



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN AREA DEL FARMACO E TRATTAMENTI INNOVATIVI

CICLO XXXIII

COORDINATORE Prof.ssa Carla Ghelardini

***Epatotossicità indotta da xenobiotici: studio su nuovi marcatori diagnostici con particolare focus sui microRNA.***

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

**Dottorando**

Dott. Cirronis Marco

**Tutore**

Prof. Mannaioni Guido

**Coordinatore**

Prof.ssa Carla Ghelardini

Anni 2017/2021



*Dedicata alla mia amica fraterna, Dott.ssa Silvia Nastasio, per il continuo stimolo accademico che mi ha permesso di arrivare a questo traguardo.*

*Un ringraziamento particolare alla Prof.ssa Cristina Luceri e alla Prof.ssa Elisabetta Bigagli per l'aiuto e il lavoro di analisi relativo ai miRNA nell'intossicazione da amatossine.*



	<b>Pagina</b>
<b>1. I microRNA</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Identificazione e classificazione</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Biogenesi ed attività dei miRNA</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Regolazione post-trascrizionale mediata dai miRNA</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Geni target dei miRNA</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Regolazione dell'espressione genica dei miRNA</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Correlazione tra l'espressione dei miRNA ed i geni di seconda classe</b>	<b>19</b>
<b>1.8 miRNA: ruolo fisiologico e patologico</b>	<b>20</b>
<b>1.8.1 Ruolo fisiologico dei miRNA</b>	<b>21</b>
<b>1.8.2 Ruolo patologico dei miRNA</b>	<b>21</b>
<b>1.8.3 miRNA nelle patologie umane</b>	<b>22</b>
<b>1.8.4 miRNA nelle patologie epatiche</b>	<b>23</b>
<b>1.8.5 Implicazioni cliniche</b>	<b>27</b>
<b>1.8.6 miRNA come biomarcatori</b>	<b>28</b>
<b>1.8.7 miRNA e tossicologia</b>	<b>29</b>
<b>2. Il fegato e l'epatotossicità da xenobiotici</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Ruolo del fegato</b>	<b>32</b>
<b>2.3 Localizzazione delle lesioni epatiche</b>	<b>34</b>
<b>2.4 Manifestazioni delle lesioni epatiche</b>	<b>35</b>
<b>3. Il paracetamolo</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Cenni storici</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1 Acetanilide</b>	<b>40</b>
<b>3.2.2 Fenacetina e paracetamolo</b>	<b>41</b>
<b>3.2.3 Diffusione del paracetamolo</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Farmacocinetica</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Tossicocinetica</b>	<b>45</b>
<b>3.5 Farmacodinamica</b>	<b>46</b>
<b>3.6 Impiego clinico</b>	<b>47</b>

3.6.1	Epidemiologia	48
3.6.2	Gravidanza	48
3.6.3	Effetti avversi	50
4.	Epatotossicità indotta da paracetamolo	51
4.2	Epidemiologia	52
4.3	Tipologie di sovradosaggio	54
4.3.1	Sovradosaggio non intenzionale: errore o eccesso terapeutico	55
4.3.2	Tentativi suicidari: perché il paracetamolo?	56
4.4	Eziopatogenesi	57
4.5	Peculiarità nei bambini	59
4.6	Categorie di soggetti a rischio aumentato	59
4.7	Manifestazioni cliniche	61
4.8	Aspetti bioumorali	61
4.9	Aspetti istopatologici	64
4.10	Diagnosi	65
4.11	Gestione clinica	68
4.12	Modalità inusuale di avvelenamento da paracetamolo	73
4.13	Categorie particolari di pazienti	73
4.14	Terapia	74
4.14.1	Algoritmo diagnostico e terapeutico	84
4.15	Problematiche della stratificazione del rischio	88
4.16	Caratteristiche e proprietà dei nuovi biomarcatori	89
5.	Intossicazione da macromiceti	97
5.2	Epidemiologia	97
5.3	Intossicazioni a breve e lunga incubazione	98
5.4	Amatossine e fallotossine	99
5.5	Contenuto di tossine nei funghi	99
5.6	Struttura chimica delle tossine	103
5.7	Tossicocinetica dell' amanitina	105

5.7.2 Tossicocinetica in condizioni sperimentali	105
5.7.3 Tossicocinetica negli avvelenamenti	107
5.8 Meccanismo d'azione	110
5.9 Epidemiologia delle intossicazioni	115
5.10 Manifestazioni cliniche	116
5.11 Diagnosi	117
5.12 Dosaggio dell'amanitina	118
5.13 Terapia	119
5.13.1 Terapia di base	119
5.13.2 Trattamento antidotico	120

## ***PARTE SPERIMENTALE***

### PRIMA PARTE

6. Il miRNA-122 come marcatore dell'epatotossicità nel sovradosaggio da paracetamolo – Studio clinico prospettico	123
6.2 Scopo dello studio	123
6.3 Materiali e metodi	123
6.4 Procedure dello studio	126
6.5 Analisi di laboratorio	126
6.6 Analisi statistica	127
6.7 Risultati	128

### SECONDA PARTE

7. Sviluppo di una metodica di laboratorio per il dosaggio sierologico delle amatossine	138
7.2 Dosaggio ematico delle amatossine nell'intossicazione da funghi	138

<b>7.3 Reagenti e materiali</b>	<b>139</b>
<b>7.4 Strumentazione</b>	<b>139</b>
<b>7.5 Condizioni UPLC</b>	<b>139</b>
<b>7.6 Condizioni di Spettrometria di Massa (MS)</b>	<b>140</b>
<b>7.7 Preparazione del campione</b>	<b>141</b>
<b>7.8 Recupero (RE) ed effetto matrice (ME)</b>	<b>142</b>
<b>7.9 Studio di validazione</b>	<b>142</b>
<b>7.10 Risultati</b>	<b>142</b>
<b>7.10.2 Selettività</b>	<b>142</b>
<b>7.11 Studio di validazione</b>	<b>144</b>
<b>7.11.2 Linearità</b>	<b>144</b>
<b>7.11.3 Precisione e veridicità</b>	<b>144</b>
<b>7.11.4 Recupero ed effetto matrice</b>	<b>145</b>
<b>7.11.5 Incertezza di misurazione</b>	<b>145</b>
<b>7.12 Applicazione su campioni di pazienti con intossicazione da     amatossine</b>	<b>146</b>
<b>7.13 Risultati</b>	<b>149</b>
<b>8. Ruolo dei miRNAs nell'avvelenamento da funghi contenenti     amatossine - studio clinico prospettico</b>	<b>151</b>
<b>8.2 Scopo dello studio</b>	<b>151</b>
<b>8.3 Materiali e metodi</b>	<b>151</b>
<b>8.4 Procedure dello studio</b>	<b>152</b>
<b>8.5 Risultati</b>	<b>156</b>
<b>9. Discussione</b>	<b>164</b>
<b>10. Conclusioni</b>	<b>170</b>

## 1. I microRNAs

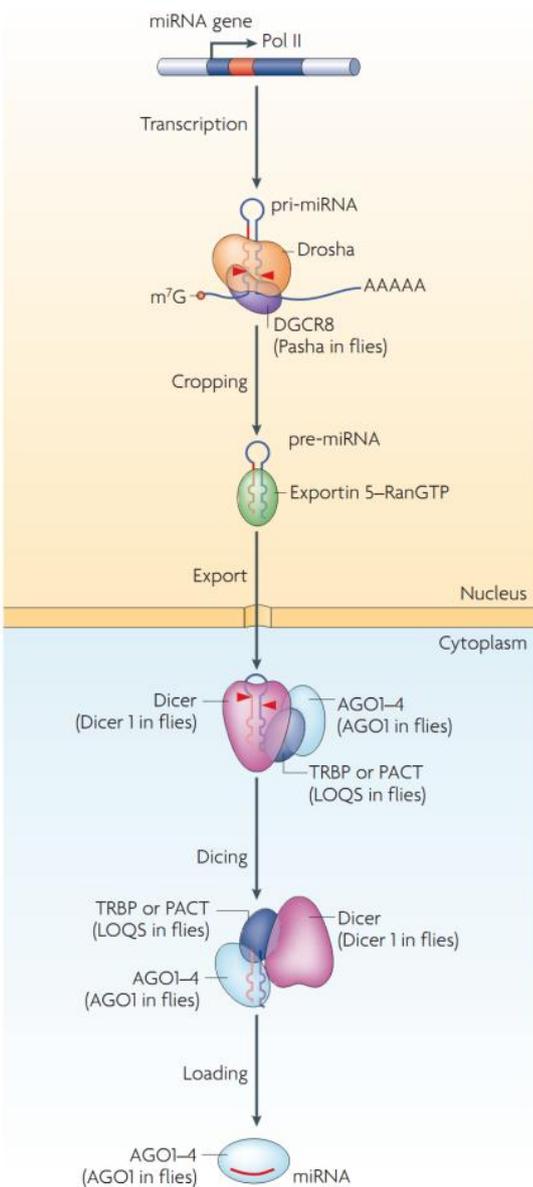
### 1.2 Identificazione e classificazione

Nel 1981, durante uno studio di perdita di funzione (*loss-of function*) in *C. Elegans*, fu scoperto che le mutazioni del gene *lin-4* comportavano una sintesi continua della cuticola della larva quindi, insieme ai geni *lin-14*, *lin-29* e *lin-28*, *lin-4* fu classificato come gene capace di controllare temporalmente gli eventi dello sviluppo post-embriale dell'animale. Venne determinato che le delezioni nella regione 3'-UTR dell'mRNA di *lin-14* portavano ad un anormale accumulo della proteina negli stati larvali tardivi, suggerendo l'esistenza di un elemento regolatore nella regione 3'-UTR di *lin-14* (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008). Dato che *lin-4* provocava una bassa espressione della proteina di *lin-14*, gli autori ipotizzarono che il prodotto del gene *lin-4* poteva agire come fattore trans-agente legandosi alla regione 3'-UTR di *lin-14* provocandone l'inibizione. Più tardi, due studi indipendenti confermarono che *lin-4* non codificava per una proteina bensì per due piccoli trascritti di circa 22-61 nucleotidi contenenti sequenze complementari alla regione 3'-UTR del trascritto di *lin-14*. In questo modo *lin-4* controllava temporalmente la traduzione di *lin-14* attraverso un'interazione post-trascrizionale RNA: RNA antisenso. Diversi anni dopo fu identificato, sempre in *C. Elegans*, anche il gene *let-7* che agisce con lo stesso meccanismo di *lin-4*, andando a regolare target diversi. Infine tre gruppi di ricerca differenti isolarono molti piccoli-RNA con le stesse caratteristiche di *lin-4* e *let-7*, in sistemi cellulari ed in organismi diversi compreso l'uomo, portando così alla luce l'esistenza di una grande classe di piccoli-RNA con un potenziale ruolo regolatorio, che a causa delle loro piccole dimensioni furono chiamati microRNAs (miRNAs) (Zeng et al., 2008). I miRNAs fanno parte di una categoria più ampia di piccoli-RNA chiamata *noncoding RNA* (ncRNA), composta anche da siRNA, tncRNA, e snRNA, tutte molecole di RNA che non codificano per delle proteine poiché vengono trascritte da regioni intergeniche sul cromosoma. I geni MIRNA, secondo l'organizzazione genomica, possono essere intergenici o intragenici. I geni MIRNA intergenici hanno unità trascrizionali indipendenti, in cui promotore, sequenza di trascrizione e regioni di terminazione non si sovrappongono con altri geni. I MIRNA intragenici sono localizzati entro sequenze di trascrizione, all'interno di regioni introniche o esoniche, e sono definiti geni ospiti. Di fatto, almeno il 50% dei miRNAs, nei mammiferi, sono intragenici: il 40% è localizzato negli introni dei geni codificanti per le proteine mentre il 10% sta negli introni dei trascritti primari di RNA. Il resto dei miRNAs è invece rappresentato da unità indipendenti di trascritti con specifici core di elementi promotori e segnali di poliadenilazione (Zeng et al., 2008). In particolare, negli ultimi anni, i miRNAs hanno conosciuto un grande sviluppo in quanto sono stati riconosciuti come importanti elementi di regolazione genica attraverso la degradazione dell'mRNA, l'inibizione della sintesi proteica o alcuni meccanismi basati sul silenziamento della cromatina in diversi organismi multicellulari e sono implicati in una varietà di malattie tra cui il cancro (Zeng et al., 2008).

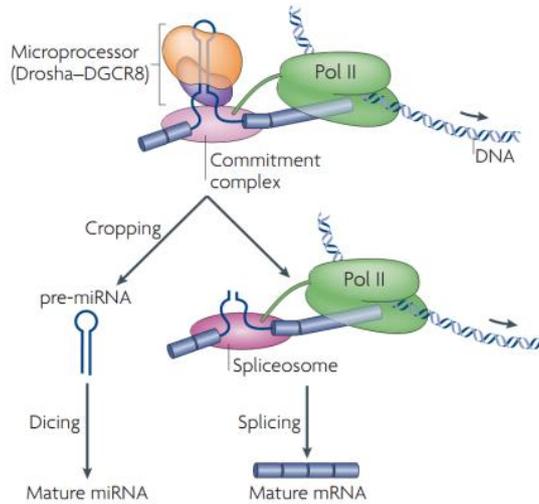
### 1.3 Biogenesi ed attività dei microRNAs

I miRNAs sono piccoli RNA a singolo filamento di circa 21-23 nucleotidi di lunghezza, mentre normalmente un mRNA varia dai 2000 ai 5000 nucleotidi. La trascrizione dei geni per i miRNA è mediata prevalentemente dalla RNA Polimerasi II (Pol II) (Zeng et al., 2008), sebbene esistano casi di trascrizione da parte della RNA polimerasi III (Pol III) (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008); il risultato, ovvero il trascritto primario, viene chiamato pri-miRNA e possiede un CAP al 5' ed una coda poliadenilata al 3'. La sua lunghezza non è ben definita ma si pensa sia di centinaia di nucleotidi. I pri-miRNAs vengono processati nel nucleo da Drosha, una RNasi di tipo III nucleare ad attività endonucleasica, che in cooperazione con una *ds-RNA binding protein* (DGCR8), effettuano tagli sulla *stem-loop* generando un prodotto che è definito pre-miRNA (*cropping*) (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008). Il pre-miRNA è lungo circa 60-90 nucleotidi e con una struttura a forcina a doppio filamento (*hairpin*) e di tipo stem-loop, in cui i due bracci del gambo (*stem*) possono contenere la sequenza per miRNA maturi differenti e non essere totalmente complementari (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008). **Figura 1**

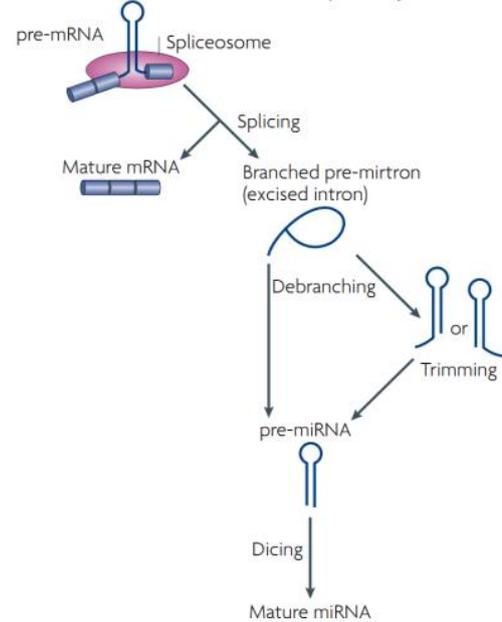
**a Biogenesis of canonical miRNA**



**b Canonical intronic miRNA**



**c Non-canonical intronic small RNA (mirtron)**



**Figura 1. Biogenesi della pathway dei miRNA.** **a)** I geni miRNA nella biogenesi canonica sono trascritti dall'RNA Polimerase II (Pol II) per generare i trascritti primari (pri-miRNAs). Lo step iniziale (cropping) è mediato dal complesso Drosha-DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8; Pasha in *D. melanogaster* and *C. elegans*) anche conosciuto come complesso del Microprocessore, che genera un pre-miRNA di ~65 nucleotidi (nt). Il pre-miRNA ha un piccolo stelo più un'estroflessione di ~2-nt al 3', che è riconosciuto dal nuclear export factor exportin 5 (EXP5). Nel trasporto dal nucleo, l'RNasi citoplasmatica III Dicer catalizza il secondo step di processamento per produrre il miRNA duplex. Dicer, TRBP (TAR RNA-binding protein; also known as TARBP2) e le proteine Argonate (AGO) 1-4 mediano il processamento del pre-miRNA e l'assemblaggio del RISC nell'uomo. Uno strand del duplex rimane nelle proteine Ago come miRNA maturo, mentre l'altro strand è degradato. Si ritiene che Ago sia associato a Dicer nello step Dicing sia in quello dell'assemblaggio del RISC. **b)** I miRNA intronici nella biogenesi canonica sono processati co-trascrizionalmente prima dello splicing. Gli introni contenenti i miRNA subiscono lo splicing più lentamente degli introni adiacenti per ragioni non conosciute. Si pensa che il complesso dello Splicing legghi gli introni mentre Drosha clivi la forcina del miRNA. Il pre-miRNA entra nella pathway dell'miRNA, mentre il resto del trascritto subisce lo splicing del pre-mRNA e produce l'mRNA maturo per la sintesi di una proteina. **c)** I miRNA intronici non canonici sono prodotti dallo splicing intronico e dal debranching. Poiché alcuni piccoli RNA (chiamati mirtrons) possono derivare da piccoli introni, che assomigliano ai pre-miRNA, possono anche

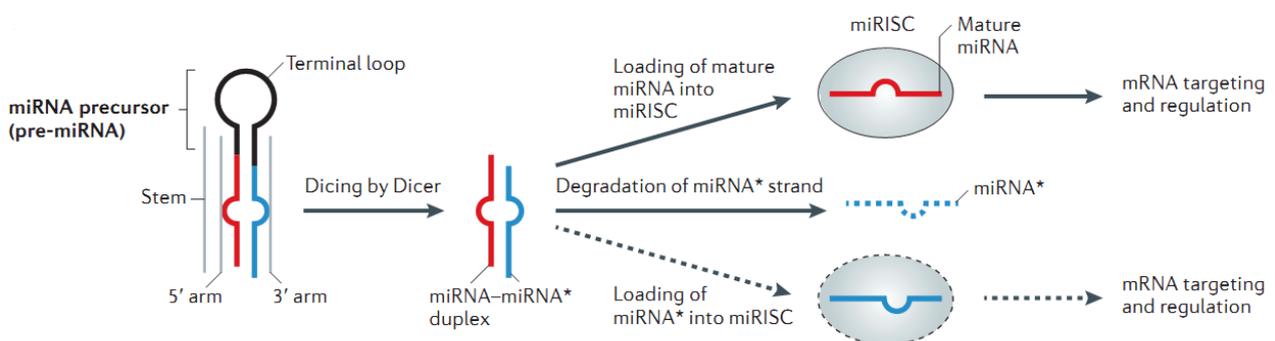
non subire il processamento da parte di Droscha. Alcuni introni hanno estremità sia al 5' che al 3', cosicché necessitano di essere tagliate prima che il pre-miRNA venga esportato. m7G, 7-methylguanosina (Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu, 2004; O'Carroll & Schaefer, 2013; Sen & Blau, 2005).

