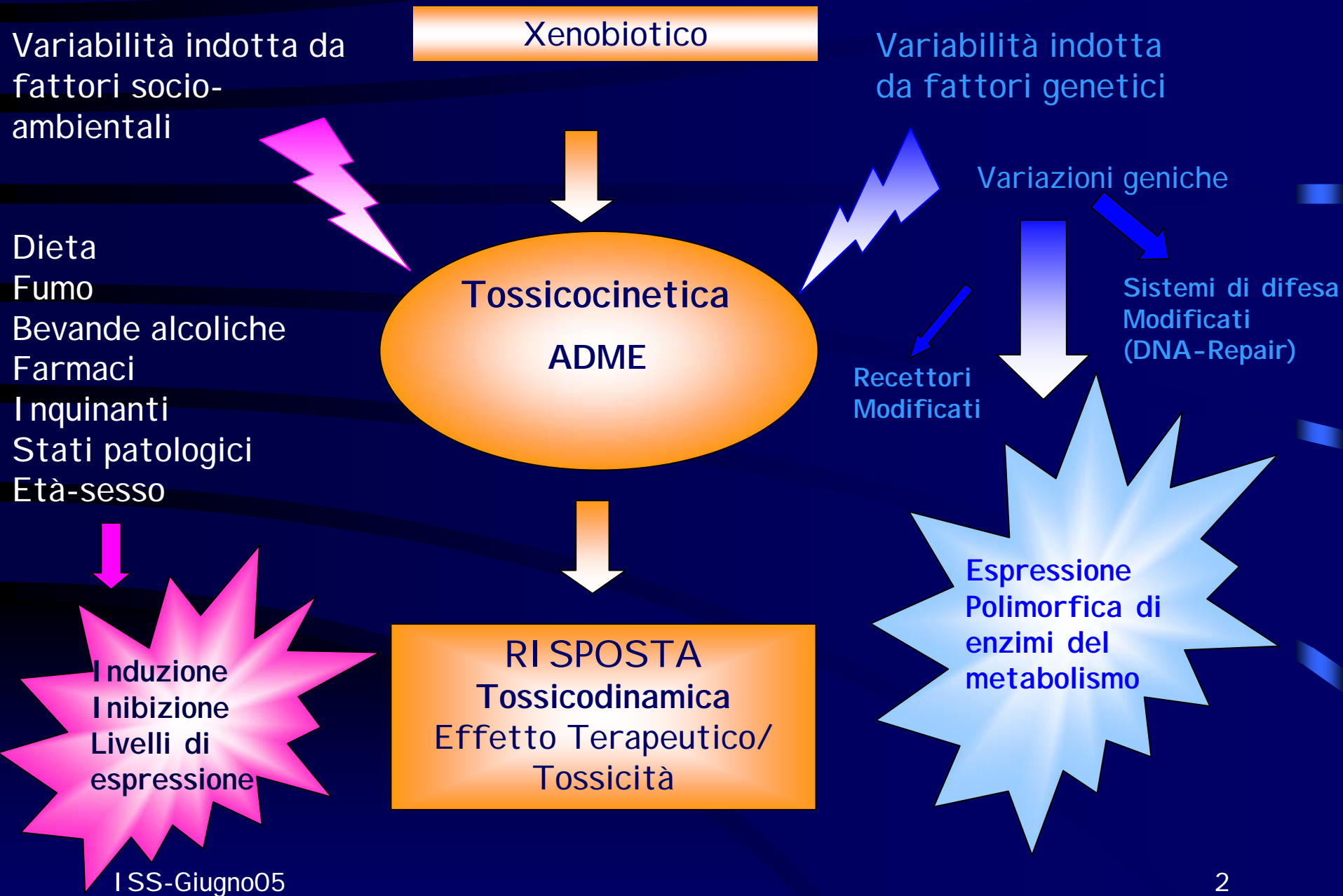
*Dipartimento Ambiente e Connessa*

*Prevenzione Primaria*

*Istituto Superiore di Sanità*

*testai@iss.it*





Nel processo di **valutazione del rischio** il livello di dose accettabile (espresso come **ADI o TDI**) si ottiene applicando al **NOAEL** dello studio tossicologicamente più rilevante (effetto critico) una serie di **fattori di incertezza**, allo scopo di coprire con un approccio conservativo le aree incognite all'interno del processo stesso.