I pre-miRNAs sono caratterizzati da una sporgenza di due nucleotidi al 3' e vengono trasportati nel citoplasma con l'ausilio di un'esportina, l'esportina 5 (Exp5) e del cofattore Ran-GTP.

Nel citoplasma sono ulteriormente clivati alla base dello stem-loop da Dicer insieme al ds-RNA binding partner (TRBP) e vengono quindi rilasciati corti frammenti di RNA a doppio filamento di dimensioni variabili tra 21 e 25 nucleotidi (miRNA duplex). Ogni duplex contiene il filamento di miRNA maturo (5'-3') e un frammento miRNA\* (3'-5') complementare al primo.

I miRNA duplex interagiscono con le proteine Ago1-Ago4, formando il complesso miRISC (microRNA Induced Silencing Complex) che guiderà il miRNA maturo nel riconoscimento del messaggero target. (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008). Il miRNA\* complementare viene degradato nel citoplasma.

Al momento in cui il duplex è stato formato in seguito all'azione di Dicer, i due filamenti presentano una stabilità differente da un punto di vista termodinamico a livello dell'estremità 5'; sebbene il miRNA maturo possa essere identificato in uno o nell'altro filamento, esso si origina quasi sempre dal filamento che presenta l'estremità 5' più instabile, mentre l'altro filamento verrà degradato (Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu, 2004; Sen & Blau, 2005). Tuttavia, nei rari casi in cui le due estremità 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei due filamenti può con la stessa probabilità andare a costituire il miRNA maturo dotato di attività biologica (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008; Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu, 2004; Sen & Blau, 2005). **Figura 2**



**Figura 2.** Selezione del filamento che costituirà il miRNA maturo (Berezikov, 2011).

Il riconoscimento tra un miRNA e il suo mRNA target avviene tra l'estremità 5' del miRNA (detta "seed region") e la regione 3' del target, per circa 2-8 nucleotidi; se l'interazione tra il miRNA e il target è quasi perfetta allora la regolazione è portata a termine con un processo detto *RNA interference*, nel quale il complesso RISC taglia direttamente il target; se la complementarità tra miRNA e target non è perfetta, come nel caso di gran parte dei mammiferi, allora la regolazione avviene con una repressione della traduzione, ossia un blocco nella traduzione del messaggero da parte del ribosoma (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008).

La posizione dei geni dei miRNA all'interno del genoma è particolarmente interessante, di fatto gran parte di essi si trovano nelle sequenze intergeniche, ad almeno 1 Kb dai geni conosciuti, indicando che sono trascritti indipendentemente da questi. Molti miRNA formano anche dei *clusters* suggerendo che potrebbero essere trascritti come un singolo filamento policistronico, una teoria sostenuta dal coordinamento dell'espressione dei geni nel *cluster*. E' per via della non perfetta complementarità che un singolo miRNA può probabilmente regolare diversi mRNA e questo rende particolarmente difficile la ricerca di target specifici con la conseguenza che le funzioni di molti miRNA sono ancora sconosciute (Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu, 2004; Sen & Blau, 2005).

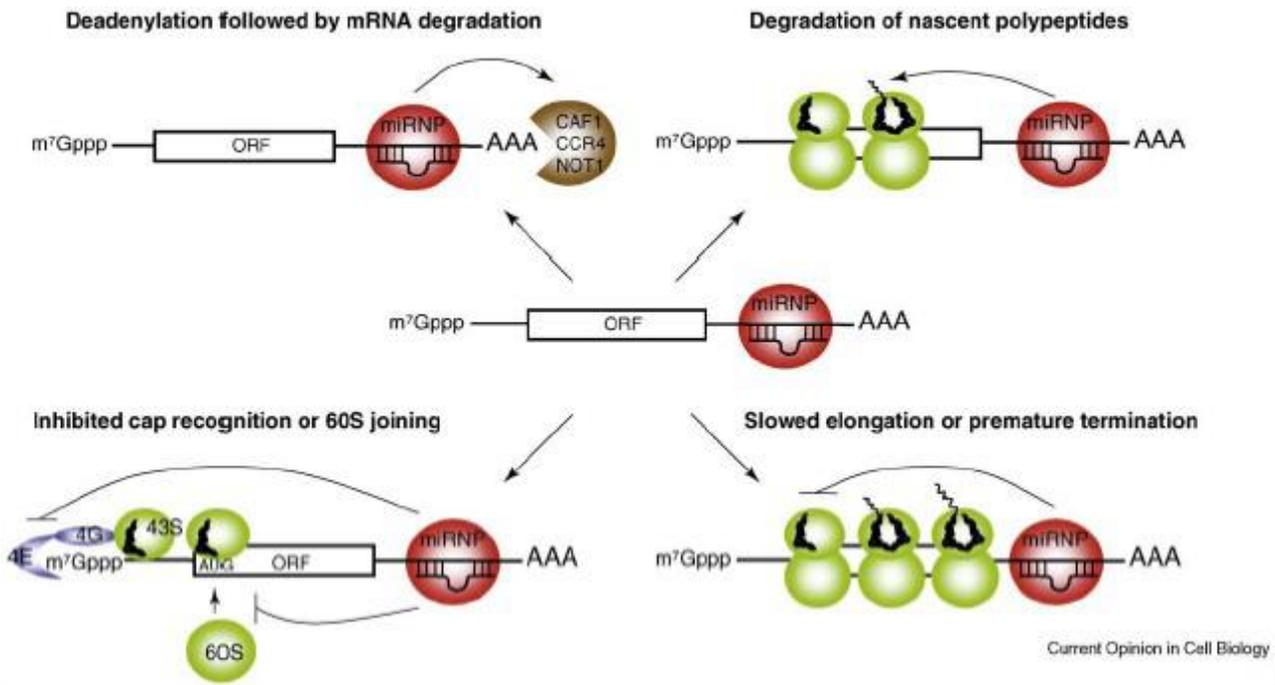
#### **1.4 Regolazione post-trascrizionale mediata dai miRNA**

Al fine di portare a termine la sua funzione di regolatore negativo post-trascrizionale, il miRNA maturo sarà legato dalla proteina Argonauta (Ago-2) e quindi convogliato verso il complesso RISC, al quale si legherà. Il complesso RISC rappresenta il vero e proprio effettore della repressione miRNA-mediata. Esso è costituito da alcune fondamentali proteine della famiglia Argonauta (Ago1-Ago4) e da altre che regolano la funzione inibitoria degli effettori del complesso stesso. In particolare, il miRNA maturo riconoscerà e legherà il suo specifico mRNA *target*, la cui espressione sarà repressa. Negli animali, e quindi nell'uomo, questo tipo di riconoscimento è mediato dalla regione 3'UTR del trascritto *target* che può contenere siti multipli di legame al miRNA, in cui sono presenti *Introduzioni* delle regioni di 2-8 nucleotidi, definite *seed*, essenziali per l'appaiamento (Liu, 2004; Sen & Blau, 2005; Zeng et al., 2008), che tuttavia non è sempre perfetto ma caratterizzato da *mismatches* e da *bulges*. In alcuni rari casi, le regioni *target* dei segmenti *seed* sono state localizzate nelle molecole di mRNA anche a livello della regione 5'UTR o in regioni codificanti. Il complesso RISC potrà così inibire l'espressione dell'mRNA selezionato attraverso due differenti modalità principali:

- Ago-mediata dell'mRNA, nel caso di perfetta complementarità tra il *target* ed il messaggero maturo. In tal caso la degradazione è dovuta all'instabilità del messaggero, determinata dalla sua deadenilazione e dal suo *decapping*. Questi effetti sono mediati, oltre che dalle proteine Argonauta, dalla proteina GW182 e dal macchinario cellulare del *decapping* e della deadenilazione.

La degradazione avverrebbe nei cosiddetti *p-bodies* (*processing Bodies*), in cui si accumulerebbero ingenti quantità di mRNA non tradotti, proteine Argonata, miRNA maturi e repressori trascrizionali (Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu, 2004; O'Carroll & Schaefer, 2013; Sen & Blau, 2005).

- Inibizione della traduzione dell'mRNA, in presenza di *mismatch* in posizione centrale tra il *target* ed il maturo (Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu, 2004; O'Carroll & Schaefer, 2013; Sen & Blau, 2005). Tale meccanismo potrebbe essere messo in atto nelle fasi di inizio e di allungamento della traduzione, oltre che durante la terminazione, o addirittura si compierebbe con la degradazione del polipeptide appena formato. Un modello recente ipotizza che il complesso RISC possa agire prevenendo l'associazione tra le subunità ribosomiali 40S e 60S (Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu, 2004; O'Carroll & Schaefer, 2013; Sen & Blau, 2005). **Figura 3**



F

**Figura 3.** Rappresentazione grafica, di alcuni dei possibili meccanismi d'azione del complesso RISC indotto dai miRNA. Il messaggero target può essere deadenilato e degradato, oppure può essere inibita la sua traduzione, in diversi modi qui rappresentati (Chekulaeva & Filipowicz, Current Opinion in Cell Biology 2009).

### 1.5 Geni target dei miRNA

Da un punto di vista funzionale è molto complesso studiare la funzione dei miRNA. A ogni modo, considerando che i miRNA regolano negativamente l'espressione dei loro geni *target*, risulta chiaro che le funzioni dei miRNA dipendano essenzialmente da quelle dei loro *targets*; infatti, sia questi ultimi che i miRNA partecipano alla regolazione dei medesimi processi biologici, ma con effetti chiaramente opposti. Pertanto la ricerca dei *targets* dei miRNA è di fondamentale importanza per i più recenti studi funzionali. Gli approcci utilizzati a tale scopo sono quello bioinformatico e quello sperimentale, sicuramente più diretto. Pertanto sono stati implementati diversi algoritmi, capaci di effettuare l'allineamento tra la sequenza di un dato microRNA e quella del genoma in questione. Così, sulla base di una complementarità più o meno perfetta (visto il meccanismo d'azione dei miRNA), è possibile predire i possibili siti di legame all'interno dei 3'UTR di specifici *targets* (Wang et al., 2009). Tuttavia le garanzie offerte da questo approccio non sono assolute, dal momento che esso si basa su predizioni. Peraltro, esistono numerosi algoritmi in grado di fare queste predizioni, ed ognuno di questi utilizza dei parametri di ricerca leggermente differenti. Al contrario, l'approccio sperimentale si basa su diverse tipologie di esperimenti, che variano in base alle metodologie adottate. Così negli ultimi anni il numero di *targets* identificati computazionalmente e poi validati sperimentalmente è aumentato sempre di più, fino a circa 600 *targets*. In particolare, negli ultimi anni, è stato osservato che molti *targets* di miRNA umani sono costituiti da mRNA di geni codificanti per alcuni fattori della trascrizione, confermando l'importanza dei miRNA nell'ambito regolatorio (Krol et al., 2010).

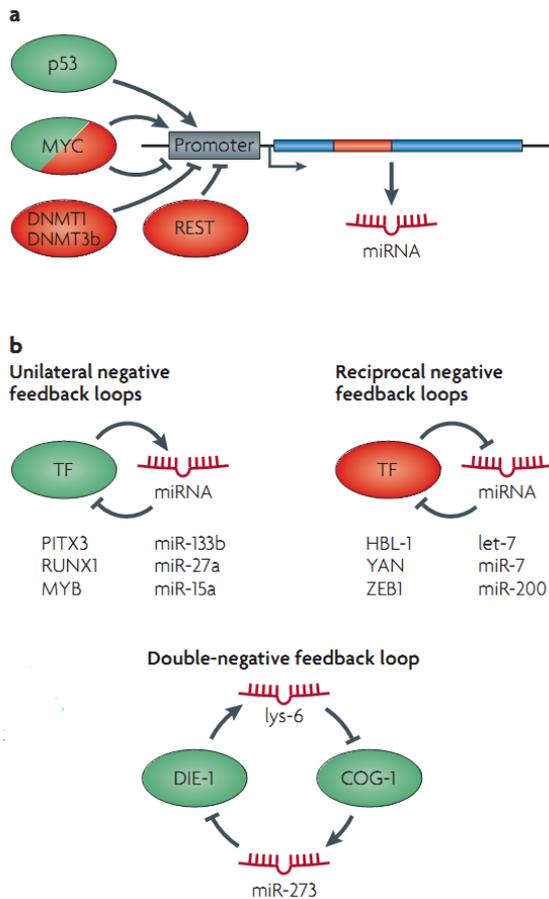
### 1.6 Regolazione dell'espressione genica dei miRNA

La regolazione dell'espressione dei miRNA è fondamentale per il ruolo svolto da queste molecole ed è quindi fortemente regolata in più punti durante la loro biogenesi.

1. Regolazione della trascrizione
2. Regolazione del processamento
3. Editing
4. microRNA decay

La regolazione della trascrizione avviene in modo simile a quello di molti geni di seconda classe: infatti, a livello dei promotori di diversi geni miRNA sono presenti gli stessi elementi regolativi (TATA box *sequences*, CpG *Islands*, *inization elements*) dei promotori per i geni codificanti proteine (**Figura 4**). Ad esempio, i fattori di trascrizione (TF) rappresentano un'importante classe di proteine cellulari coinvolte nel controllo dell'espressione genica, essenziale nella maggior parte dei processi biologici. In particolare, tali proteine hanno la capacità di legare specifiche regioni di DNA nel genoma (i siti di legame per i fattori della trascrizione, TFBS), e quindi controllare la trascrizione del DNA. In genere i TF possono agire da soli oppure far parte di grandi complessi regolatori, promuovendo o bloccando il reclutamento della RNA polimerasi II, essenziale per la trascrizione di specifici geni. Nel caso di attivazione della trascrizione si parla di attivatori,

mentre in quello di inattivazione si parla di repressori trascrizionali (**Figura 4a**: gli attivatori trascrizionali e i repressori sono mostrati in verde e rosso, rispettivamente) (Krol et al., 2010).



**Figura 4. a)** Attivatori e repressori della trascrizione dei miRNA; **b)** Regolatori delle networks dell'espressione dei miRNA (Da Krol et al., NATURE REVIEWS Genetics 2010).

Molti fattori di trascrizione (TF) regolano l'espressione tessuto-specifica o stadio di sviluppo-specifica (ad esempio, MYC/MYC*N* che stimolano l'espressione del *cluster* oncogenico miR-17-92 in cellule di linfoma (O'Donnell et al., 2005), o REST che inibisce l'espressione del miR-124 in cellule non neuronali o progenitori neuronali tramite deacetilazione istonica e metilazione del promotore (Conaco et al., 2006). Inoltre, i miRNA frequentemente agiscono in *networks* regolatorie insieme con i TF, i quali possono guidare o reprimere l'espressione dei miRNA. I miRNA stessi possono a loro volta regolare l'espressione dei TF, creando così dei circuiti di regolazione positiva o negativa nei quali il preciso controllo della quantità del miRNA o del TF determina l'effetto fisiologico finale. La regolazione del processamento dei miRNA avviene a livello di Drosha, di Dicer e delle loro proteine accessorie. Ad esempio è stato visto che alcune elicasi nel topo e le proteine SMAD (trasduttori dei segnali della via del TGF- $\beta$  e BMP) agiscono a livello di Drosha, controllando così la produzione del pri-miR (Krol et al., 2010). Invece, al livello del pre-miR è stato visto che i livelli di Dicer vengono controllati e stabilizzati dal suo cofattore TRBP. Infatti, è stato osservato che dopo

stimolazione da parte dei fattori di crescita, ERK fosforila TRBP e quindi stabilizza indirettamente Dicer, portando a un generale aumento di tutti i pre-miR (TANG et al., 2008). L'*editing* del pri-miR o del pre-miR da parte delle proteine ADAR (*adenosine deaminase*) (che catalizzano la conversione dell'adenosina in inosina) altera la sua struttura secondaria e quindi la stabilità, mentre l'*editing* nel *seed* del miRNA maturo da parte di altre proteine altererebbe il riconoscimento del *target*. (Krol et al., 2010) Infine, la regolazione della stabilità e degradazione del miRNA maturo permette di controllarne la quantità finale nella cellula e quindi l'effetto biologico. E' stato osservato che i miRNA sono in generale più stabili dei messaggeri di seconda classe e hanno un'emivita che va da alcune ore a molti giorni. In generale, il preciso controllo del *decay* potrebbe avere un ruolo fondamentale nei meccanismi di sviluppo e di risposta di tipo *switch on-off* (Krol et al., 2010; Adriaan D.B. Vliegthart et al., 2014).

### 1.7 Correlazione tra l'espressione dei miRNA ed i geni di seconda classe

Negli ultimi anni è stato sviluppato un nuovo approccio nello studio delle relazioni intercorrenti tra i miRNA ed i loro *targets*, i geni di seconda classe. In particolare, tale approccio si fonda sull'ipotesi che, se esiste una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di un particolare miRNA ed uno specifico gene, il gene in questione possa effettivamente essere controllato dal miRNA; ciò permetterebbe la predizione dei *targets*. È chiaro che in questo caso, la correlazione deve essere negativa, dato il ruolo repressivo sull'espressione genica svolto dai miRNA. Ulteriori analisi computazionali, atte a predire i possibili siti di legame per i miRNA nei 3'UTR di tali geni, hanno confermato in diversi casi questa ipotesi. (Krol et al., 2010) Un approccio simile è stato utilizzato anche per studiare la correlazione tra i miRNA intronici ed i loro geni ospiti: in questo caso è stata spesso osservata una correlazione positiva, indicando che presumibilmente in molti casi i miRNA intronici ed i loro geni ospiti siano controllati dal medesimo promotore (Baskerville, 2005). Inoltre, generalmente l'orientamento dell'mRNA e del suo pre-miRNA è uguale, indicando che quest'ultimo possa essere trascritto insieme al gene ospite sotto il controllo del medesimo promotore, per poi essere processato. Del resto se non fosse così, al momento della loro contemporanea, ma indipendente, trascrizione si potrebbe creare un ingombro sterico tra le due RNA polimerasi in azione (Baskerville, 2005), rendendo inoltre difficoltoso l'assemblaggio delle numerose altre proteine coinvolte nella trascrizione e quindi nella sua prosecuzione. Inoltre, è stato osservato che il livello di correlazione tra l'espressione tra diversi miRNA localizzati sullo stesso cromosoma e con lo stesso orientamento (quindi potenzialmente in *cluster*) è inversamente proporzionale rispetto alla loro distanza genomica (Ruike et al., 2008). Questo tipo di risultato è stato riscontrato anche in altri studi su specifici *clusters*, i cui miRNA maturi potrebbero derivare dallo stesso trascritto primario. In particolare, considerando geni per miRNA distanti tra i 100 nucleotidi e le 100 Mb, si è visto che generalmente miRNA correlati positivamente e con distanze minori di 50 Kb, potrebbero possedere lo stesso trascritto primario, e ciò dipenderebbe dal controllo co-regolativo e selettivo di elementi prossimali rispetto al *cluster*. (Baskerville, 2005). Questi dati consentono di considerare l'approccio correlativo un importante strumento nello studio delle relazioni intercorrenti tra i microRNA, i loro *target*, gli ospiti, e quindi per individuare i *clusters* (Zhang et al., 2007; ZHAO & SRIVASTAVA, 2007).

## **1.8 miRNA: ruolo fisiologico e patologico**

Negli Invertebrati i miRNA svolgono importanti funzioni nel controllo dello sviluppo embrionale, nella risposta a particolari condizioni di stress ambientale, nel differenziamento neuronale e nel controllo della crescita e della morte cellulare (Zhang et al., 2007; ZHAO & SRIVASTAVA, 2007). E' ragionevole pensare che essi siano coinvolti in importanti processi fisiologici anche nei Vertebrati. Diversi studi sono a favore dell'ipotesi che alcuni miRNA possano essere necessari per il corretto sviluppo di organi e tessuti, come lo sviluppo cerebrale, l'ematopoiesi e la miogenesi (Sassen et al., 2008).

### **1.8.1 Ruolo fisiologico dei miRNA**

Il virus Epstein Barr è in grado di codificare alcuni miRNA, come BART-6-3p (Zhang et al., 2007; Zhao and Srivastava, 2007).

Il ruolo fisiologico dei miRNA è stato messo in evidenza nei modelli di topo Knockout. Questi topi presentano una carenza di due enzimi fondamentali per la biogenesi dei miRNA: Dicer e DGCR8.

L'assenza della biogenesi dei miRNA porta a letalità embrionale. I miRNA sono spesso richiesti per il mantenimento dell'omeostasi (ad es. la deficienza di miR-208 negli animali porta a difetti nella risposta a stress e a un'ipertrofia cardiaca) e per la differenziazione dei tessuti. Mediante studi di iper-espressione, si è scoperto che i miRNA sono coinvolti in numerosi aspetti della funzione neuronale, tra cui il rimodellamento dello sviluppo, lo sviluppo della memoria dipendente dall'amigdala, lo sviluppo delle fibre dendritiche e la sopravvivenza delle cellule neuronali post-mitotiche. Inoltre, regolano la funzione di molte cellule ematopoietiche come i neutrofili, i linfociti, gli eritrociti e i megacariociti (Zhang et al., 2007; ZHAO & SRIVASTAVA, 2007).

I miRNA sono in grado di modulare la concentrazione di molte proteine regolatorie necessarie per il normale sviluppo e funzione del sistema immunitario. Possono ad esempio influenzare diverse vie metaboliche che controllano lo sviluppo e la funzione dell'immunità innata. miR-21 e miR-196 possono bloccare in vitro la granulopoiesi, mentre miR-155 può incrementare in vivo il numero dei granulociti immaturi. I miRNA, oltre a regolare lo sviluppo dei granulociti, possono regolarne la funzione. miR-223 regola negativamente sia la proliferazione che l'attivazione dei neutrofili. Il deficit di questo miRNA nei neutrofili aumenta la capacità di subire danno ossidativo. Molti fattori coinvolti nella monocitopoiesi sono regolati o regolano, a loro volta, specifici miRNA come ad esempio anche RUNX1, noto come AML1, il quale si lega alle regioni del promotore di miR-17-92 e miR-106a-92, inibendone l'espressione.

Per quanto riguarda l'immunità adattativa, il complesso proteico che controlla lo sviluppo delle cellule T nel timo e la loro attivazione in periferia, è controllato dai miRNA. La delezione specifica di Dicer nelle cellule T ha messo in evidenza la sua importanza nello sviluppo delle cellule T mature.

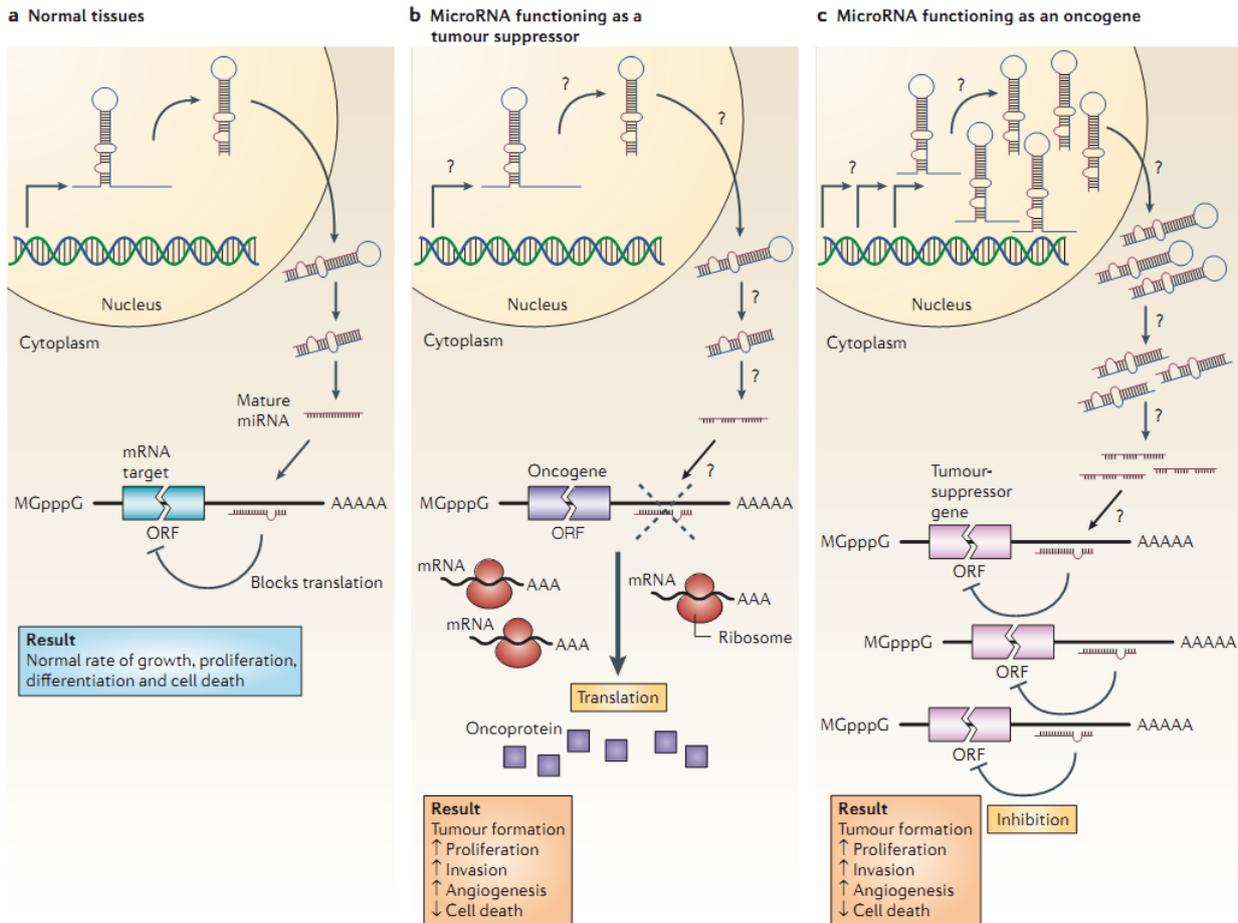
Il cluster miR17-92 aumenta la sopravvivenza delle cellule T durante lo sviluppo. Inoltre questo cluster potrebbe giocare un ruolo nella lipogenesi e nelle malattie cardiometaboliche ed essere un utile controllo positivo in pazienti obesi o con malattie cardiovascolari per gli studi basati sul plasma/esosoma. Invece per quanto riguarda le cellule B, la loro differenziazione è sotto il controllo di miR-150, un miRNA espresso nei linfociti maturi, che regola l'espressione di c-Myc, un fattore di trascrizione coinvolto in molteplici fasi dello sviluppo dei linfociti (Zhang et al., 2007; Zhao & Srivastava, 2007).

Essendo dunque questi piccoli *non-coding RNAs* fondamentali durante lo sviluppo dell'organismo e nel mantenimento dell'omeostasi, è lecito pensare che una loro mancata regolazione possa comportare diverse patologie, come quelle di tipo immune, neurodegenerativo o neoplastico (Chen et al., 2008).

### 1.8.2 Ruolo patologico dei miRNA

L'elevato numero di geni bersaglio suggerisce che i miRNA siano coinvolti nel controllo di diversi processi biologici quali la proliferazione, la differenziazione (Chen et al., 2008), la migrazione, l'apoptosi, il controllo del ciclo cellulare (Chen et al., 2008), la repressione della replicazione del virus HBV (Chen et al., 2008), la regolazione del colesterolo (Antoine et al., 2013) e del metabolismo degli acidi grassi (Chen et al., 2008), il controllo della risposta immune innata e adattativa (Antoine et al., 2013), e l'autofagia (Chen et al., 2008). I miRNA possono comportarsi da oncosoppressori o da oncogeni (oncomiR), questo dipende dal mRNA bersaglio con cui si legano (Starkey Lewis et al., 2011): possono ridurre l'espressione di geni oncosoppressori, comportandosi come oncogeni (onco-miRNA) o agire su trascritti mRNA oncogenici, comportandosi come oncosoppressori. Ad esempio l'inibizione dell'espressione di miR-21 incrementa l'espressione dell'oncosoppressore PTEN (Antoine et al., 2013), che attiva la via della fosfatidilinositolo-3 chinasi, PI3K. L'attivazione di questa via incrementa l'attività di AKT chinasi che fosforila mTOR (il bersaglio nei mammiferi della rapamicina). L'attivazione di mTOR è associata alla resistenza alla chemioterapia e alla radioterapia. PTEN è iporegolato nel fegato e la sua repressione è associata al comportamento biologico aggressivo e a una scarsa sopravvivenza dei pazienti (Chen et al., 2008). **Figura 5**

Poiché i microRNA controllano diversi processi fisiologici quali il metabolismo, l'apoptosi, la proliferazione cellulare, la divisione delle cellule staminali, la differenziazione muscolare e la morfogenesi del cervello, le aberrazioni nella loro espressione sono correlate ad una varietà di patologie che vanno dai tumori alle malattie autoimmuni (Starkey Lewis et al., 2011). Nel 2008 sono stati identificati diversi miRNA presenti nel circolo sanguigno, nelle piastrine, nei leucociti e negli eritrociti.



**Figura 5. I miRNA come oncogeni ed oncosoppressori. a)** In normali tessuti, la corretta trascrizione del miRNA, il processamento e il legame a sequenze complementari nel mRNA target determina la repressione dell'espressione genica del target attraverso un blocco nella traduzione della proteina. Il risultato complessivo è il normale ritmo di crescita cellulare, proliferazione, differenziamento e morte cellulare. **b)** La riduzione o la delezione di un miRNA che funziona come oncosoppressore porta alla formazione di tumore. Una riduzione o eliminazione dei livelli di miRNA maturo può verificarsi a causa di difetti in una delle fasi della biogenesi ed in ultimo porta ad una inappropriata espressione di miRNA-target oncoproteine. Il complessivo risultato potrebbe coinvolgere in una aumentata proliferazione, invasività o angiogenesi, diminuzione del livello di apoptosi o de-differenziamento tissutale portando in ultimo alla formazione di tumore. **c)** L'amplificazione o la sovra espressione di un miRNA che ha un ruolo oncogenico comporterebbe la formazione del tumore. In questa situazione, un aumento nel livello di un miRNA, che potrebbe essere prodotto in maniera inappropriata o in tessuto errato, inibirebbe l'espressione di un miRNA-target oncosoppressore e porterebbe alla progressione del tumore (da (Antoine et al., 2013).

### 1.8.3 miRNA nelle patologie umane

I miRNA sono coinvolti nella maggior parte di processi biologici e in diverse patologie, come ad esempio nel cancro, nella nefropatia diabetica (DN) e nell'Alzheimer (AD). Ad esempio nella nefropatia diabetica, una delle principali patologie che porta complicazioni microvascolari, causa di danno renale, sono coinvolti miRNA quali miR-29, miR-192 e miR-200a/b/c (Andersson et al., 2012).

I livelli di miR-29 sono ridotti nella DN e questo causa la perdita diretta dell'inibizione dell'espressione del collagene, mentre i livelli degli altri due miRNA, miR-192 e miR-200 b/c, sono aumentati. Il loro incremento porta a un aumento dell'inibizione dei repressori trascrizionali quali Zinc finger E-box binding homeobox 1 e 2 (ZEB1/2). Questi repressori servono a inibire la produzione di collagene nelle cellule mesangiali del rene, facilitando in questo modo la produzione della matrice. L'inibizione di miR-192 aumenta *in vivo* l'espressione di ZEB1/2, che riducono l'espressione dei marcatori di fibrosi (TGF- $\beta$ , collagene, fibronectina) e diminuiscono l'ispessimento della membrana basale glomerulare. I cambiamenti fibrotici che avvengono nel glomerulo nella DN sono dovuti ai miRNA miR-29, miR-192 e miR-200 a/b/c (Andersson et al., 2012).

I miRNA sono espressi anche nel sistema nervoso centrale, dove regolano la differenziazione neuronale e la plasticità delle sinapsi. Tra i miRNA coinvolti nell'Alzheimer ricordiamo:

miR-9 che è altamente espresso nell'ippocampo del feto, mentre è ridotto nell'Alzheimer. Il bersaglio di questo miRNA è il recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR1), NF $\kappa$ B e sirtuina1 (SIRT1), una deacetilasi. Inoltre miR-9 ha come bersaglio il fattore di trascrizione REST che è coinvolto nello spegnere l'espressione del gene neuronale nelle cellule non neuronali.

miR-107 risulta ridotto nella corteccia temporale nel primo stadio dell'AD. Questo miRNA può anche modulare la chinasi 5 dipendente da ciclina (CDK5) che nell'AD risulta sregolata, e la metalloproteinasi ADAM10.

miR-29 incrementa *in vitro* la produzione di amiloide. miR-29 è implicato nell'invecchiamento cerebrale, come nella modulazione dell'attività dei microglia. Tra i bersagli di miR-29 ci sono i modulatori dei microglia come il fattore di crescita dell'insulina (IGF-1) e il ligando frattalchina (CX3CL1).

miR-34 nell'AD regola l'espressione di p53, che è associata alla fosforilazione di tau. Alti livelli di questo miRNA sono presenti nell'ippocampo di pazienti con AD.

miR-181 è coinvolto in diversi processi patofisiologici e regola geni come l'oncogene RAS e il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (Starkey Lewis et al., 2011).

#### **1.8.4 miRNA nelle patologie epatiche**

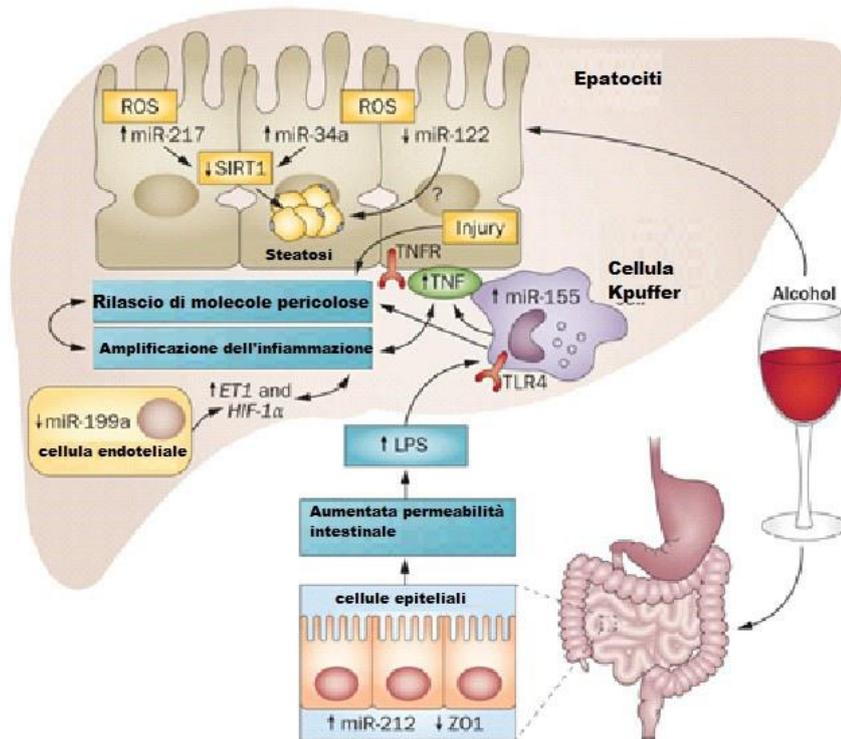
I miRNA regolano numerosi e fondamentali processi biologici in tutti i tipi di cellule, tra cui quelle del fegato, e influenzano complessi programmi di espressione genica in quasi tutti i processi cellulari (Antoine et al., 2013).

Il fegato è uno degli organi più importanti del nostro organismo e date le sue innumerevoli funzioni può essere considerato un vero e proprio laboratorio chimico.

Alterazioni dei miRNA intracellulari sono correlate con varie malattie del fegato, tra cui epatite virale, steatoepatite alcolica e non alcolica, danno epatico indotto da farmaci, malattie autoimmuni del fegato e

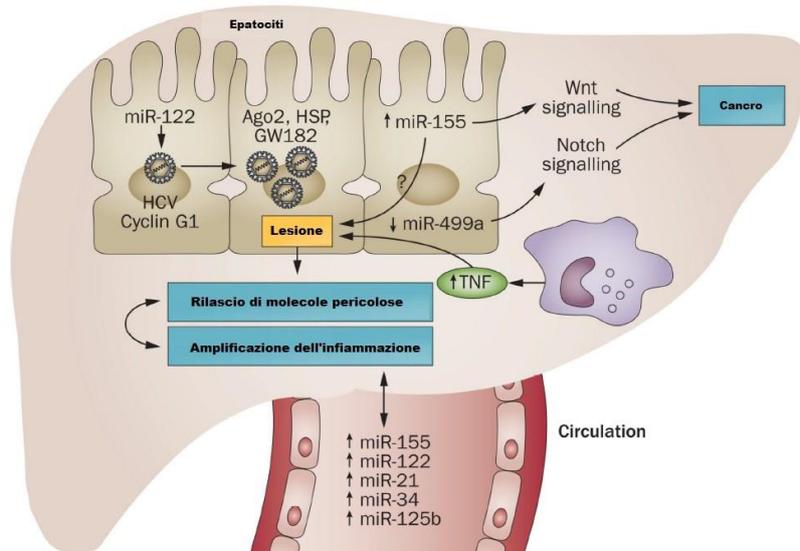
lesioni da ischemia-riperfusion. L'accumulo eccessivo di trigliceridi e acidi grassi epatici è una caratteristica di diverse malattie del fegato tra cui la malattia epatica alcolica (ALD), NAFLD e NASH (Andersson et al., 2012).