- 10 si applica per le variazioni interspecifiche (estrapolazione dei dati ottenuti su animali all'uomo)
- 10 per l'eventuale inadeguatezza dei dati disponibili (es: assenza di uno studio cronico-NOEL derivato da uno studio subcronico)
- 10 per la variabilità intraspecifica (differenza di risposta tra gli individui all'interno della popolazione).

# Di che cosa tiene conto il fattore 10 per la variabilità intraspecifica ?

3.16 è il peso della variabilità dei parametri tossicocinetici

3.16 è il peso della variabilità dei parametri tossicodinamici

3.2 è il fattore che dovrebbe tener conto delle differenze genetiche e di quelle dovute all'età, allo stato patofisiologico, allo stile di vita.

E' sufficiente?

Tutti gli individui sono coperti e protetti adeguatamente?

# Il Metabolismo degli xenobiotici

Gli xenobiotici vengono trasformati dal sistema enzimatico per il loro metabolismo (CYP, GST, UDPGT,...) in:

- Metaboliti con attività  $< 0$  nulla rispetto al parentale: **detossificazione** (Es: alchilfenoli, Metossicloro)
- Metaboliti con attività biologica  $>$  del composto parentale: **bioattivazione** (codeina-effetto analgesico della morfina; PCB, Ditiocarbammati)

La funzione delle reazioni di biotrasformazione è quella di aumentare la idrosolubilità degli xenobiotici, evitandone l'accumulo negli organismi favorendone l'escrezione in

ambiente acquoso

Reazioni di fase I : inseriscono o smascherano gruppi funzionali (-OH, -NH<sub>2</sub>)

Reazioni di fase II : coniugano al parentale o al prodotto di reazione della fase I molecole endogene altamente solubili

I livelli di espressione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici mostrano variazioni interindividuali dovute a:

- Caratteristiche genetiche : **polimorfismo**
- Fattori socio-ambientali (ambiente, dieta, farmaci, stili di vita, esposizione professionale): esposizione a xenobiotici ⇒ **induzione/inibizione enzimatica**
- Fattori fisiologici: **età**, sesso, stati patologici, gravidanza

# Il polimorfismo

- è un carattere ereditabile stabile
- ha una frequenza nella popolazione  $> 1\%$
- non interessa prodotti genici coinvolti in funzioni vitali, nel comportamento sessuale e nello sviluppo
- i geni codificanti per gli enzimi del metabolismo e del riparo del DNA sono in gran parte polimorfici