I miRNA hanno un ruolo cruciale nell'omeostasi alcolica. Nel fegato, miR-122 regola l'espressione di vari geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi e del colesterolo epatico, esercitando un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi del fegato. L'inibizione di miR-122 mediante un antisenso ha ridotto i livelli di colesterolo plasmatico sia nel topo che nello scimpanzè. Una riduzione nell'espressione epatica di miR-122 si ha in NASH nell'uomo e nei modelli animali. La delezione del gene che codifica questo miRNA porta, nei topi, allo sviluppo di steatoepatite, fibrosi e HCC. Malgrado il fatto che nel siero di topi deficienti di miR-122 si presentino livelli più bassi di colesterolo, LDL e trigliceridi rispetto ai topi *wild-type*, essi sviluppano steatoepatiti e HCC. Anche miR-33, miR-34, miR-103, miR-104 e miR-370 modulano i geni regolatori del colesterolo e dei lipidi. miR-370 influisce sul metabolismo lipidico agendo sull'enzima mitocondriale, sulla transferasi palmitolocarnitina, che è coinvolta nel trasporto di acidi grassi a catena lunga attraverso la membrana. miR-34a bersaglia la sirtuina 1 (Andersson et al., 2012), SIRT1, epatica (è una proteina che deacetila le proteine che contribuiscono alla regolazione delle funzioni metaboliche come lipogenesi, gluconeogenesi, sintesi proteica, omeostasi dell'acido biliare) (Starkey Lewis et al., 2011) ed è stata trovata un incremento nei livelli di questo miRNA con una diminuzione concomitante dei livelli di SIRT1 nei fegati grassi di ratti obesi indotti con la dieta. In ALD si ha un'induzione di miR-34a negli esseri umani. miR-34a regola i livelli di SIRT1 e caspasi-2 e contribuisce, in questa patologia, alla steatosi epatica. miR-27b è un centro regolatorio nel metabolismo lipidico, influenzando potenzialmente il cuore e il fegato. La disregolazione dei miRNA contribuisce alle anomalie metaboliche (Antoine et al., 2013). **Figura 6**



**Figura 6** Ruolo dei miRNA nelle patologie epatiche alcoliche [modificata da Gyongyi Szabo and Shashi Bala (Andersson et al., 2012)]

I miRNA hanno un ruolo regolatorio nell'infiammazione epatica bersagliando varie molecole. Diversi miRNA sono implicati nella risposta infiammatoria: miR-155, miR-132, miR-125b, miR-146a, miR-150, miR-181, let-7 e miR-21. miR-155 è coinvolto nella risposta immunitaria adattativa e innata. I livelli di miR-155 incrementano nelle cellule Kupffer dopo che sono state alimentate con alcol. TNF è un bersaglio di miR-155 e promuove l'infiammazione. miR-155 è associato al carcinoma epatocellulare, HCC, nel quale regola i livelli di C/EBP. In pazienti affetti da HCV cronica è stato trovato un aumento di espressione di miR-155 nei monociti periferici, mentre in pazienti che hanno risposto al trattamento non si è avuto alcun aumento. Nei pazienti con HCV c'è un'induzione del gene BIC (che codifica un precursore del miR-155 maturo) e di miR-155 maturo nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMCs) di pazienti affetti da HCV. I livelli epatici di miR-155 sono aumentati in pazienti con HCV e promuovono l'HCC attraverso la via di segnale Wnt (Andersson et al., 2012). **Figura 7**



**Figura 7.** miRNA nell'infezione cronica da HCV [modificata da Gyongyi Szabo and Shashi Bala (Starkey L et al., 2011)]

A differenza di miR-155, miR-146a è un regolatore negativo della via segnale TLR; esso spegne la risposta proinfiammatoria attraverso la via TRAF6 e IRAK-1. Coerentemente col suo ruolo di regolatore negativo nell'infiammazione, la deficienza di miR-146a nel topo acquisisce il fenotipo mieloproliferativo causando l'iperattivazione di NH-kB. miR-132 ha un ruolo centrale nell'infiammazione periferica.

I miRNA sono anche coinvolti nella regolazione della fibrosi epatica a molteplici livelli. Le citochine chiave e i fattori di crescita che determinano la fibrosi epatica regolano l'espressione di miRNA profibrogenici e antifibrogenici. TGF- $\beta$ , un modulatore della fibrosi, induce miR-21 nei pazienti con HCV, che a sua volta iporegola SMAD7, un regolatore negativo della via TGF- $\beta$ , determinando una regolazione a feedback positivo. I livelli di miR-199a, miR-199a\*, miR-200a e miR-200b sono strettamente associati con la progressione della fibrosi epatica sia in pazienti con HCV cronica che nei topi con fibrosi indotta da CCl4. Le famiglie di miR-199 e miR-200 promuovono la fibrosi epatica aumentando l'espressione di geni come quelli che codificano per procollagene1, collagenasi3 e inibitori delle metalloproteinasi 1. miR-122 è richiesto per l'omeostasi del fegato e ridotti livelli di questo miRNA hanno effetti deleteri sul fegato. La deficienza di miR-122 nel topo porta allo sviluppo di steatoepatite e fibrosi. La somministrazione cronica di alcol modula l'espressione di miR-122, infatti in topi ai quali è stato somministrato alcol si sono trovati bassi livelli di questo miR nel fegato. Dato che l'uso cronico prolungato di alcol porta alla fibrosi epatica, un decremento nel miR-122 dopo il consumo di alcol suggerisce un diretto o indiretto ruolo di miR-122 nella fibrosi indotta da alcol. miR-217 è coinvolto nella steatosi indotta da alcol regolando SIRT1, che colpisce i fattori trascrizionali essenziali regolatori metabolici. L'alcol modula i miRNA in differenti tipi cellulari del fegato e ciò amplifica il suo effetto patogeno. I pazienti con NASH mostrano un'espressione epatica di miRNA

alterata. I livelli di miR-122 nel fegato sono sostanzialmente diminuiti nei pazienti con NASH ed è stato proposto che i livelli di miR-122 contribuiscano ad alterare il metabolismo lipidico epatico (Antoine et al., 2013; Wang et al., 2009).

### 1.8.5 Implicazioni cliniche

Oltre a regolare l'espressione genica, studi molto recenti hanno identificato nuove funzioni dei miRNA che possono agire anche come ligandi capaci di trasduzione del segnale, unendosi ai recettori della superficie cellulare. Ad es., i miR-21 e miR-29a, secreti da cellule tumorali, si sono dimostrati capaci di legare TLR7 e TLR8 nelle cellule immunitarie, determinando l'attivazione di una risposta infiammatoria prometastatica mediata da TLR e favorendo la crescita metastatica del tumore. (Starkey Lewis et al., 2011) Non sorprende che le terapie mirate per i miRNA siano un'area di intenso interesse per le aziende farmaceutiche e molti composti sono in sviluppo preclinico e clinico per una varietà di indicazioni. Le terapie possono essere essenzialmente suddivise in inibitori dei miRNA o sostanze che mimano i miRNA (Rossbach, 2010).

I singoli miRNA che hanno un ruolo nello sviluppo di malattie possono essere specificatamente antagonizzati usando anti-miRNA, ovvero oligonucleotidi antisenso con specifiche modificazioni; in campo oncologico, un anti-miRNAs coniugato col colesterolo (per facilitare l'assorbimento cellulare e il legame con le proteine sieriche), chiamato *antagomiRs*, è stato usato per bloccare gli *onco-miRNA* (Rupaimoole & Slack, 2017).

Un altro esempio è quello del miR-122, che fu identificato nel 2005 come specifico del fegato e che può modulare la replicazione del virus dell'epatite C. Venne notato che la replicazione del virus può essere inibita da un anti-miR-122 (Ome modificato ASO), ponendo così le basi per lo sviluppo di un farmaco per il trattamento dell'infezione da HCV. In uno studio di fase II venne somministrato il farmaco denominato Mirasevir a pazienti con infezione cronica da HCV notando una significativa diminuzione del RNA sierico dell'HCV, in assenza di importanti effetti collaterali (Lindow & Kauppinen, 2012).

Nelle patologie relazionate a down-regulation dei miRNA la terapia si è focalizzata, invece, su molecole sintetiche di RNA a doppio filamento che si collegano al miRNA corrispondente, mimando l'azione dei pre-miRNA (Wang et al., 2009).

### 1.8.6 miRNA come biomarcatori

La presenza extracellulare dei miRNA è stata descritta per la prima volta nel 2008, nel plasma di pazienti con linfoma (Andersson et al., 2012). Da allora, in tutto il mondo molti ricercatori si sono concentrati sullo studio dei miRNA come biomarcatori poco invasivi ed economici nella diagnosi clinica di varie malattie. Essi possono infatti essere campionati in oltre 12 liquidi biologici, compresi sangue, plasma, liquido cefalorachidiano, urine, saliva etc.

I miRNA presenti nel plasma sono stabili anche in condizioni avverse, quali pH alto o basso, ciclo di congelamento-scongelo e conservazione a lungo termine a temperatura ambiente, perché confinati all'interno di esosomi, di microvescicole e di corpi apoptotici o perché associati a proteine che legano RNA (come le proteine Argonata 2) o a complessi di lipoproteine (HDL), per proteggersi dalla degradazione ad opera delle RNAsi.

Nel plasma i miRNA sono stati ritrovati liberi o in esosomi circolanti, ovvero microvescicole specializzate nel trasporto di diversi tipi di molecole, sono altamente stabili e resistenti all'attività della RNAsi, come anche a pH e a temperature estreme (Starkey Lewis et al., 2011).

All'interno degli esosomi si possono trovare numerose proteine, ma gli RNA, in particolar modo i microRNA, sembrano predominare in queste strutture (Antoine et al., 2013). La funzione di questi miRNA circolanti non è completamente chiarita, ma attualmente vengono considerati come facenti parte di un sistema di comunicazione inter-organo a corto e lungo raggio (Wang et al., 2009), potendo inoltre essere rilasciati da una cellula e poi captati e riutilizzati da un'altra, con caratteristiche che richiamano quelle del sistema endocrino (Andersson et al., 2012).

I miRNA circolanti possono derivare da vari tessuti o organi e il profilo di espressione di questi miRNA rappresenta una grande promessa come nuovo biomarcatore non invasivo per la diagnosi di molte malattie.

Un'analisi ematica completa dei miRNA, volta a caratterizzare i profili dei miRNA in diverse patologie, ha evidenziato che i pazienti con cancro del polmone, cancro del colon-retto e diabete hanno profili miRNA sierici unici rispetto a controlli sani (Vliegthart ADB et al., 2017).

Espressioni alterate di miRNA circolante sono state riportate anche nella sindrome coronarica acuta, nell'angina o infarto miocardico acuto, nell'insufficienza cardiaca, nell'aterosclerosi, nell'ipertensione essenziale e nell'ictus (Sayed et al., 2014). I livelli circolanti di miR-21 e miR-146 si sono dimostrati

significativamente più alti in pazienti anziani con infarto miocardico acuto e/o insufficienza cardiaca rispetto a soggetti sani (Olivieri et al., 2013); livelli ridotti di miR-146a, invece, sono stati trovati in pazienti diabetici, in associazione con insulino-resistenza, scarso controllo della glicemia e alti livelli plasmatici di TNF $\alpha$  e IL-6 (Balasubramanyam et al., 2011). Nel contesto del cancro, sono stati descritti numerosi miRNA circolanti come potenziali biomarcatori per una diagnosi precoce e per predire la prognosi e la risposta alla terapia (Schwarzenbach et al., 2014).

Altro campo di applicazione dei miRNA come biomarcatori sono le malattie neurologiche. Nel 2007, Schipper et al. hanno riportato una sovra-espressione di miRNA nel sangue periferico di pazienti con Malattia di Alzheimer, suggerendo un loro utilizzo come biomarcatori per la diagnosi. (Schipper et al., 2007) Di recente, Liu et al. hanno proposto che miR-384 potrebbe regolare l'espressione della proteina precursore dell'amiloide e della beta-secretasi, implicate nel percorso patologico della Malattia di Alzheimer (Liu, 2004).

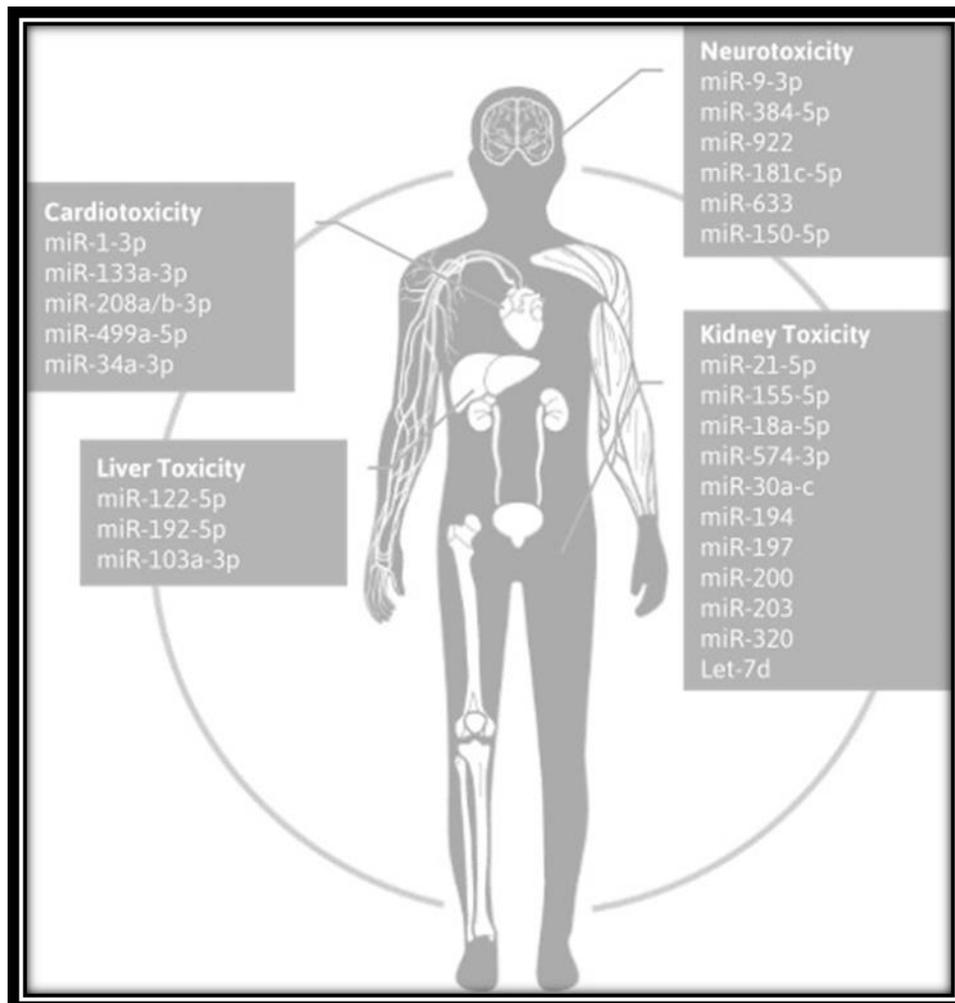
I due miRNA, miR7e miR-153, hanno invece dimostrato di essere in grado di modulare il livello trascrizionale di  $\alpha$ -sinucleina, che è il fattore scatenante del Morbo di Parkinson (Doxakis, 2010; Junn et al., 2009).

Nel cervello, ben 53 microRNA circolanti sono stati suggeriti come vitali per la comunicazione neuronale (Tsang et al., 2007) e i loro profili nel sangue periferico sono stati proposti come biomarcatori circolanti per il Disturbo Bipolare e la Malattia di Huntington (Gauthwin et al., 2011).

### **1.8.7 MiRNA in tossicologia**

Studi epigenetici ambientali hanno dimostrato che i miRNA regolano l'attività dei geni in seguito a modificazioni ambientali o dopo l'esposizione a sostanze tossiche: i cambiamenti indotti dallo xenobiotico nell'espressione del miRNA possono essere usati come marcatori informativi per la valutazione degli effetti tossici su diversi tessuti e organi. Pertanto, come anticipato nel § III del presente lavoro, i miRNA possono essere considerati biomarcatori predittivi o indicatori di lesioni tissutali dovute a esposizione a sostanze tossiche. Un'ampia gamma di sostanze altera, difatti, l'espressione dei miRNA nei diversi organi bersaglio (Yu & Cho, 2015).

Specifici profili di miRNA sono stati posti in relazione a tossicità epatica, cardiaca, renale e neuronale, aprendo la strada al ruolo di questi come biomarcatori specifici di danno d'organo (Starkey Lewis et al., 2011). **Figura 8**



**Figura 8.** Specificità dei miRNA per tossicità d'organo (Antoine et al., 2013)

Il potenziale dei miRNA circolanti come biomarcatori per il danno epatico fu segnalato per la prima volta in topi trattati con una dose tossica di paracetamolo; i miRNA circolanti come miR-122-5p e miR-192-5p, entrambi altamente concentrati nel tessuto epatico, presentavano variazioni ematiche sia dipendenti dalla dose e dal tempo di esposizione al farmaco sia parallele ai livelli sierici di aminotransferasi e all'istopatologia della degenerazione del fegato (Wang et al., 2009).

Successivamente, è stato indicato il miR-122 circolante come marcatore specifico del danno epatico acuto (ALI) in ratti (Andersson et al., 2012), in cani (Starkey Lewis et al., 2011), nei pesci zebra (Antoine et al., 2013) e nei maiali (Andersson et al., 2012).

Nel 2011, Starkey et al. hanno dimostrato per la prima volta che in un gruppo eterogeneo di pazienti con ALI i livelli di miR-122 erano elevati e correlati direttamente ai preesistenti marcatori di danno epatico; in particolare, i miR-122 circolanti si sono rivelati circa 100 volte più alti sia rispetto ai controlli su pazienti

sani, sia rispetto a pazienti che non avevano sviluppato danno indotto da paracetamolo (paracetamol-induced acute liver injury = PALI). Inoltre, lo studio dimostrò che i livelli di miR-122 tornavano rapidamente ai valori basali, prima delle ALT, indicando una breve emivita plasmatica del miR-122 (Starkey Lewis et al., 2011).

In studi successivi, Antoine et al., analizzando una coorte di 129 pazienti alla prima presentazione in ospedale per overdose da paracetamolo, hanno suggerito che il miR-122 può accuratamente aiutare a distinguere i pazienti con e senza ALI, in una fase precoce, ossia quando l'attività di ALT si presentava ancora nella norma (Antoine et al., 2013).

Un recente studio del 2017 ha constatato per la prima volta, che per valutare il PALI il miR-122 può essere misurato in una singola goccia di sangue capillare: ciò faciliterebbe molto l'approccio diagnostico nel sovradosaggio da paracetamolo e ridurrebbe notevolmente il sovraccarico dei sistemi sanitari in cui questa overdose rappresenta una vasta percentuale degli accessi in pronto soccorso. E' stato verificato, inoltre, che la concentrazione del miR-122 capillare misurato in una goccia di sangue ematico è fortemente correlata con la concentrazione del miR-122 misurato in sangue e plasma ottenuti da venipuntura. Questi dati confermano che sia le modificazioni dinamiche dei valori che la sensibilità a segnalare PALI è simile tra i due tipi di campioni, tra quelli cioè prelevati con gocce di sangue capillare e tra i risultati precedentemente riportati da campioni venosi e plasmatici ottenuti da prelievo venoso (Vliegenthart ADB et al., 2017).

Col passare degli anni numerosi studi hanno documentato che le alterazioni intracellulari dei miRNA sono correlate anche ad altre patologie epatiche tra cui epatiti virali, alcoliche, steatoepatite non alcolica, malattia epatica autoimmune, danno da ischemia-riperfusion e danno epatico indotto da farmaci (Szabo & Bala, 2013). Ancor più, dunque, non dovrebbe sorprendere come le terapie di targeting per i miRNA siano un'area in crescita nell'interesse di molte aziende farmaceutiche e che parecchi di questi composti siano in sviluppo preclinico e clinico per una varietà di indicazioni, come si è cercato di chiarire nei precedenti paragrafi.

## 2. Il fegato e l'epatotossicità da xenobiotici

### 2.2 Ruolo del fegato

Il fegato svolge un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi del metabolismo. Le funzioni epatiche includono la sintesi, la conservazione e ripartizione del glicogeno. Inoltre, il fegato è importante nel metabolismo dei lipidi, nella sintesi di albumina, fattori di coagulazione e altre proteine importanti, nella sintesi degli acidi biliari necessari per assorbimento di lipidi e vitamine liposolubili e nel metabolismo del colesterolo. Gli epatociti facilitano l'escrezione di molti metalli, tra cui ferro, rame, zinco, manganese, mercurio e alluminio, nonché lo smaltimento dei prodotti del metabolismo, come la bilirubina e l'ammoniaca.

L'interruzione generalizzata di queste importanti funzioni provoca manifestazioni di insufficienza epatica come iperbilirubinemia, coagulopatia, ipoalbuminemia, iperammoniemia e ipoglicemia. Le funzioni epatiche possono essere alterate selettivamente dall'esposizione a epatotossine. Ne risultano disturbi di funzioni più specifiche come l'accumulo di grasso, metalli e bilirubina e sviluppo carenze di vitamine liposolubili.

Il fegato è anche il sito principale di biotrasformazione e disintossicazione di xenobiotici. La sua interposizione tra l'intestino e la circolazione sistemica lo rende l'organo di primo passaggio degli xenobiotici, che vengono assorbiti dal tratto gastrointestinale e giungono al fegato tramite la vena porta. Il fegato riceve anche sangue dalla circolazione sistemica e partecipa nella intossicazione ed eliminazione degli xenobiotici che raggiungono il flusso sanguigno attraverso altre vie, come l'inalazione o l'assorbimento transcutaneo/transmucoso (Delaney, 2011).

La maggior parte dei farmaci orali assorbiti dal tratto gastrointestinale sono lipofili e insolubili in acqua. Questi farmaci devono subire un metabolismo epatico tramite una reazione di fase I che possa consentire loro di diventare idrofili. Questa reazione di fase I si ottiene per ossidazione, riduzione o idrolisi. Queste reazioni sono catalizzate principalmente dalla superfamiglia degli enzimi del citocromo P450 (Wilkinson, 2005). I metaboliti idrofili del metabolismo di fase I subiscono quindi reazioni di fase II in cui un gruppo polare viene aggiunto al metabolita per consentire l'escrezione. Queste reazioni vengono eseguite principalmente mediante coniugazione con glutatione, acido glucuronico o solfato per produrre un prodotto più idrosolubile riconosciuto dai trasportatori di farmaci ed escreto nelle urine o nella bile (Gunawan & Kaplowitz, 2007).

Gli xenobiotici disintossicati nel fegato vengono successivamente escreti nelle urine, le vie biliari forniscono una seconda via essenziale per l'eliminazione degli xenobiotici disintossicati e dei prodotti del metabolismo.

La suscettibilità di un individuo a un'epatotossina dipende da numerosi fattori, tra cui l'attività degli enzimi di biotrasformazione, la disponibilità di substrati come il glutatione e la competenza immunitaria dell'individuo. A loro volta, questi sono influenzati da età, sesso, dieta, malattie sottostanti, esposizione concomitante ad altri xenobiotici e fattori genetici. Inoltre, molti enzimi coinvolti nella biotrasformazione mostrano un polimorfismo genetico (Sotaniemi AE et al., 1997; Delaney, 2011). **Tabella 1**

<b>Factor</b>	<b>Factor Modifier</b>	<b>Examples</b>
Age	Children, ↑ hepatotoxicity >60 y, ↑ hepatotoxicity	Valproic acid, salicylates Isoniazid, halothane
Gender	Men, ↑ hepatotoxicity Women, ↑ hepatotoxicity	Azathioprine Nitrofurantoin, halothane
Nutrition	Obesity, ↑ hepatotoxicity Fasting, ↑ hepatotoxicity	Methotrexate Acetaminophen
Excessive ethyl alcohol	↑ hepatotoxicity	Acetaminophen, isoniazid
Dose	↑ blood levels → ↑ hepatotoxicity Exposure dose, duration ↑ Hepatotoxicity	Acetaminophen, aspirin Methotrexate, vitamin A
Other drugs	↑ Hepatotoxicity ↑ Hepatotoxicity	Rifampicin, pyrazinamide, and isoniazid Other antiepileptics and valproic acid
Hepatitis C, B	↑ Hepatotoxicity	HAART therapy

**Tabella 1.** Fattori esterni/ambientali e rischio per danno epatico indotto da farmaci (Pugh et al., 2009)

L'epatotossicità indotta da farmaci può manifestarsi come reazioni idiosincrasiche o dirette.

Le prime causano danni epatici un piccolo numero di individui e il loro effetto non è apparentemente dose dipendente o prevedibile.

L'epatotossicità diretta, invece, è generalmente dose dipendente ed è riproducibile. Gli xenobiotici considerati primari includono classicamente il paracetamolo, il tetracloruro di carbonio (CCL4) e il fosforo giallo (Delaney, 2011). Sebbene per gli ultimi due l'incidenza sia globalmente bassa, altri xenobiotici, variabili in base all'area geografica dipendentemente per fattori culturali, economici e sociali, svolgono il ruolo di importanti epatotossici primari.

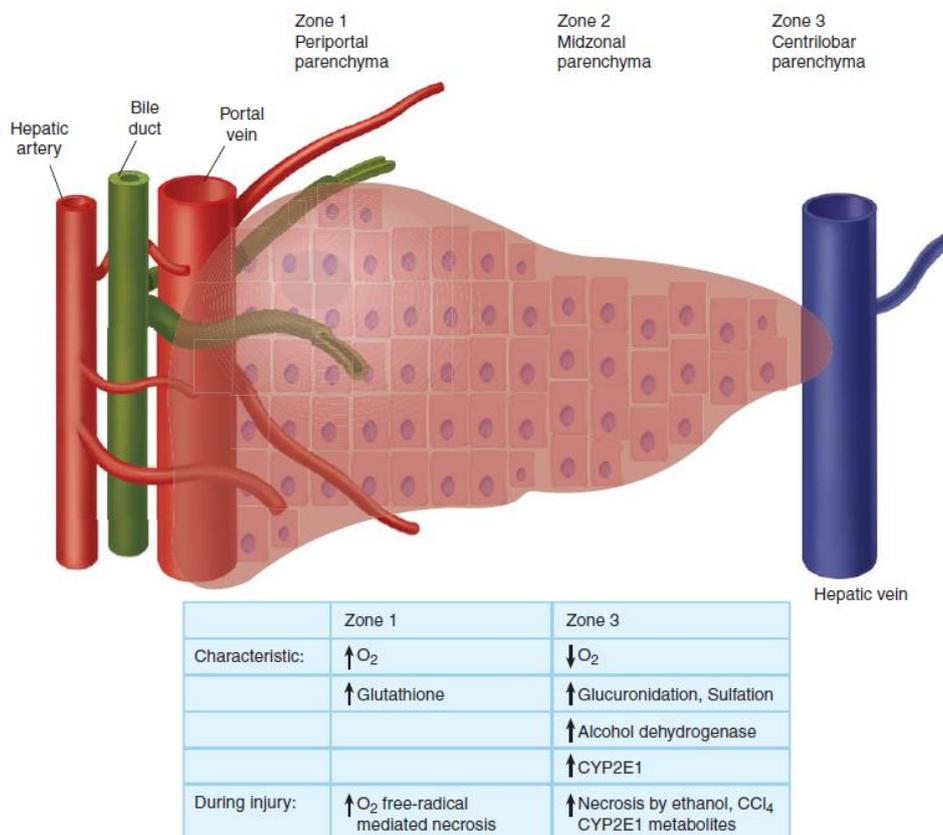
Il periodo di tempo che intercorre tra l'esposizione ad uno xenobiotico e l'insorgenza di danno epatico è solitamente variabile in base al tipo di farmaco e da persona a persona, così come lo è il dosaggio necessario per produrre il danno epatico. L'alterazione può presentarsi come danno epatocellulare, colestatico o misto.

La tossicità può verificarsi a seguito della biotrasformazione del farmaco da parte degli epatociti, catalizzata dagli enzimi del citocromo P450, che generano intermedi tossici / reattivi aggiuntivi, ed il paracetamolo è un classico esempio (Castell & Castell, n.d.).

### 2.3 Localizzazione delle lesioni epatiche

La lesione epatocellulare che si verifica vicino alla vena porta è chiamata periportale, o necrosi della zona 1. I termini necrosi centrolobulare o necrosi di zona 3 si riferiscono alla lesione che circonda la vena epatica centrale. Le caratteristiche metaboliche delle diverse zone sono rilevanti per la distribuzione anatomica del danno epatico tossico. A causa della sua posizione l'area periportale, la zona 1, ha un contenuto di ossigeno due volte superiore rispetto alla zona 3. Le lesioni da radicali liberi dell'ossigeno o da reazioni dipendenti dall'ossigeno (perossidazione lipidica) saranno dunque predominanti nella zona 1, mentre la tendenza all'accumulo di grasso centrolobulare, zona 3, nei pazienti con la steatosi alcolica è attribuito all'effetto dell'ipossia relativa nell'area della vena centrale.

Inoltre, anche la disponibilità di substrati per la disintossicazione e la localizzazione degli enzimi coinvolti nella biotrasformazione influenzano il sito della lesione. La zona 1 ha una maggiore concentrazione di glutathione, mentre la zona 3 ha a maggiore capacità di glucuronidazione e solfatazione. La zona 3 presenta maggiori concentrazioni di alcol deidrogenasi, che può portare a un aumento di produzione di acetaldeide tossica. Inoltre ha alte concentrazioni di citocromo ossidasi CYP2E1, che converte molti xenobiotici tra cui paracetamolo, nitrosammine, benzene e tetracloruro di carbonio (CCl<sub>4</sub>) a intermedi reattivi che possono causare lesioni centrolobulari. **Figura 9**



**Figura 9.** Caratteristiche delle diverse zone degli epatociti (Delaney, 2011)

## 2.4 Manifestazioni delle lesioni epatiche

Il fegato risponde alle lesioni in un numero limitato di modi. Le cellule possono rigonfiarsi (*ballooning degeneration*) e accumulare grasso (steatosi) o materiale biliare. Possono andare incontro a necrosi e lisare o subire un più lento processo di apoptosi, formando corpi eosinofili, piccoli e non funzionali. La necrosi può essere focale o a ponte, collegando aree periportali o centrolobulari, zonale o panacinare, oppure può essere massiva.

Una risposta cellulare infiammatoria può precedere o seguire la necrosi. La lesione ai dotti biliari provoca la colestasi. Le lesioni vascolari possono causare ostruzione al flusso venoso. Gli effetti vascolari della cocaina possono causare danno epatico ischemico. La varietà e lo spettro di lesioni causate da FANS illustra la difficoltà nella categorizzazione e caratterizzazione di tutte le forme e le cause del danno epatico da xenobiotici (Delaney, 2011). **Tabella 2**

**Acute Hepatocellular Necrosis**

Acetaminophen<sup>a</sup>  
 Allopurinol  
 Amatoxin<sup>a</sup>  
 Arsenic  
 Carbamazepine  
 Carbon tetrachloride<sup>a</sup>  
 Chlordecone (less severe)  
 Hydralazine  
 Iron  
 Isoniazid  
 Methotrexate<sup>a</sup>  
 Methyl dopa  
 Nitrofurantoin  
 Phenytoin  
 Phosphorus (yellow)<sup>a</sup>  
 Procainamide  
 Propylthiouracil  
 Quinine  
 Propylthiouracil  
 Quinine  
 Sulfonamides  
 Tetrachlorethane  
 Tetracycline  
 Trinitrotoluene  
 Troglitazone  
 Vinyl Chloride

**Steatohepatitis**

Amiodarone  
 Dimethyl formamide

**Microvesicular Steatosis**

Aflatoxin  
 Cerulide  
 Fialuridine  
 Hypoglycin  
 Marga oil  
 Nucleoside analogs  
 (Antiretrovirals)  
 Tetracycline  
 Valproic acid

**Granulomatous Hepatitis**

Allopurinol  
 Aspirin  
 Beryllium  
 Carbamazepine  
 Copper Salts  
 Diltiazem  
 Halothane  
 Hydralazine  
 Isoniazid  
 Metolazone  
 Methyl dopa  
 Nitrofurantoin  
 Penicillins  
 Phenytoin  
 Procainamide  
 Quinidine  
 Quinine  
 Sulfonamides  
 Sulfonyleureas

**Cholestasis**

Allopurinol  
 Amoxicillin/clavulanic acid  
 Androgens  
 Chlorpromazine  
 Chlorpropamide  
 Erythromycin estolate  
 Hydralazine  
 Nitrofurantoin  
 Oral contraceptives  
 Rifampin  
 Tetracycline  
 Trimethaprim-  
 sulfamethoxazole

**Fibrosis and Cirrhosis**

Ethanol  
 Methotrexate  
 Vitamin A

**Neoplasms**

Androgens  
 Contraceptive steroids  
 Vinyl chloride

**Venoocclusive Disease**

Cyclophosphamide  
 Pyrrolidine alkaloids

**Cannicular Cholestasis**

Chlorpromazine  
 Cyclosporine  
 Estrogens  
 Methylene dianiline

**Bile Duct Damage**

$\alpha$ -naphthylisothiocyanate  
 Amoxicillin  
 Carbamazepine  
 Nitrofurantoin  
 Oral contraceptives

**Autoimmune Hepatitis**

Dantrolene  
 Diclofenac  
 Methyl dopa  
 Methyl dopa  
 Nafcillin  
 Nitrofurantoin  
 Methyl dopa  
 Nafcillin  
 Nitrofurantoin  
 Propylthiouracil

**Tabella 2.** Caratteristiche morfologie del danno epatico e xenobiotici associati (Delaney, 2011)

Il danno epatico è causato da almeno sei meccanismi principali che coinvolgono gli epatociti e definiscono il quadro di danno epatico. Se reazioni ad alta energia che coinvolgono gli enzimi del citocromo P-450 portano al legame covalente del farmaco con le proteine intracellulari, si produce una disfunzione intracellulare che si traduce nella perdita di gradienti ionici, il declino nei livelli di ATP e l'interruzione dell'actina, rigonfiamento cellulare e lisi cellulare (**Figura 10A**).

Farmaci che influenzano il trasporto delle proteine a livello della membrana canalicolare possono interrompere il flusso biliare. Alcuni farmaci, ad esempio, provocano colestasi, legandosi e inibendo la proteina di esportazione del sale biliare (**Figura 10B**).

Difetti genetici nei trasportatori, come nella proteina di resistenza multifarmaco, in combinazione con gli ormoni può promuovere la colestasi durante la gravidanza o durante il trattamento con farmaci contenenti estrogeni. In forme miste di danno epatico, il danno delle pompe canalicolari ad altri meccanismi intracellulari causano accumulo di acidi biliari, responsabili in seconda istanza del danno agli epatociti.

I farmaci sono molecole relativamente piccole e, quindi, è improbabile che evocino una risposta immunitaria. Tuttavia, la loro biotrasformazione è ad alta energia e le reazioni possono provocare la formazione di addotti - cioè farmaci legati in modo covalente agli enzimi. Questi addotti sono abbastanza grandi da servire come bersagli immunitari migrando sulla superficie degli epatociti, dove possono indurre la formazione di anticorpi o indurre citolisi diretta da parte dei linfociti T (**Figura 10C e 10D**).

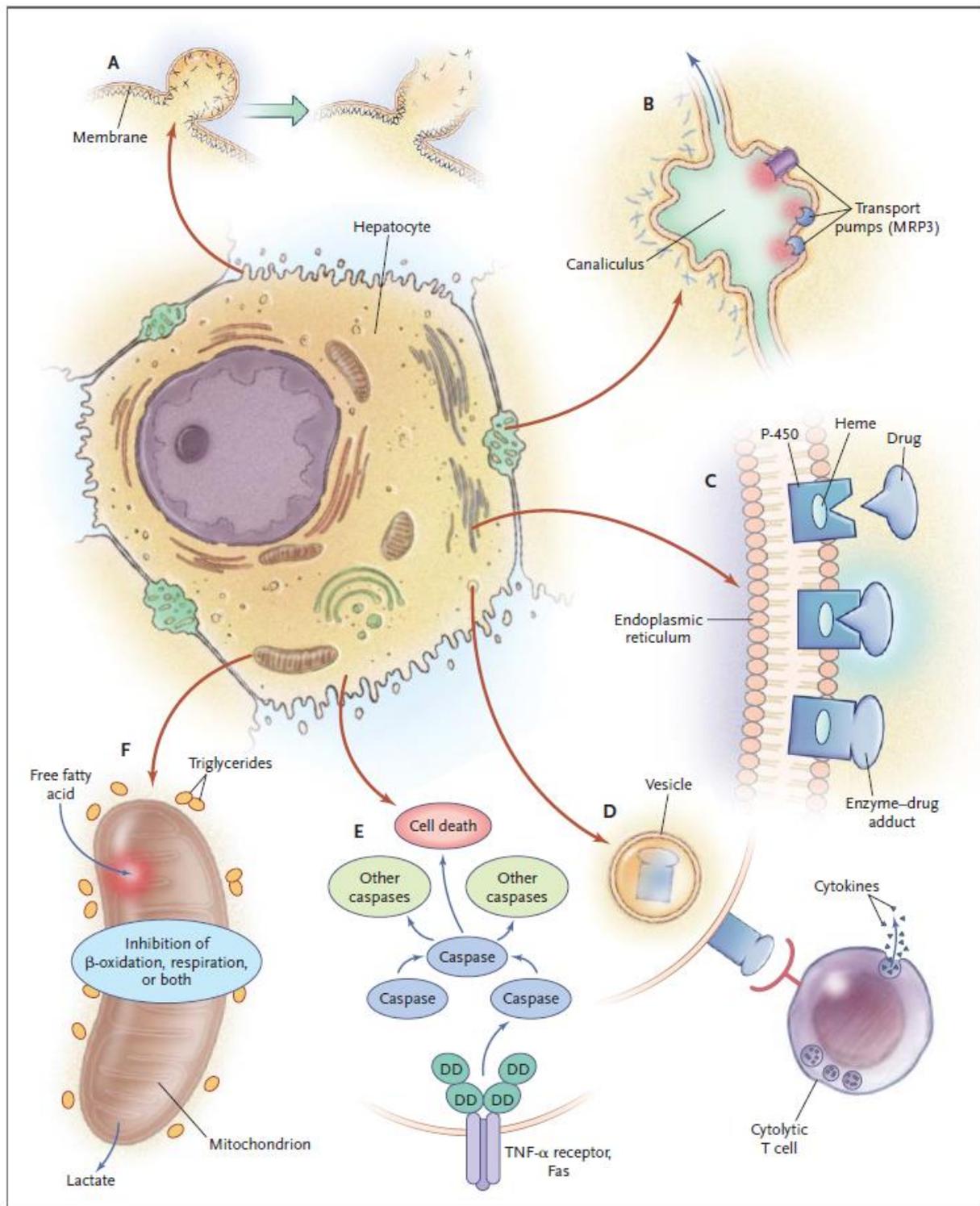
La risposta delle citochine così evocata può causare infiammazione e ulteriore epatotossicità mediata dai neutrofili. La morte cellulare programmata (apoptosi) può verificarsi in concerto con lesioni immuno-mediate, distruggendo gli epatociti tramite il TNF e le vie Fas (**Figura 10E**).