Forte vantaggio evolutivo  biodiversità nella risposta

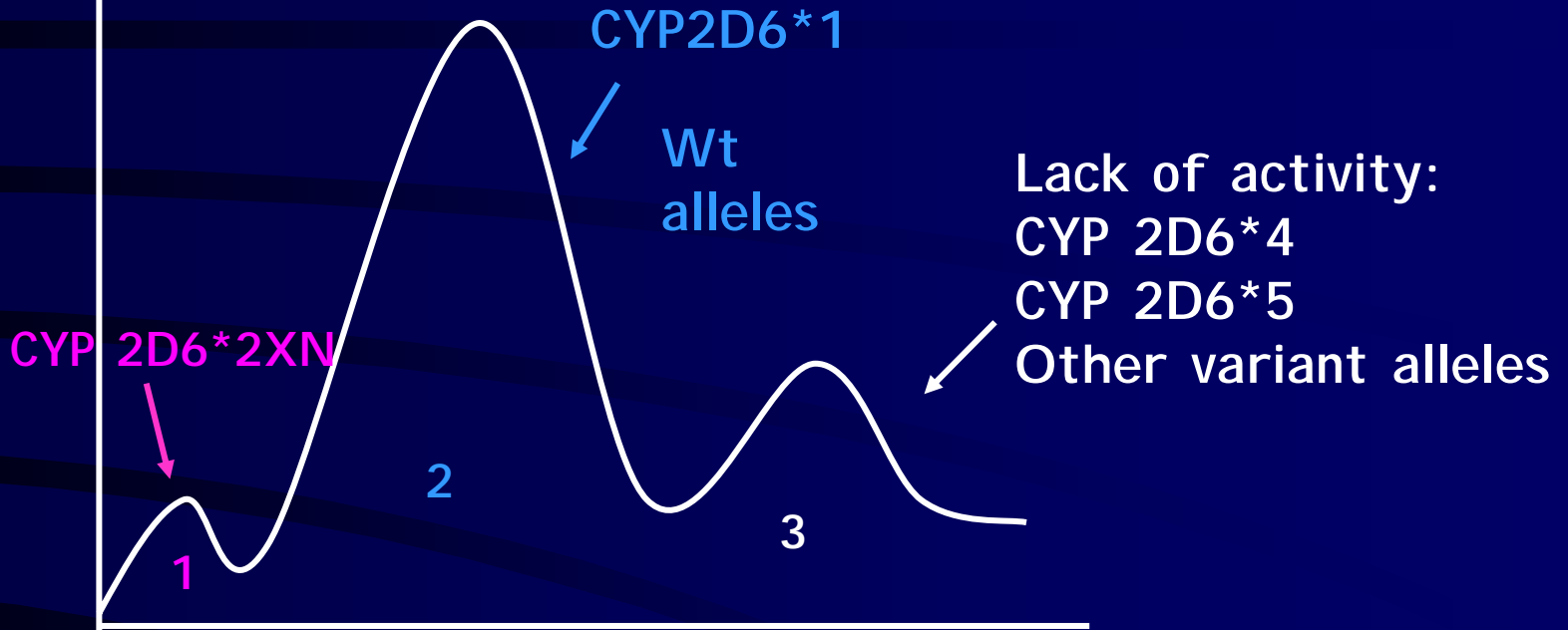


Polimorfismo genetico



Alleli diversi per un enzima (frequenza >1%)