Altri meccanismi di danno si verificano quando sono danneggiati i mitocondri, interrompendo l'ossidazione degli acidi grassi e la produzione di energia. Quando gli xenobiotici alterano gli enzimi della catena respiratoria o il DNA mitocondriale, ne risulta uno stress ossidativo, con conseguente metabolismo anaerobico, acidosi lattica e accumulo di trigliceridi (grasso microvesicolare all'interno cellule) (**Figura 10F**).

La steatoepatite (grasso che principalmente si accumula nelle grandi vescicole al di fuori delle cellule epatiche, con infiammazione associata) è comunemente associato all'abuso di alcol, ma può anche derivare dall'utilizzo di farmaci.

Altre cellule del fegato possono essere danneggiate dai farmaci o fungere da modulatori di un'incipiente reazione. Ad esempio, le cellule di Kupffer attivano le citochine che possono amplificare le lesioni e le cellule stellate o i macrofagi possono aumentare il danno, produrre fibrosi o formare granulomi (Lee, 2003).

## **Figura 10**



**Figura 10.** L'epatocita normale mostrato al centro della figura può essere influenzato in almeno sei modi, etichettati da A a F. L'epatocita normale mostrato al centro della figura può essere influenzato in almeno sei modi, etichettati da A a F. La rottura dell'omeostasi intracellulare del calcio porta allo smontaggio delle fibrille di actina sulla superficie dell'epatocita, con conseguente sanguinamento della membrana cellulare, rottura e lisi cellulare. Nelle alterazioni colestatiche, può verificarsi la rottura dei filamenti di actina (B) vicino al canalicolo, la parte specializzata della cellula responsabile dell'escrezione biliare. La perdita dei processi villosi e l'interruzione delle pompe di trasporto come la proteina 3 associata alla resistenza multipla (MRP3) prevengono l'escrezione di bilirubina e altri composti organici. Molte reazioni epatocellulari coinvolgono il sistema del citocromo P-450 contenente eme (C), generando reazioni ad alta energia che possono portare al legame covalente del farmaco all'enzima, creando così nuovi addotti non funzionanti.

*Questi addotti enzima-farmaco migrano sulla superficie cellulare (D) nelle vescicole per fungere da immunogeni bersaglio per l'attacco citolitico da parte delle cellule T, stimolando una risposta immunitaria multifforme che coinvolge sia le cellule T citolitiche che le citochine. L'attivazione delle vie apoptotiche da parte del fattore di necrosi tumorale o il recettore (TNF- $\alpha$ ) o Fas può innescare la cascata di caspasi intercellulari (E), che si traduce in morte cellulare programmata con perdita di cromatina nucleare. Alcuni farmaci inibiscono la funzione mitocondriale con un duplice effetto su entrambe le beta-ossidazioni (che influenzano la produzione di energia mediante l'inibizione della sintesi di nicotinamide adenina dinucleotide e flavina adenina dinucleotide, con conseguente diminuzione della produzione di ATP) e degli enzimi della catena respiratoria (F). Gli acidi grassi liberi non possono essere metabolizzati e la mancanza di respirazione aerobica provoca l'accumulo di lattati e specie reattive dell'ossigeno (ROS). La presenza di ROS può danneggiare ulteriormente il DNA mitocondriale. Questo tipo di lesione è caratteristico di una varietà di agenti, inclusi gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa, che si legano direttamente al DNA mitocondriale, così come l'acido valproico, la tetraciclina e l'aspirina. I metaboliti tossici escreti nella bile possono danneggiare l'epitelio dei dotti biliari (non mostrato) (Lee, 2003).*

### 3 Il paracetamolo

Paracetamolo (nome internazionale utilizzato in Europa) e acetaminofene (nome internazionale usato negli USA) sono due nomi ufficiali dello stesso composto, derivanti dalla sua denominazione chimica: N-**acetyl-para-amminophenol (paracetamol)** o N-**acetyl-para-aminophenol (acetaminophen)** (Jòzwiak-Bebenista M e Nowak JZ, 2014).

#### 3.1 Cenni storici

##### 3.1.1 Acetanilide

Nel 1884 un'importante scoperta ebbe luogo a Strasburgo (in Germania, poi in Francia). A quel tempo, la Clinica Medica di Strasburgo era guidata dal famoso prof. Adolf Kussmaul: due giovani assistenti, A.Cahn e P. Hepp, chiesero il suo parere su come trattare un paziente che soffriva di molti disturbi, tra cui febbre e infestazione da elminti (Cahn A e Hepp P, 1886). Kussmaul suggerì di provare il naftalene, che era stato raccomandato come antisettico intestinale (Sneader W, 1985) e i due giovani medici seguirono il consiglio, rimanendo però delusi dal risultato: molti dei disturbi erano rimasti, compresi i vermi. Tuttavia, osservarono con sorpresa che la febbre del paziente iniziò a diminuire poco dopo la somministrazione del naftalene, effetto antipiretico non ancora conosciuto. Ricercando la fonte del farmaco, scoprirono che la farmacia gli aveva fornito acetanilide (l'ammide dell'anilina e dell'acido acetico) invece di naftalene - un errore destinato ad avere conseguenze di lunga durata. Fu così che Cahn e Hepp decisero di testare l'acetanilide in conigli e cani (Cahn A e Hepp P, 1886), osservando una buona attività antipiretica, anche se di breve durata, nonché l'assenza di effetti collaterali. I giovani medici osarono quindi testare l'acetanilide in 24 pazienti. Tutti i pazienti mostrarono una riduzione della febbre.

L'Acetanilide risultò efficace come il fenazone, che era stato introdotto con successo sul mercato due anni prima come antipiretico (Filehne W, 1884). L'unica complicanza che osservarono Cahn e Hepp fu che alcuni pazienti svilupparono un colore bluastrò della pelle, ma questo fenomeno non destò troppa preoccupazione.

Una piccola azienda vicino a Strasburgo, la Kalle, produsse grandi quantità di acetanilide per i giovani medici che riuscirono così a distribuire il farmaco ai colleghi interessati e presto esso assunse il nome di 'antifebbrina'. Con un suo uso su più ampia scala, aumentarono i report di colorazione bluastra della pelle, che venne in seguito identificata come risultato di metaemoglobinemia (Sneader W, 2005; Prescott LF, 1996); ciò non dovette tuttavia sorprendere in quanto l'anilina, da cui la acetanilide fu sintetizzata, era nota per la sua tossicità ematica. Di conseguenza, si iniziò con la ricerca di derivati chimici più sicuri.

### 3.1.2 Fenacetina e paracetamolo

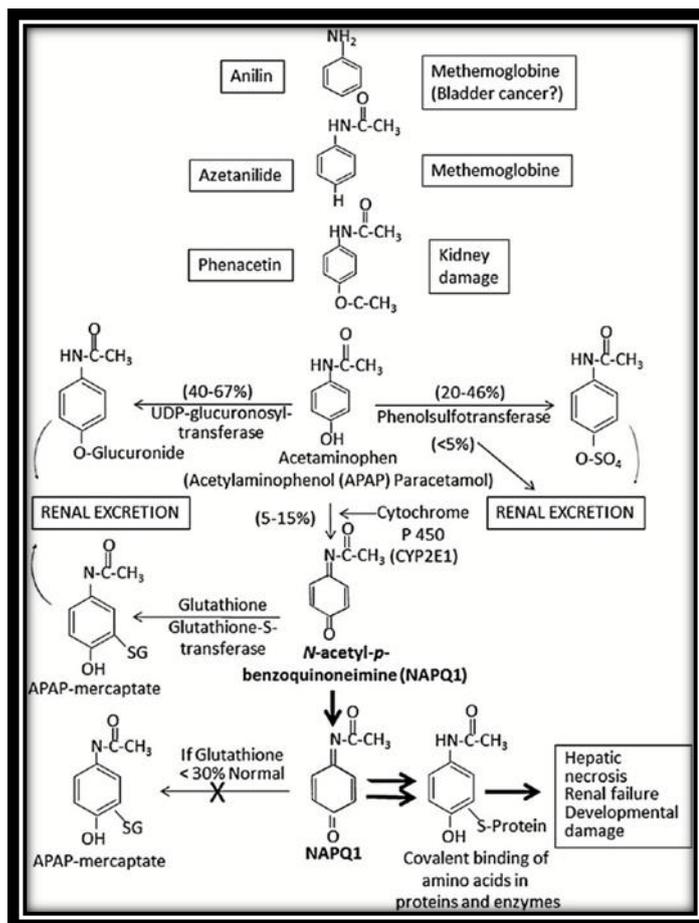
La sintesi della fenacetina è da attribuire a O. Hinsberg (1913). Insieme ad un farmacologo di Friburgo, A. Kast, mostrò che il nuovo composto funzionava come l'acetanilide, ma era meno tossico (Hinsberg O, 1913), inoltre, si sarebbe potuto produrre a basso costo, in quanto Bayer e altre società erano state inondate di grandi quantità di para-nitrofenolo, che è un sottoprodotto della produzione di dianisidina (necessaria per produrre i nuovi coloranti all'anilina sintetici).

A partire da quel momento, la Bayer ed altre compagnie farmaceutiche continuarono la ricerca di altri farmaci con minori effetti collaterali e fu così che il paracetamolo venne scoperto proprio dalla Bayer. Sin dall'inizio, si sospettò che fosse un metabolita della fenacetina; esso non venne dapprima ritenuto superiore alla fenacetina e sembrava mantenere alcune delle caratteristiche negative dell'acetanilide, vale a dire la metaemoglobinemia (Von Mering J, 1893). In seguito tale considerazione si rivelò un errore, probabilmente mediato dalle impurità, ma continuò ugualmente a favorire l'uso diffuso della fenacetina durante la prima metà del XX secolo.

La situazione cambiò nel 1946 quando gli scienziati americani investigarono nuovamente il metabolismo della fenacetina. A New York Greenberg, Yale, Flinn, Brodie e Axelrod (Axelrod J, 1988) dimostrarono come il paracetamolo fosse il principale metabolita (attivo) della fenacetina, una rivendicazione originariamente anticipata da Hinsberg e Treupel (1894). Brodie credeva che il paracetamolo fosse più sicuro e più attivo rispetto alla fenacetina, poiché quest'ultima potrebbe condurre all'anilina, al contrario del paracetamolo (Flinn FB e Brodie BB, 1948). Tuttavia, il paracetamolo non era la fine della cascata metabolica; esso è eliminato come glucuronide o solfato, ma una sua parte è ossidata a NAPQI (N-acetil-p-benzoquinoneimmino), un reagente altamente reattivo, con cui avremo a che fare successivamente. **Figura 11**

Tuttavia, dai dati acquisiti dal gruppo Axelrod, era plausibile che il paracetamolo potesse essere il farmaco migliore, era privo di produzione di metaemoglobina, ma manteneva il potere analgesico e antipiretico della fenacetina. Queste osservazioni supportarono l'introduzione sul mercato del paracetamolo.

È interessante notare che il problema della produzione di metaemoglobina venne risolto, mentre la tossicità epatica del paracetamolo venne trascurata fino al 1966 (Davidson DG ed Eastham WN, 1966).



**Figura 11.** Anilina e suoi metaboliti (Brune K et al., 2014)

### 3.1.3 Diffusione del paracetamolo

L'aspirina (introdotta nel 1899), il fenazone (1884) e l'acetanilide, in seguito sostituiti dalla fenacetina (1887), dominavano il mercato dei farmaci durante i primi anni 50 del XX secolo. Essi erano i farmaci più utilizzati nella maggior parte dei paesi: negli Stati Uniti, nel Regno Unito e in Australia, l'aspirina e altri derivati dell'acido salicilico erano gli analgesici standard, mentre nell'Europa continentale e in parti dell'Asia, il fenazone e i derivati (amminofenazone, dipyrone) erano i farmaci prevalenti. Quando fu introdotto il principale metabolita della fenacetina, il paracetamolo (1953), pochi consumatori passarono al nuovo composto, ma la situazione cambiò presto.

In primo luogo, la situazione economica dell'Europa e degli Stati Uniti migliorò e con essa la domanda di beni di consumo; in secondo luogo, si andarono consolidando abitudini che portarono a una richiesta sempre maggiore di farmaci analgesici. In Svizzera, ad es., la tradizionale industria di orologeria guadagnò slancio e molte donne vennero impiegate in fabbrica nell'assemblaggio di orologi meccanici; il lavoro portava a mal di testa ed esaurimento dopo poche ore di assemblaggio dei piccoli e delicati orologi

meccanici (Moeschlin S, 1957, 1958; Dubach UC et al., 1975, 1991). Un metodo efficace utilizzato per superare il dolore e la stanchezza era una pausa, un caffè e un pezzo di pane ricoperto di burro e pillole per il "mal di testa": il più importante farmaco era prodotto dall'industria Hofmann-La Roche, chiamato Saridon®, contenente caffeina, fenacetina, propilfenazone e barbiturici (Zollinger HU, 1955). Allo stesso tempo, era consuetudine in Svizzera che donne anziane prendessero il caffè accompagnandolo con un paio di pillole per il mal di testa, che potevano ottenere direttamente dal cameriere nelle caffetterie. Queste e altre simili abitudini, non solo nel paese elvetico, ebbero come risultato un aumento dell'uso di pillole per il mal di testa, che tipicamente consistevano di tre ingredienti: fenacetina (o fenazone, propilfenazone), aspirina e caffeina.

Nessuno aveva paura di un qualche possibile danno, in quanto tutti i loro componenti e le loro miscele erano considerati sicuri, utili e piacevoli. Negli anni seguenti, tuttavia, gli scienziati Svizzeri notarono un aumento dell'incidenza di nefrite interstiziale nella popolazione di Basilea e nelle regioni vicine, prevalente in giovani donne dai 30 ai 50 anni (molte lavoratrici dell'industria orologiera), che inizialmente avevano sofferto di ipertensione lieve, in seguito di nefrite interstiziale con pigmentazione della pelle e infine erano state colpite da morte prematura per infarto cardiaco e/o insufficienza cardiaca. Nella maggior parte dei casi, la malattia iniziava con un mal di testa, che era in primo luogo episodico e in seguito quasi permanente, il cosiddetto "*mal di testa a rimbalzo*" (Rapoport A et al., 1996), con una conseguente assunzione eccessiva di farmaci per la cefalea.

Una volta stabilito il nesso causale tra fenacetina e nefrite interstiziale, a partire dagli anni '50 del XX secolo, il paracetamolo soppiantò la fenacetina. Si sperava che il potenziale di abuso sarebbe stato inferiore e la tossicità renale assente. In seguito, dopo altri studi, venne dichiarato che il paracetamolo, pur non essendo causa di produzione di metaemoglobina (Prescott LF, 1980), tuttavia si rivelava essere epatotossico a causa del suo intermedio molto reattivo (NAPQI, **Figura 11**), prodotto dagli enzimi del citocromo (CYP) P450 preferenzialmente nel fegato e nei reni.

Ad oggi, ogni anno il paracetamolo è responsabile di centinaia di casi di morte e migliaia di ricoveri ospedalieri conseguenti a sovradosaggio, volontario o accidentale (Moynihan R, 2002; Lee WM, 2004; Brune et al., 2015).

### 3.2 Farmacocinetica

Il paracetamolo è un acido organico debole, moderatamente idrofilico e lipofilo; ha un valore di pKa pari a 9,5 ed è quindi in gran parte non ionizzato all'interno dell'intervallo di pH fisiologico.

#### *a) Assorbimento*

Se assunto per via orale, l'assorbimento del paracetamolo nel tratto gastrointestinale avviene mediante trasporto passivo (Bagnall, Kelleher, Walker&Losowsky, 1979). Nell'uomo l'assorbimento è trascurabile a livello dello stomaco, ma molto rapido nell'intestino tenue e il tasso di assorbimento dunque dipenderà dalla velocità di svuotamento gastrico (Nimmo J et al., 1973): l'assorbimento è rallentato se lo svuotamento gastrico è ritardato dal cibo, dalla postura, da malattie o da farmaci, per quanto la quantità totale assorbita non diminuisca (McGilveray IJ e Mattok GL, 1972).

Nei soggetti a digiuno sani, l'assorbimento del paracetamolo in soluzione è molto rapido con un picco plasmatico della concentrazione che si verifica entro 15-30 minuti dall'ingestione. L'assorbimento delle compresse è, invece, solitamente più lento.

L'assorbimento orale, inoltre, si rivela più rapido quando il farmaco è somministrato in forme farmaceutiche effervescenti: da alcuni studi, sia il tempo di picco plasmatico (27 vs 45 min rispettivamente con compressa effervescente e non effervescente), sia l'AUC 0-3 ore (223,8 vs 198,2 micromoli-h/L) sono risultati maggiori, mentre il picco plasmatico non ha evidenziato differenze significative (143 vs 131 micromoli/L). Dopo 15 minuti dalla somministrazione, l'85% dei pazienti che avevano ricevuto compresse effervescenti di paracetamolo avevano raggiunto una concentrazione plasmatica pari o superiore a 70 micromoli/L (range terapeutico: 70-230 micromoli/L), contro il 10% di quelli che avevano assunto compresse non effervescenti. Dopo 30 minuti, le percentuali dei due gruppi di pazienti erano rispettivamente pari al 95% e al 45% (Rygnestad et al., 2000).