N° of subjects



Metabolic ratio Drug/Metabolite

1 UM Ultrarapid Metabolizers

2 EM Extensive Metabolizers

3 PM Poor Metabolizers

# Conseguenze del polimorfismo metabolico

Inadeguatezza delle  
terapie  
farmacologiche

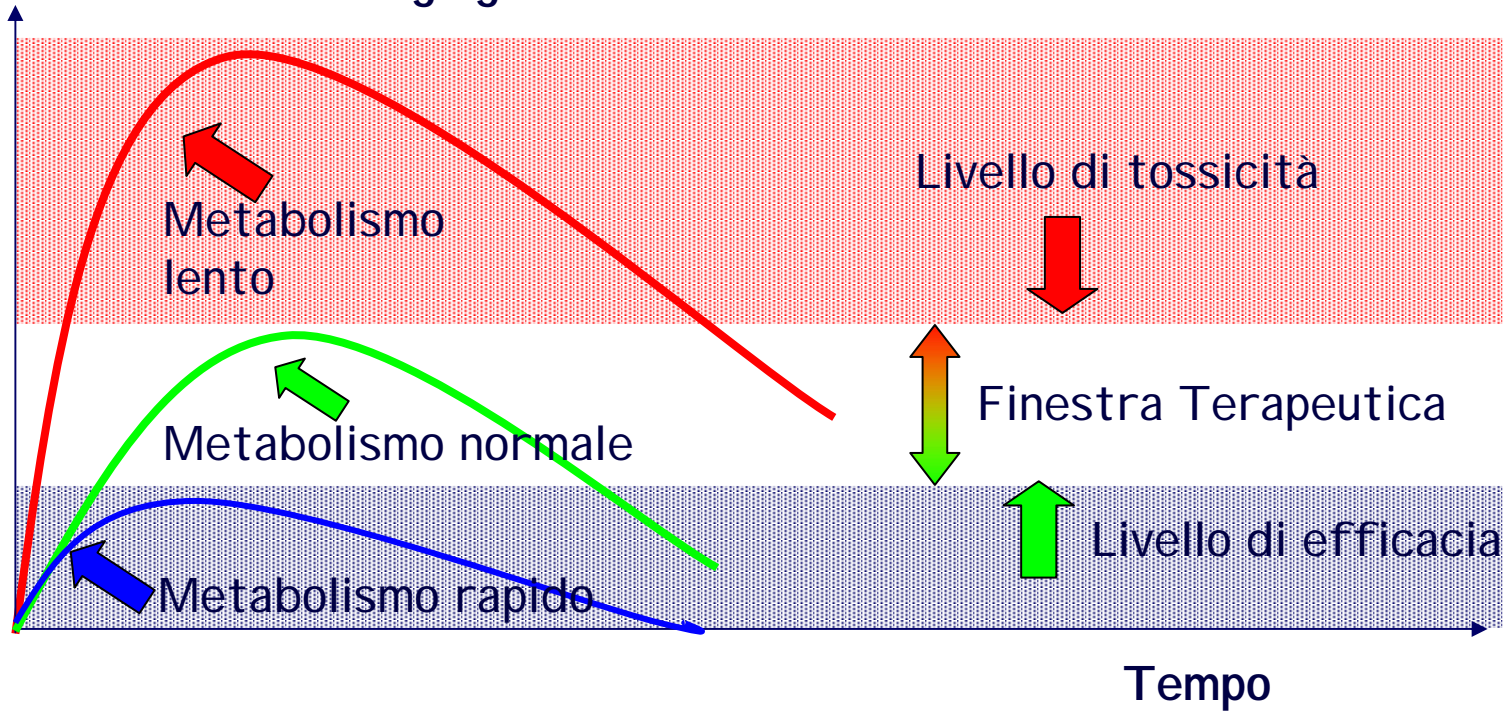


Assenza di  
terapia



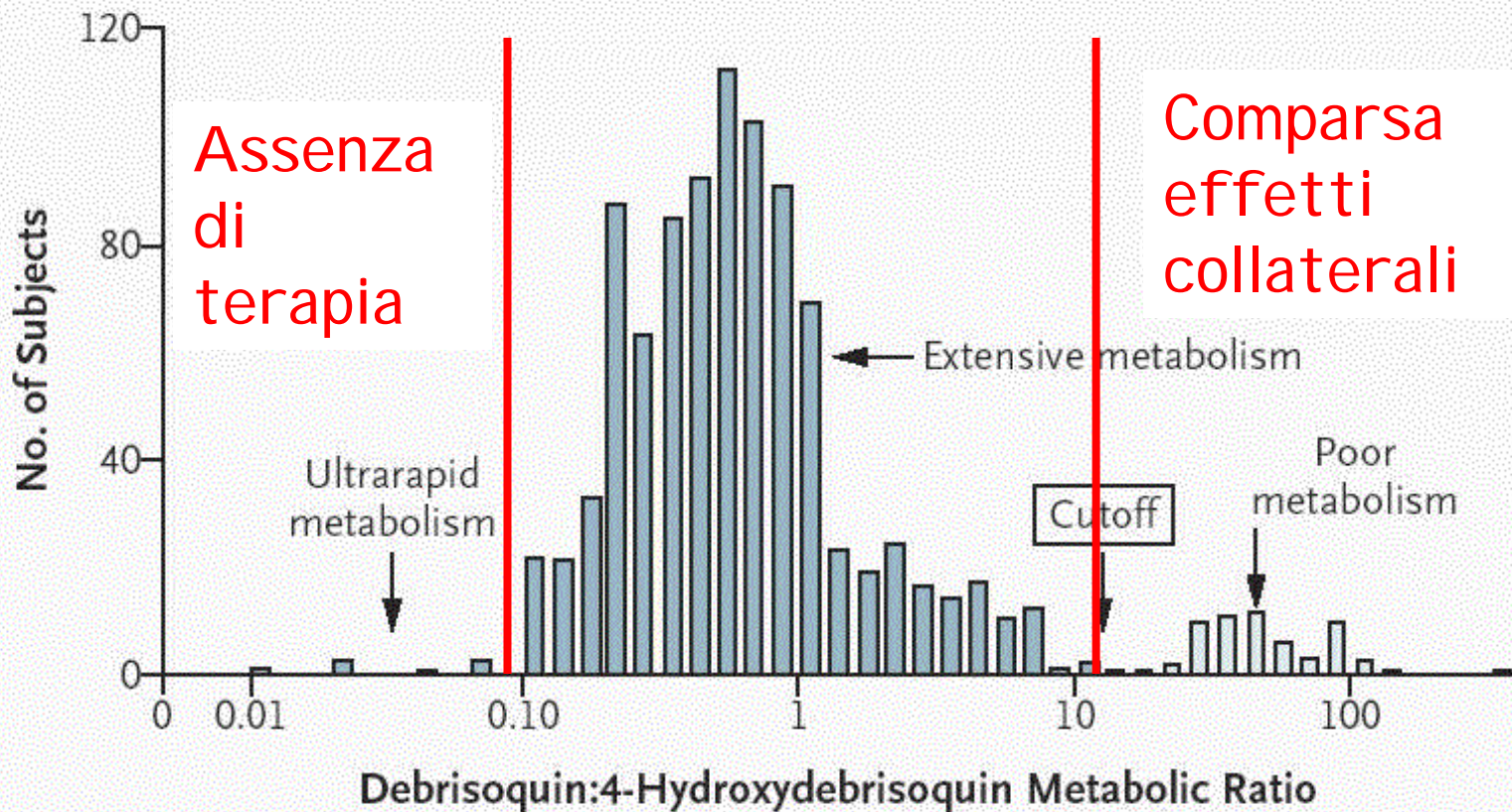
Comparsa di  
effetti collaterali

Concentrazione sanguigna



Esempi : antidepressivi; codeina (CYP2D6)