L'assorbimento per via rettale è circa metà di quello orale.

#### *b) Distribuzione*

Il paracetamolo va a distribuirsi rapidamente e in maniera relativamente uniforme nei tessuti (Brodie BB e Axelrod J, 1949). Il rapporto tra la concentrazione nei globuli rossi e nel plasma è di circa 1,2 : 1 e il legame alle proteine plasmatiche è trascurabile (Gazzard BJ et al., 1973). Il volume apparente di distribuzione è di circa 0,9 l / kg.

#### *c) Metabolismo*

Il paracetamolo è ampiamente metabolizzato e solo il 2-5% della dose terapeutica viene escreta invariata nell'urina.

Sebbene la biotrasformazione si verifichi prevalentemente nel fegato, una parte ha luogo anche nell'intestino e nel rene (Josting D et al.1976). Una buona parte viene metabolizzata nel fegato e coniugata con acido glucuronico o solfato, ma una minore frazione viene convertita dalla ossidasi epatica funzione mista a un metabolita alchilante altamente reattivo, il NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone-imina). Questo metabolita è di norma rapidamente inattivato dalla coniugazione con glutatione, ridotto ed eventualmente escreto nelle urine, unito a cisteina e acido mercapturico.

Altri metaboliti minori del paracetamolo includono i coniugati 3-metossi-, 3-idrossi- e 3-tiometilparacetamolo (Andrews RS et al 1978).

Il metabolismo del paracetamolo è età- e dose- dipendente: in giovani adulti sani, l'emivita plasmatica del paracetamolo dopo una dose terapeutica è di circa 2 ore (intervallo 1,5-2,5 ore), arco di tempo dopo il quale viene escreto nell'urina coniugato con solfato (4%) glucuronide (30%), cisteina (55%) e acido mercapturico (4%) nelle successive 24 ore.

Nei neonati e bambini piccoli, tuttavia, la coniugazione con glucuronide è carente. L'emivita è così prolungata e la via metabolica dominante risulta essere la solfatazione (Levy et al., 1975).

L'emivita plasmatica è prolungata in caso di epatopatia cronica.

#### d) *Escrezione renale*

La clearance renale media del paracetamolo in soggetti sani trattati con 20 mg / kg è di 13 ml / minuto ed essa dipende dalla velocità del flusso di urina, ma non dal suo pH (Prescott LF & Wright N, 1973). Il paracetamolo viene filtrato dal glomerulo con un successivo e ampio riassorbimento tubulare.

La clearance renale media del paracetamolo solfato e glucuronide è rispettivamente di 166 e 130 ml / min, senza alcuna correlazione con il flusso di urina o con il pH. L'emivita plasmatica del paracetamolo non aumenta in pazienti con funzionalità renale compromessa, non vi è tuttavia un accumulo di metaboliti coniugati (Prescott LF, 1980).

### **3.3 Tossicocinetica**

Il metabolismo del paracetamolo è stato confrontato tra soggetti adulti sani, trattati con una dose orale di 20 mg / kg, e pazienti con avvelenamento da paracetamolo, che avevano ricevuto trattamenti

diversi (Prescott LF et al., 1979). Le concentrazioni plasmatiche e urinarie di paracetamolo e i suoi metaboliti sono stati misurati con cromatografia liquida ad alte prestazioni (Adriaenssens PI e Prescott LF, 1978); la dose di 20 mg / kg è stata rapidamente assorbita e dopo 3 ore le concentrazioni plasmatiche del glucuronide superavano quelle del farmaco progenitore. Una simile relazione tra la concentrazione plasmatica del paracetamolo e del suo glucuronide si è riscontrata anche nei pazienti con avvelenamento da paracetamolo senza danno epatico; in coloro, invece, che sviluppavano epatotossicità in seguito a sovradosaggio (transaminasi > 1.000 UI / l), il metabolismo del paracetamolo era compromesso, la sua emivita prolungata e le concentrazioni di glucuronide erano inferiori a quelli del farmaco immodificato. La compromissione della coniugazione con glucuronide sembra quindi dipendere solo dall'entità del danno epatico, mentre è indipendente dal trattamento (tranne nel caso in cui un trattamento precoce prevenga danni al fegato).

La coniugazione con solfato si satura negli adulti nell'ambito dell'intervallo terapeutico (Levy G e Yamada H, 1971): dopo una dose di 20 mg / kg, la concentrazione plasmatica massima media del paracetamolo solfato è di circa 5 mg / ml e le concentrazioni sono solo leggermente più alte nei pazienti con sovradosaggio non trattati. Tuttavia, nei pazienti che ricevono un tempestivo trattamento con N-acetilcisteina, si riscontra un marcato aumento delle concentrazioni plasmatiche del metabolita solfato. Tutto ciò depone a favore di una saturazione della coniugazione del solfato e a un esaurimento di solfato inorganico in caso di elevate dosi di paracetamolo. Un aumento della disponibilità di solfato si ha, invece, a seguito del trattamento con N-acetilcisteina. Nei pazienti avvelenati solo il 10-12% viene escreto come solfato, mentre vi è un aumento dell'escrezione di glucuronide e del farmaco immodificato (Prescott LF, 1980).

### **3.4 Farmacodinamica**

Il paracetamolo è usato in tutto il mondo per le sue azioni analgesiche e antipiretiche. Ha uno spettro di azione simile a quello dei FANS e ricorda in particolare gli inibitori selettivi della COX-2; esso è, in media, un analgesico più debole rispetto ai FANS o agli inibitori selettivi della COX-2, ma è spesso preferito a grazie ai suoi minori effetti avversi. Nonostante le somiglianze con i FANS, la modalità di azione del paracetamolo non è stata completamente chiarita, per quanto ora sia generalmente accettato che inibisce COX-1 e COX-2 attraverso il metabolismo della funzione di perossidasi di questi isoenzimi; ciò si traduce nell'inibizione della formazione di radicali di fenossile da un residuo di tirosina, essenziale per l'attività della cicloossigenasi di COX-1 e COX-2 e la sintesi delle prostaglandine (PG). Il paracetamolo mostra selettività per l'inibizione della sintesi di PG e dei fattori correlati quando sono disponibili bassi livelli di acido arachidonico e perossidi ma, al contrario, ha poca attività a livelli elevati di acido arachidonico e perossidi. Il risultato, quindi, è che il paracetamolo non sopprime la grave infiammazione dell'artrite reumatoide e della

gotta acuta, ad es., ma inibisce piuttosto la più lieve infiammazione risultante dall'estrazione dentaria ed è inoltre attivo in una varietà di test infiammatori negli animali da esperimento.

La blanda selettività COX-2 del paracetamolo è dimostrata dalla sua scarsa attività anti-piastrinica e dalla buona tolleranza gastrointestinale. A differenza dei FANS non selettivi e degli inibitori selettivi della COX-2, il paracetamolo inibisce altri enzimi perossidasi, compresa la mieloperossidasi: l'inibizione della mieloperossidasi comporta l'ossidazione del paracetamolo e la concomitante riduzione della formazione di ossidanti alogenanti (ad es., acido ipocloroso e acido ipobromoso), che può essere associata a varie patologie infiammatorie tra cui l'aterosclerosi e le malattie reumatiche. Il paracetamolo può quindi rallentare lo sviluppo di queste malattie.

Paracetamolo, FANS e inibitori selettivi della COX-2 hanno tutti effetti centrali e periferici. Come nel caso dei FANS, inclusi gli inibitori selettivi della COX-2, gli effetti analgesici del paracetamolo sono ridotti dagli inibitori di molti sistemi di neurotrasmettitori endogeni, compresi i sistemi serotoninergico, oppioide e cannabinoide (Graham GG et al., 2013).

### **3.5 Impiego clinico**

Il paracetamolo è usato come antipiretico nel trattamento sintomatico di affezioni febbrili quali l'influenza, le malattie esantematiche, le affezioni acute del tratto respiratorio, etc. e come analgesico in caso di cefalee, nevralgie, mialgie, odontalgie ed altre manifestazioni dolorose di varia origine.

Il paracetamolo rientra, come agente terapeutico da usare in combinazione con altri farmaci, in tutti e tre i gradini della scala dell'OMS per l'applicazione dei farmaci analgesici.

Inoltre, è il farmaco di scelta nei pazienti in cui l'applicazione di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) è controindicata, come nel caso di ulcere gastriche, ipersensibilità all'aspirina, alterazioni della coagulazione del sangue, nelle donne in gravidanza, in allattamento e nei bambini con febbre (Jòzwiak-Bebenista M e Nowak JZ, 2014).

È disponibile in molteplici formulazioni tra cui compresse, sospensioni e supposte rettali, da solo o in coformulazioni con altri principi attivi come caffeina, antistaminici etc. La formulazione per via endovenosa può essere utilizzata a breve termine per alleviare il dolore di intensità da lieve a moderata.

### **3.5.1. Epidemiologia**

In un recente studio sono stati raccolti i dati relativi al consumo di paracetamolo in alcuni paesi europei tra il 2005 il 2007: ne è risultato che le quantità di paracetamolo, espresse in tonnellate, sono state maggiori per Francia-10043.2 (Popolazione 60 milioni di abitanti ca.), Irlanda-289.6 (Popolazione 4 milioni di abitanti ca.), Italia-1074.4 (Popolazione 60 milioni di abitanti ca.), Olanda-557.6 (Popolazione 16milioni di abitanti ca.), Regno Unito-6286.5 (Popolazione 60 milioni di abitanti ca.), Grecia-161.5 (Popolazione 10 milioni di abitanti ca), Portogallo-118.1 (Popolazione 11 milioni di abitanti ca.) (Gulmez SE et al., 2015).

### **3.5.2. Gravidanza**

Il paracetamolo viene somministrato alle donne in gravidanza sia come agente antipiretico sia per la gestione del dolore da lieve a moderato. La presunta sicurezza di questo agente ha portato il paracetamolo a diventare una delle prescrizioni più comuni in gravidanza: circa il 50-60% delle donne in stato di gravidanza nell'Europa settentrionale e occidentale riferiscono di utilizzare questo farmaco (Lupattelli A, et l., 2014).

La sua popolarità è dovuta principalmente alla predilezione di prescrizione del paracetamolo rispetto ad altri analgesici, come i FANS che presentano un profilo di rischio meno favorevole nelle donne in gravidanza e come l'aspirina, il cui impiego viene limitato per i suoi possibili effetti sul feto (Burdan F et al., 2012; Collins E 1981).

Negli ultimi anni, la sicurezza del paracetamolo in gravidanza è stata sottoposta a un controllo crescente. Il paracetamolo e i suoi metaboliti attraversano infatti la placenta (Levy G et al., 1975) e subiscono processi di farmacocinetica e farmacodinamica diversi nei neonati rispetto agli adulti: un sistema di glucuronidazione immaturo rende il processo di solfatazione la principale via del metabolismo nei neonati (Pacifci GM e Allegaert K 2015).

Il paracetamolo è stato incriminato di causare una vasta gamma di effetti avversi embrio-fetali e neonatali, dipendenti dalla dose, dalla durata del trattamento e dal trimestre di esposizione; tuttavia, ampi studi non hanno riscontrato un'associazione tra l'uso di paracetamolo materno nel primo trimestre e gli esiti negativi della gravidanza o le malformazioni congenite (Rebordosa C et al., 2008; Rebordosa C et al., 2009; McCrae JC et al., 2018).

D'altro canto, nell'eventualità di sovradosaggio o di uso prolungato di alte dosi terapeutiche è possibile che il paracetamolo sia causa di tossicità epatica fetale (Cleves MA et al. 2004), di effetti avversi respiratori (Persky V et al., 2008), o di aborto spontaneo (Li DK et al., 2003).

L'impatto del paracetamolo assunto in epoca prenatale sul futuro sviluppo neuronale e sul comportamento dei futuri nascituri è attualmente molto discusso, ma sulla base dei recenti studi sono emerse solo deboli associazioni tra esposizione al paracetamolo e problemi di sviluppo neurologico, cosicché non è possibile identificare alcun nesso causale (McCrae JC et al., 2018).

In merito alle conseguenze respiratorie sul nascituro, numerosi report hanno suggerito un nesso causale tra l'assunzione di paracetamolo durante la gravidanza e lo sviluppo di asma. Tuttavia, i lavori riportano epoche gestazionali critiche differenti ed età di presentazione della patologia variabile (Rebordosa et al., 2008, Shaheen et al., 2002, Magnus et al., 2016, Cheelo et al., 2015). In definitiva, le conclusioni sull'associazione tra paracetamolo e rischio di asma infantile variano tra gli studi e mancano approfondimenti specifici sulla causalità, ad es. su una possibile alterazione dell'ontogenesi su base immunitaria in risposta al paracetamolo (Cheelo et al., 2015). Sembra, inoltre, che in parte della popolazione studiata il paracetamolo fosse associato alla presenza di episodi infettivi nelle donne incinta, fattore che costituisce un importante fonte di bias (Hughes CH et al., 1999; Xu B et al., 1999; Bremer L et al., 2017).

Diversi studi clinici associano l'esposizione al paracetamolo durante la gravidanza a un aumento della presenza di criptorchidismo, in particolare se usato per oltre 2 settimane nel secondo trimestre (Rebordosa et al., 2008; Snijder CA, 2012). L'incidenza del criptorchidismo è particolarmente preoccupante, basti pensare alla sua associazione con disturbi nella età adulta come il basso numero di spermatozoi e il cancro testicolare (Virtanen HE e Toppari J, 2008).

Di contro, ampi studi di coorte non hanno identificato alcuna associazione tra paracetamolo e criptorchidismo (Correy JF et al., 1991; Feldkamp ML et al., 2010; Wagner-Mahler K et al., 2011).

In considerazione della scarsa conclusività e omogeneità degli studi sugli effetti negativi del paracetamolo durante la gravidanza occorre prestare particolare attenzione nel trattamento, per evitare di sollevare preoccupazioni poco fondate tra le donne in gravidanza, spesso causa del passaggio autonomo ad altri farmaci analgesici / antipiretici con profili di rischio meno favorevoli. La febbre non trattata è infatti associata a danni spesso più gravi sia per la madre che per il bambino, esponendoli a un rischio molto maggiore di quello postulato per l'assunzione di paracetamolo (Miller JE et al., 2013). Un consiglio pratico sarebbe quello di evitare l'uso prolungato del paracetamolo per le malattie non febbrili.

### 3.5.3. Effetti avversi

Il paracetamolo, seppur considerato più sicuro rispetto ai farmaci con analoghe proprietà antipiretiche e analgesiche, come gli antiinfiammatori non steroidei, non è scevro da effetti collaterali.

Effetti avversi comuni:

- dermatologici: prurito (5% o superiore)
- gastrointestinali: costipazione (5% o superiore), nausea (adulto 34%, pediatrico 5% o superiore), vomito (adulto 15%, pediatrico 5% o superiore)
- neurologici: cefalea (dall'1% al 10%), insonnia (dall'1% al 7%)
- psichiatrici: agitazione (5% o maggiore)
- respiratori: atelettasia (5% o superiore)

Effetti avversi gravi:

- dermatologici: pustolosi esantematica generalizzata acuta, sindrome di Stevens-Johnson, necrosi epidermica tossica
- epatici: insufficienza epatica
- respiratori: polmonite

Sono state segnalate reazioni anafilattiche e di ipersensibilità, in alcuni casi pericolose per la vita; in questo caso è consigliata una sospensione immediata del trattamento.

Il farmaco è controindicato in:

- malattia epatica attiva e grave
- ipersensibilità al paracetamolo o ad altri componenti del prodotto
- grave insufficienza epatica

Particolari precauzioni d'uso sono necessarie in caso di fattori che possono aumentare il rischio di danno epatico come l'alcolismo, una malattia epatica attiva o insufficienza epatica, grave ipovolemia, malnutrizione e grave insufficienza renale. In tutte queste condizioni potrebbe essere necessaria una riduzione del dosaggio (Product Information: OFIRMEV® 2013).

Una notevole incertezza riguarda gli effetti avversi da uso cronico di paracetamolo. Le associazioni positive trovate nei vari studi sono generalmente deboli e spesso contraddittorie, pochi studi clinici randomizzati e controllati sono stati eseguiti in merito, ma questi hanno di solito fornito risultati rassicuranti.

Le due aree in cui si hanno prove sicure di un'associazione tra uso prolungato di paracetamolo ed effetti avversi sono l'ipertensione e il sanguinamento gastrointestinale: la prima può essere particolarmente importante nei pazienti con angina o ipertensione preesistente, mentre la seconda riguarda l'evidenza abbastanza consistente di emorragia gastrointestinale associata all'uso di paracetamolo, insieme al suo effetto additivo combinato con i FANS.

Possibili alternative al trattamento con paracetamolo potrebbero essere cercate nei FANS oppure negli oppioidi; in pazienti allergici ai FANS rimarrebbero dunque solo gli oppioidi, che comportano però alti rischi di dipendenza, sonnolenza e di overdose accidentale.

Per concludere, l'effetto terapeutico medio per le sindromi dolorose croniche è basso, ma di contro vi sono evidenze cumulative di effetti avversi clinicamente significativi nell'uso cronico. Nonostante questo, per i pazienti che traggono evidenti benefici e assumono solo occasionalmente dosi terapeutiche, i rischi probabilmente sono molto piccoli (McCrae JC et al., 2018).

#### **4. Epatotossicità da paracetamolo**

La tossicità degli analgesici da banco (OTC) iniziò a essere notata già a partire dalla seconda metà del XX secolo, ad es. di farmaci quali l'acetanidile e la fenacetina, dannosi anche se assunti in dosi normali; in questa classe di farmaci, uno dei pochi considerati sicuri fu il paracetamolo, se assunto entro i limiti di un dosaggio normale (Sheen CL et al., 2002).

Al tempo vi erano scarsissime segnalazioni di abuso riguardanti il paracetamolo, ma gradualmente l'uso di questo farmaco aumentò proprio in virtù del suo minor grado di tossicità, sostituendo gli analgesici più tossici al momento disponibili, come quelli precedentemente citati (Prescott LF, 1996).

Da notare che allora, prima della sua introduzione in commercio, il paracetamolo non venne sottoposto ai moderni rigorosi test di tossicità, e fu solo dal 1966 che la sua epatotossicità venne segnalata per la prima volta nell'uomo (Thomson JS et al., 1966; Davidson DGD et al., 1966).

Con il passare dei decenni, il consumo di paracetamolo è andato sempre più a incrementarsi in tutto il mondo: nei paesi industrializzati, l'uso è aumentato di cinque volte tra il 1978 e il 1988, mentre nel 1994/95 le percentuali erano di 8 g / persona / anno, in paesi come il Regno Unito, gli Stati Uniti, il Canada,

l'Australia e la Nuova Zelanda si calcolava addirittura un consumo di 20 g / persona / anno (Turvill JL et al., 2000). Per avere una stima di questo fenomeno, è utile far riferimento alle statistiche del Regno Unito, dove il consumo è aumentato da 1500 milioni di compresse da 500 mg all'anno nel 1967/68 a 4000 milioni di compresse nel 1993/94 (Spooner JB et al., 1976); una valutazione più recente del consumo, che include sia il paracetamolo prescritto come singola molecola, sia le formulazioni in associazione con altri principi attivi e sia il paracetamolo acquistato senza prescrizione medica, è quella di 3500 milioni di compresse da 500 mg relativa all'anno 2000 (Sheen CL et al., 2002).