I nibitori re-uptake serotonina;  $\beta$ -bloccanti (CYP2C19)



**Figure 3. Pharmacogenetics of CYP2D6.**

Urinary metabolic ratios of debrisoquin to its metabolite, 4-hydroxydebrisoquin, are shown for 1011 Swedish subjects. The Cutoff box indicates the cut-off point between subjects with poor metabolism as a result of decreased or absent CYP2D6 activity and subjects with extensive metabolism. Modified from Bertilsson et al.<sup>17</sup> with the permission of the publisher.

# Conseguenze del polimorfismo metabolico

Inadeguatezza delle terapie  
farmacologiche



Assenza di terapia



Comparsa di effetti  
collaterali

Maggiore (o minore)  
susceptibilità individuale  
a effetti tossici e stati  
patologici ad etiologia  
ambientale



Identificazione di gruppi a  
rischio nella popolazione  
esposta e predisposizione  
di adeguati piani di  
prevenzione

# Polimorfismo metabolico e suscettibilità

- conoscenza del pattern metabolico
- conoscenza degli enzimi responsabili dei passaggi rilevanti alla formazione del metabolita tossico

## *Biomarcatori di suscettibilità*

Nella correlazione tra polimorfismo e suscettibilità deve esistere un'ipotesi meccanicistica che la giustifichi (plausibilità biologica)

# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ AI PESTICIDI

**1993:** Documento del National Research Council USA su *'Pesticides in the diets of infants and children'* evidenzia la carenza di conoscenza della eventuale *age-related susceptibility*

**1996:** *Food Quality Protection Act* prevede la possibilità di utilizzare fattori di protezione aggiuntivi per i bambini (un altro fattore 10 da aggiungere al fattore 10 per le differenze intraspecifiche che potrebbe non essere utilizzato in presenza di dati sperimentali che dimostrino assenza di maggiore suscettibilità dei bambini).

E' troppo? O troppo poco?

# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ

Lo scopo del FQPA è stato soprattutto quello di **stimolare la ricerca**, in modo che l'eventuale uso dei fattori di incertezza fosse basato su conoscenze scientifiche e non solo su semplice approccio conservativo

Un numero crescente di lavori evidenzia **l'esposizione dei bambini** (soprattutto a pesticidi OPT) nell'ambiente domestico e scolastico (attraverso indumenti, giocattoli, tappezzeria, cibi accidentalmente contaminati)

Un numero molto minore di lavori cerca di capire i **meccanismi** per i quali si determina una diversa suscettibilità e migliorare la valutazione quantitativa del rischio per i bambini, senza ricorrere ad ulteriori fattori di sicurezza/incertezza.



# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ

Tra il 1996 e il 2001 la US-EPA ha applicato fattori di incertezza addizionali (1-10) per la protezione dei bambini a 104 dei 273 pesticidi valutati (38%). Tra questi sono compresi 26 su un totale di 49 OPT (63%).

Utilizzando dati di PK relativi a farmaci è stato visto che le differenze maggiori con l'adulto si evidenziano nei neonati (prematuro e non) fino a 6 mesi di vita.

L'analisi delle banche dati ha evidenziato che non esistono regole generali e che la valutazione deve essere basata sostanza per sostanza. I dati dimostrano che generalmente il fattore di incertezza di 10 per i bambini >6 mesi è adeguato, purché la sostanza non sia metabolizzata da un enzima polimorfico.

# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ

## Differenze nella esposizione:

- ❖ dieta meno variata (presenza di residui negli alimenti)
- ❖ assunzione di cibo maggiore degli adulti in relazione al peso (tra 1 e 5 anni circa 3-4 volte di più)
- ❖ assunzione di acqua maggiore degli adulti in relazione al peso (7 volte di più nei primi 6 mesi di vita)
- ❖ abitudini e attitudini nello stile di vita (stazionamento a terra, frequente introduzione delle mani e altri oggetti in bocca, specifici scenari espositivi)
- ❖ maggiore ventilazione respiratoria (30-50% più degli adulti)

# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ

Differenze nei parametri fisiologici:

tessuti in attiva proliferazione

immaturità dei sistemi metabolici

immaturità di alcuni meccanismi di difesa



Alterazione dei  
parametri biocinetici:  
differenza nella dose  
interna

Alterazione dei  
parametri biodinamici:  
differenza nella  
risposta

# Differenze nell'assorbimento:

- ❖ pH gastrico più elevato nel neonato ( $\uparrow$  basi deboli-teofillina)
- ❖ presenza continua di latte nello stomaco limita assorbimento di composti lipofili
- ❖  $<$  superficie di assorbimento nell'intestino tenue e  $<$  funzionalità biliare
- ❖  $>$  permeabilità alle macromolecole della mucosa intestinale
- ❖ sistemi di trasporto adeguati alle necessità di crescita ( $\uparrow$  Ca, K e Fe nei bambini). Immaturità di P-gp e trasportatori
- ❖ Strato corneo più sottile e  $>$  rapporto superficie/peso (assorbimento  $>40-50\%$  sulla base del peso corporeo)
- ❖ Velocità di ventilazione maggiore ( $>40-50\%$  sulla base del peso per rispondere a  $>$  richiesta di ossigeno)

# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ

## Differenze nella distribuzione:

- ❖ contenuto idrico più elevato (circa 80% del peso nei neonati, 63% a due anni, 55% a 12 anni)
- ❖ presenza di tessuto adiposo (18% del peso nei neonati, 30% a 1 anno, 17% a 15 anni, 30-35% negli adulti) . Contenuto di grassi nell'adipe (35% lipidi nel neonato, 71% nell'adulto)



Volume di distribuzione diverso per sostanze lipofile e idrofile.

# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ

## Differenze nella distribuzione:

- ❖ Minore contenuto di proteine nel sangue e minore capacità di legame delle forme fetali (es: albumina) fino a 1 anno
- ❖ Minore capacità di eliminare la bilirubina (↓ coniugazione), che occupa la > parte dei siti di legame alle proteine plasmatiche



Maggiore presenza di frazione libera circolante

Immaturità della barriera emato-encefalica



Maggiore distribuzione al sistema nervoso centrale

## Differenze nel metabolismo:

- ❖ contenuto totale di P450 (fino a 1 anno) 30-50% dell'adulto
- ❖ presenza di forme fetali specifiche (es: CYP3A7/CYP3A4)
- ❖ pattern di sviluppo diversi delle diverse isoforme (CYP1A2 a 5-6 mesi è simile all'adulto; CYP2C è il 30% dell'adulto dopo la 1<sup>a</sup> settimana fino a 1 anno; CYP2E1 aumenta a 24 ore postnatale, completa lo sviluppo entro i 10 anni di età)
- ❖ < attività glucuroniltrasferasica
- ❖ attività alcooldeidrogenasi comparabile all'adulto a 12-30 mesi



L'età in cui il metabolismo del bambino è simile all'adulto dipende dalla sostanza

# I BAMBINI E LA SUSCETTIBILITÀ

## Differenze nella escrezione:

- ❖ immaturità del sistema renale
- ❖ diverso output cardiaco (6% contro il 15-25%- sviluppo completo entro 30 settimane postnatali)
- ❖ < velocità di filtrazione glomerulare (sviluppo completo entro 6 mesi postnatali)
- ❖ immaturità dei tubuli contorti prossimali (diverso riassorbimento sviluppo completo entro 30 sett. postnatali)



# IL CASO DEL CLORPYRIFOS

E' stato dimostrato che in seguito ad uso domestico il CPF si accumula sulle superfici assorbenti come cuscini, tappezzeria e giocattoli (specialmente peluche) dove persiste fino a 2 settimane dopo l'applicazione.

L'esposizione cumulativa (dieta, outdoor e indoor) di bambini tra 0-6 anni è stata stimata negli USA tra 0.24 e 1.2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ .

Il bersaglio è il SNC: sia la massa che la perfusione del cervello sono nei bambini > dell'adulto (il cervello del neonato è 1/3 di quello adulto, mentre il peso corporeo è solo il 4% in media). La barriera ematoencefalica è immatura, il tessuto è in continuo sviluppo fino alla pubertà



**I ipotesi di maggiore suscettibilità del bambino**

# IL CASO DEL CLORPYRIFOS

**MTD orale** : 15, 20, 50 mg/kg ratto PND10, 17, 27

100 mg/kg ratto adulto

**MTD sc** : 45 mg/kg ratto PND 7

279 mg/kg ratto adulto

**ED<sub>50</sub>** (AChE cerebrale) : 19.9 mg/kg PND7

44 mg/kg adulto

**Esposizione ripetuta orale:**

**ED<sub>50</sub>** : 1-2 mg/kg per AChE in PND7

**ED<sub>50</sub>** : 0.5-6.6 mg/kg per AChE nei tessuti (adulto)

1.9-2.4 mg/kg per AChE cerebrale

Considerando i livelli reali di esposizione, quanto sono rilevanti i dati ottenuti alla MTD (> 1000 volte più alti?)

Alcuni studi a concentrazioni più basse di CPF in ratti giovani sembrano non confermare i dati ottenuti alla MTD.

Il dato di letalità in test acuti non può essere considerato un marcatore adeguato per individuare una tossicità età-dipendente in un organo bersaglio, ma solo una 'spia' grossolana. A dosi non sufficientemente elevate da indurre letalità, il pesticida può produrre effetti tossici con meccanismi diversi.

E' stato ipotizzato che esposizioni prolungate a dosi sub-tossiche possano avere effetti sulla differenziazione neuronale, con meccanismi indipendenti dalla colinesterasi



Qual è il meccanismo?

# La biotrasformazione del CPF

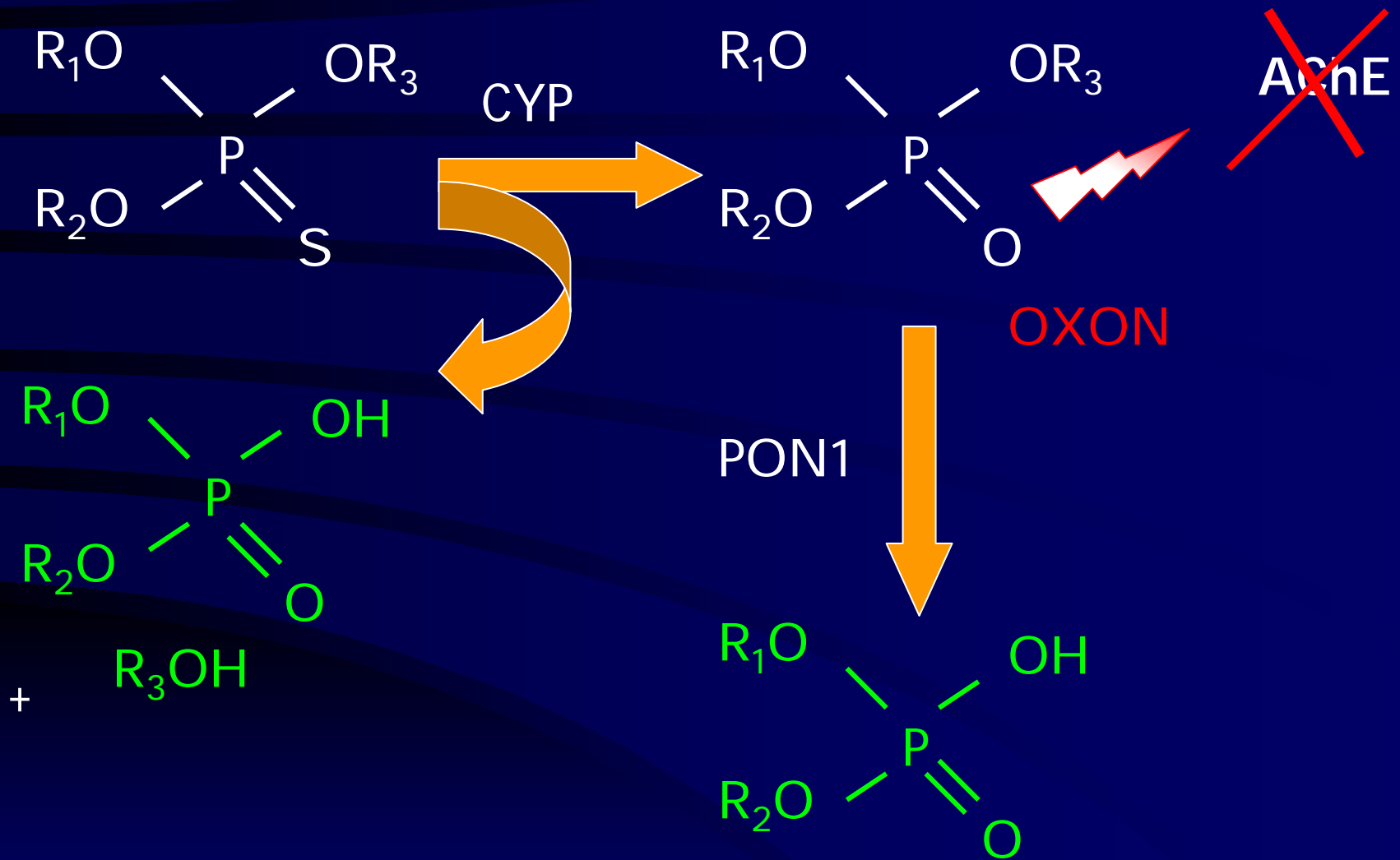
L'attività neurotossica del CPF dipende dalla sua bioattivazione, catalizzata da CYP diversi, ad oxon CPFO.

Esistono vie di detossificazione : azione dei CYP su CPF, della oxonasi (PON1 enzima polimorfico) sul CPFO; coniugazione con GSH (GST, enzima polimorfico)

La concentrazione di CPFO al bersaglio (AChE nel cervello) dipende dal bilancio tra le vie di attivazione e quelle di detossificazione

Le differenze metaboliche possono spiegare la diversa suscettibilità età-dipendente?

# La biotrasformazione dei pesticidi OPT



# La biotrasformazione dei pesticidi OPT

Quale/i enzimi sono rilevanti per la formazione del metabolita tossico?

Quale è il bilancio tra la bioattivazione e la detossificazione?

Gli enzimi coinvolti sono polimorfici?

La loro espressione è influenzata da particolari stati pato-fisiologici?

Ci sono differenze TK tra le specie?

Ci sono differenze TD (in altre parole il bersaglio è ugualmente sensibile)?

# Quali sono i parametri critici?

1. L'enzima bersaglio (AChE cerebrale) ha sensibilità diverse nel neonato e nell'adulto?



NO: i valori di  $IC_{50}$  non cambiano con l'età nel ratto

2. L'enzima bersaglio (AChE cerebrale) è presente in quantità diverse nel neonato e nell'adulto?



SI': AChE aumenta con l'età nella corteccia ma non nella medulla = più bersaglio nell'adulto

(TAP, 147, 411-418, 2000)

# Quali sono i parametri critici? (II)

3. Altre esterasi sono presenti in quantità diverse nel neonato e nell'adulto?



Sì: le esterasi aspecifiche epatiche aumentano nell'adulto= maggior protezione (bersagli alternativi)

4. Bioattivazione e detossificazione sono presenti in quantità diverse nel neonato e nell'adulto?



Entrambe le reazioni aumentano passando da neonato ad adulto

(TAP, 147, 411-418, 2000)



# Quali sono i parametri critici? (III)

5. Quali reazioni CYP-dipendenti sono state seguite?



CYP1A e 2B: sono quelle corrette?

A basse dosi il CPF è metabolizzato da CYP1A2:

attività bassa alla nascita- cresce tra 2 e 6 mesi (semivita della caffeina uguale all'adulto) e raggiunge poi livelli simili all'adulto.

A questo punto la clearance di un tossico è > a causa della > massa e flusso sanguigno (rispetto al peso) dei bambini nei confronti dell'adulto.

La biotrasformazione è diversa a concentrazioni alte: enzimi diversi entrano in gioco con formazione di % diverse di metabolita tossico e/o innocuo



Importanza delle dosi

# ALTRE POSSIBILI IPOTESI

Altri processi tossicocinetici che possono intervenire:

- ❖ assorbimento intestinale: intervento della P-gP (proteina polimorfica che espelle nel lume i suoi substrati (composti parentali e/o metaboliti) influenzando i livelli di assorbimento)
- ❖ metabolismo intestinale (prima dell'arrivo al fegato)
- ❖ comportamento della P-gP a livello di barriera emato-encefalica

Ci sono differenze tra roditori e specie umana nello sviluppo dei sistemi metabolici interessati? Quanto è rilevante il modello animale?

Qual è il meccanismo che spiega la diversa sensibilità ?

Come fare per identificarlo?

...a voi il compito di pensare ad una strategia  
sperimentale possibile.....

**Grazie!**

per la vostra attenzione e...buona esercitazione!