## 4.2 Epidemiologia

I ricoveri ospedalieri dovuti ad avvelenamento da paracetamolo hanno cominciato a presentarsi intorno agli anni '60 (Meredith TJ et al., 1981). Nel Regno Unito, a partire dalla metà degli anni settanta, è stato registrato un progressivo aumento del numero di sovradosaggi da paracetamolo, incremento che ormai ha condotto tale farmaco a diventare la sostanza usata più frequentemente nelle overdose volontarie a scopo autolesivo; a Oxford, ad es., la percentuale di sovradosaggio da paracetamolo è aumentata dal 14,3% nel 1976 al 42% nel 1990, culminando nel 1993 quando il 47,8% di tutte le overdose riguardava farmaci contenenti paracetamolo (Hawton K et al., 1992; Hawton K et al., 1996). In Scozia, parimenti, il tasso di sovradosaggio da paracetamolo è aumentato quasi del 400% tra il 1981-83 e il 1991-93, mostrandosi più alto nelle aree più svantaggiate (McLoone P et al., 1996; Smith T et al., 1995).

Nel tempo questo andamento si è diffuso in altri paesi come Danimarca e Australia (Ott P et al., 1990; Gow PJ et al., 1999). Uno studio effettuato in un ospedale dell'Australia occidentale tra il 1985 e il 1990 ha riscontrato 306 ricoveri per overdose da paracetamolo: una epatotossicità grave si è verificata nel 6,9% dei casi, tutti i pazienti hanno comunque presentato un buon recupero con terapia antidotale e di supporto e nessun paziente ha richiesto un trapianto di fegato (Brotodihardjo AE et al., 1992). Di contro, tra i casi di uno studio su pazienti ammessi nelle unità di Epatologia del Regno Unito tra il 1987 e il 1993 con una diagnosi di epatite acuta a causa di avvelenamento da paracetamolo, il 30% soddisfaceva i criteri clinici per il trapianto di fegato (Makin AJ et al., 1995): i pazienti con esiti peggiori furono quelli che si presentarono più tardi all'ospedale e che avevano assunto un dosaggio maggiore rispetto agli altri (Gow PJ et al., 1999; Makin AJ et al., 1995)

Nel 1977, in Inghilterra e Galles 144 decessi vennero attribuiti al paracetamolo (Meredith TJ et al., 1981; Sheen CL et al., 2002). Tra il 1993 e il 1997, i morti attribuibili a farmaci contenenti paracetamolo erano

aumentati a circa 500 per anno (Atcha Z et al., 2000) Per avere una misura di paragone si consideri che, durante tale arco temporale, il numero medio annuo di morti per incidenti stradali fu di 3291.

Come misura preventiva, nel 1998 l'Agenzia di Regolamentazione dei Medicinali e dei Prodotti Sanitari del Regno Unito (MHRA) stabilì che le confezioni di paracetamolo in vendita nel paese senza prescrizione medica fossero limitate a 16 g (32 compresse) in farmacia e 8 g (16 compresse) in altri punti vendita, mentre tutte le compresse dovevano essere confezionate singolarmente in contenitori di alluminio (blisters) (Bateman DN, 2014).

Secondo i risultati di uno studio prospettico l'epatotossicità in seguito a sovradosaggio da paracetamolo contribuisce a circa il 50% dei casi di insufficienza epatica acuta negli Stati Uniti e nel Regno Unito, con 200 morti / anno nel solo Regno Unito ed è una componente nel 40% degli 80.000 accessi per avvelenamento negli ospedali del Regno Unito (Ostapowicz G et al., 2002).

Il paracetamolo rimane comunque la causa predominante di trapianto di fegato in caso di overdose acuta da farmaci anche in altri paesi europei come Francia, Grecia, Italia, Paesi Bassi e Portogallo, con una media di un caso ogni sei milioni di abitanti all'anno, dato che sembra essere circa otto volte inferiore rispetto ai numeri riportati negli Stati Uniti. Inoltre, esistono grandi differenze tra i paesi europei, con un rischio sei volte più elevato in Irlanda e un rischio due volte maggiore nel Regno Unito rispetto alla media degli altri paesi (Tittarelli et al., 2017).

In almeno cinque dei sei paesi (Belgio, Francia, Finlandia, Germania, Svezia e Svizzera) dove la vendita del paracetamolo è limitata alle farmacie e la quantità di compresse per confezione è minore, non si registrano evidenze così chiare del ruolo centrale del paracetamolo nelle suddette overdosi a scopo autolesivo. È la Svezia a discostarsi da questa tendenza generale.

In Italia, per quanto riguarda l'overdose da paracetamolo, non vi sono chiari statistiche riportate nelle banche dati di farmacovigilanza e manca una letteratura approfondita relativa agli studi epidemiologici; tale carenza, probabilmente, è legata alla bassa incidenza di questa tipologia di sovradosaggio nel nostro paese. Una stima del fenomeno può essere proposta dall'analisi del database del Centro Anti Veleni nazionale della AOU Careggi, Firenze, in cui sono riportati 1.212 casi di sovradosaggio da paracetamolo nel decennio 2010-2019. Tra questi, soltanto il 26% (n= 323 pazienti) erano dovuti ad overdose volontarie mentre i restanti casi erano attribuibili ad errori terapeutici.

### 4.3 Tipologie di sovradosaggio

La dose raccomandata di paracetamolo per un paziente adulto è di 3 g (o 50 mg/kg) nelle 24 ore e qualsiasi ingestione eccedente tale dosaggio è da considerarsi una *overdose*.

Sebbene la causa principale di avvelenamento da paracetamolo sia intenzionale, ovvero dovuto alla volontà manifesta di assumere dosi sovrat terapeutiche con intenzione autolesiva, un'ulteriore percentuale di pazienti presenta tossicità causata da dosaggi scorretti assunti con intento terapeutico oppure a causa di sovradosaggio accidentale.

Dal punto di vista medico, dunque, il sovradosaggio di paracetamolo si può suddividere in intenzionale e non intenzionale:

- per sovradosaggio *intenzionale* o *volontario* si intende l'assunzione di una dose cumulativa di paracetamolo superiore alla dose raccomandata giornaliera, con scopo autolesivo;
- il sovradosaggio *non intenzionale* o *involontario* è definito, invece, come l'assunzione di paracetamolo in dosi sovra terapeutiche in assenza dello scopo anticonservativo; per quanto riguarda questo tipo di sovradosaggi, essi possono essere dovuti ad utilizzo del farmaco al di fuori delle indicazioni mediche nel tentativo di sfruttare le proprietà terapeutiche dello stesso (per es. in caso di trattamento di odontalgia), oppure ad errore terapeutico come nella somministrazione di un'errata posologia a causa di un calcolo inesatto della stessa (maggiormente per formulazioni liquide pediatriche). Anche in questo caso possono essere inquadrati come sovradosaggi acuti o cronici.

Il sovradosaggio viene inoltre distinto in acuto/singolo e cronico/frazionato:

- per sovradosaggio *acuto/singolo* si intende l'assunzione di un dosaggio superiore ai 4 gr/die o 75 mg /kg/die, avvenuto in un singolo spazio temporale, entro un periodo di 1 ora (alcuni autori usano il limite di dosaggio di 150 mg/die e temporale di 4 o 8 ore) (Craig DG et al., 1996);
- il sovradosaggio *cronico/frazionato* si riferisce invece all'ingestione di due o più dosi sovra terapeutiche di paracetamolo avvenute in un intervallo di tempo compreso tra 1 ora e 8 ore (Dart RC et al., 2006).

#### **4.3.1 Sovradosaggio non intenzionale: errore o eccesso terapeutico**

Nei bambini di età inferiore ai 5 anni, l'ingestione di sostanze tossiche è quasi costantemente non intenzionale ed è di solito dovuta a sostanze chimiche, spesso farmaci, che appartengono ad altri membri della famiglia (Goepf JG 1996); da uno studio retrospettivo statunitense, condotto negli anni tra il 1988 e il 1997, è emerso che il 53% dei bambini di età inferiore ai 18 anni si era presentato in ospedale per ingestione non intenzionale e il 3% con tossicità a causa di errore nella somministrazione della dose. L'ingestione involontaria è più frequente nei bambini piccoli, da 2 mesi a 13 anni, mentre il sovradosaggio intenzionale è maggiore negli adolescenti, con prevalenza del sesso femminile.

In un altro studio americano, il 30% delle ospedalizzazioni per sovradosaggio da paracetamolo era da attribuire a causa accidentale: la dose assunta era metà di quella utilizzata nei casi di suicidio, ma oltre la metà dei pazienti si presentava più di 24 ore dopo l'ingestione. Nello stesso studio venne notato che i pazienti con avvelenamento accidentale presentavano un'incidenza più elevata di coma epatico e morte, rimanendo ricoverati più a lungo in ospedale (Schiodt FV et al., 1997; Sheen CL et al., 2002).

Da un recente report del 2018, che ha analizzato gli accessi per sovradosaggio da paracetamolo presso il Royal Infirmary di Edimburgo, è emerso che il 14% di essi fossero dovuti a sovradosaggio involontario. Le ragioni per l'uso di paracetamolo erano: dolore dentale (40% del totale delle overdosi non intenzionali); dolore muscoloscheletrico (22%); dolore addominale (12%); altro dolore (12%); sintomi virali (10%). Le motivazioni per cui si fosse ecceduto rispetto alla dose raccomandata erano varie: mancanza di consapevolezza dei possibili danni causati da un sovradosaggio (42%); non conoscenza che alcuni prodotti contenessero paracetamolo tra i principi attivi (32%); ignoranza in merito alla dose raccomandata (20%) e/o della posologia massima da assumere nelle 24 ore (15%) (Pettie JM et al. 2018). Nel Regno Unito, solo l'8% dei pazienti con insufficienza epatica acuta ha dichiarato di aver assunto una dose eccessiva del farmaco e la maggior parte di essi si era presentata all'ospedale solo 24 ore dopo l'evento (Makin AJ et al., 1997).

La differenza tra Regno Unito e USA, come anche tra altri paesi, è difficile da spiegare, ma può essere dovuta a problemi culturali, diversa assistenza sanitaria e dislivelli economici tra i due paesi (Sheen CL et al. 2002).

#### 4.3.2 Tentativi suicidari: perché il paracetamolo?

Alcuni studi documentano che nei paesi anglofoni (Regno Unito e USA) il paracetamolo sia stato il farmaco più frequentemente usato da chi decideva di assumere un sovradosaggio intenzionale nel 1911 e come lo sia anche ai tempi odierni; nonostante ciò, esso è responsabile di solo lo 0,1% di tutte le morti negli Stati Uniti, percentuale che indica la scarsa efficacia del paracetamolo come farmaco autolesivo (Zed PJ e Krenzelok EP 1999).

Nei paesi anglosassoni il paracetamolo può essere liberamente acquistato nelle farmacie e nei supermercati senza il bisogno di una prescrizione medica; anche in Svezia, ad es., è stato rilevato un incremento dei sovradosaggi che corre parallelo all'incremento delle vendite di paracetamolo (Carlsten A et al., 1996), e un altro studio ha mostrato un rapporto tra il tasso di vendita di paracetamolo e il numero di sovradosaggi in Francia e nel Regno Unito (Gunnell D et al., 1997; Sheen CI et al 2002).

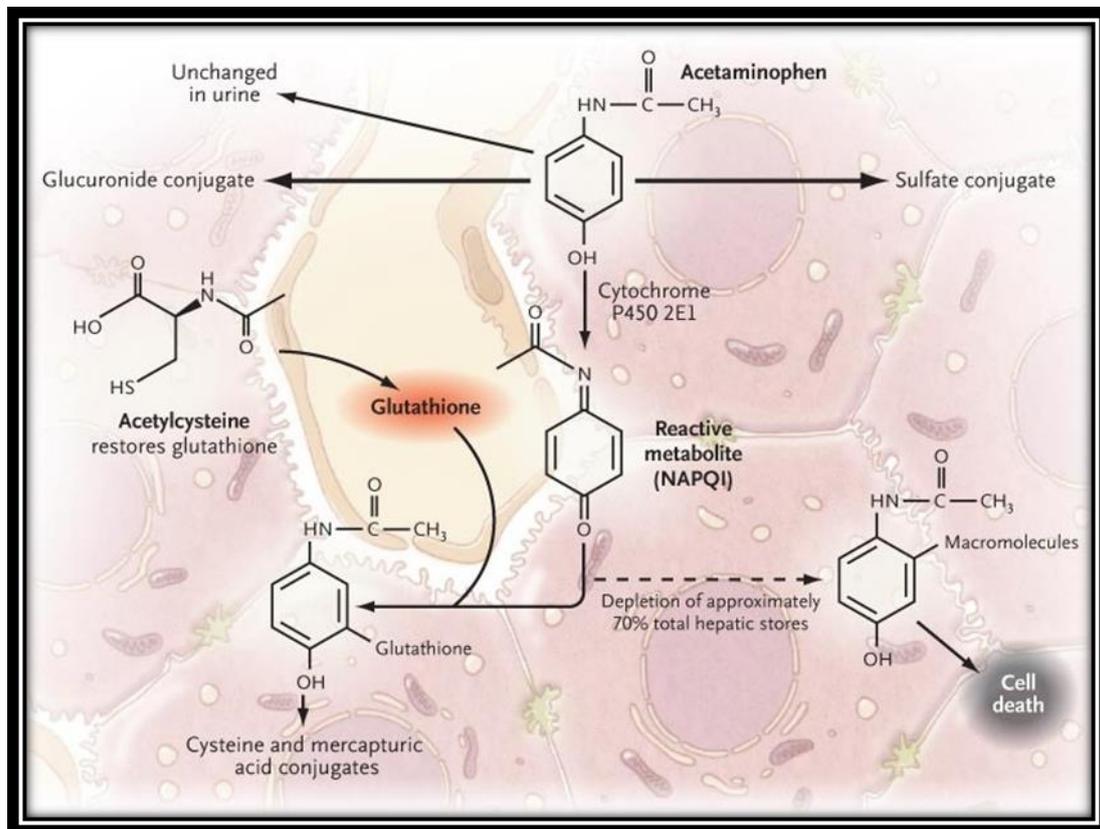
Considerata proprio questa disponibilità del paracetamolo come farmaco da banco, la consapevolezza del pubblico sul rischio di sovradosaggio e sui suoi effetti è sempre stata scarsa: nel 1976, da alcune indagini emerse che i pazienti non erano affatto a conoscenza che vi fosse un ritardo di diversi giorni prima dell'inizio dei sintomi gravi e gli autori dello studio scoprirono che, se ne fossero stati informati, non l'avrebbero usato (Gazzard BG et al., 1976). Un secondo studio dei primi anni '90 accertò che una buona parte dei pazienti riconosceva al paracetamolo effetti dannosi e mortali, ma ancora una volta la maggior parte di essi non era a conoscenza del ritardo di insorgenza dei danni più gravi: molti pensavano che il sovradosaggio avrebbe provocato perdita di coscienza. Questo studio confermò, inoltre, che le persone assumevano il paracetamolo perché era facilmente reperibile ed economico (Hawton K et al., 1995; Ware C 1995).

Nel Regno Unito, gli adolescenti di età compresa tra i 12 e i 19 anni erano consapevoli che il paracetamolo poteva essere mortale, ma la dose creduta tossica era sottostimata in oltre la metà di essi (Gilbertson RJ et al., 1996); sembra, infatti, che nei paesi anglosassoni sia stata fatta una campagna di informazione alla popolazione circa il rischio di morte per overdose da paracetamolo, ma non sul modo subdolo con cui si manifesta.

A conferma del ruolo dei *mass-media* nella sensibilizzazione della popolazione in questo campo, è stato osservato anche l'effetto opposto, ovvero che servizi televisivi relativi a overdose da paracetamolo possono causare un transitorio aumento dei tentativi di suicidio per un meccanismo di emulazione (Hawton K et al., 1999; Sheen et al., 2002).

#### 4.4 Eziopatogenesi

Per quanto riguarda l'eziopatogenesi della tossicità da paracetamolo, non è il farmaco stesso che causa epatotossicità, piuttosto un suo metabolita reattivo. Quando preso ai dosaggi raccomandati, l'85-90% del paracetamolo viene metabolizzato mediante glucuronidazione o solfatazione e poi escreto nell'urina, il 2% viene escreto nelle urine invariato e una parte <10% viene metabolizzata dal sistema del citocromo p450 (principalmente CYP2E1) nel metabolita reattivo N-acetil-p-benzochinone imina (NAPQI); in circostanze normali, il NAPQI viene rapidamente convertito in metaboliti non tossici dal glutathione (GSH). Tuttavia, in situazioni di esaurimento del GSH come in caso di overdose da paracetamolo, alcolismo e malnutrizione, il NAPQI non viene inattivato e porta così al danno epatico (Jaeschke et al. 2012; Bunchorntavakul e Reddy 2013). **Figura 12**



**Figura 12.** Metabolismo del paracetamolo (modificata da Kennon J. Heard, M.D. 2008)

I principali meccanismi con cui si pensa che il NAPQI possa causare lesioni epatiche includono la formazione di addotti di proteine, reagendo con i gruppi sulfidrilici che portano alla disfunzione mitocondriale e morte cellulare, così come alla modulazione del sistema immunitario innato del fegato (Jaeschke et al., 2012). La

disfunzione mitocondriale osservata nella epatotossicità da paracetamolo è dovuta alla frammentazione della membrana del mitocondrio e alla conseguente cessazione della produzione di ATP. Nei mitocondri la formazione di addotti proteici con NAPQI causa stress ossidativo e produzione di specie reattive dell'ossigeno: questo porta al danno del DNA mitocondriale, con apertura dei pori di permeabilità transiente (MPT) e cessazione della produzione di ATP. Inoltre, attraverso meccanismi ancora non completamente chiariti, c'è una traslocazione precoce della proteina di membrana BAX, che si combina con BAK a livello della membrana esterna del mitocondrio per formare pori e consentire il rilascio di proteine come il citocromo c; uno studio recente in modelli murini suggerisce che il NAPQI causi inibizione selettiva del complesso mitocondriale II e che la somministrazione di blu di metilene possa proteggere dal danno mitocondriale agendo come trasportatore alternativo di elettroni e trasferendo elettroni dal complesso I danneggiato al citocromo c, con ripristino della produzione di ATP (Lee et al., 2014). In definitiva, il rilascio di proteine mitocondriali e la cessazione della produzione di ATP conducono alla morte cellulare (Jaeschke et al., 2012).

L'alterazione della risposta immunitaria innata e la presenza di infiammazione sterile a livello del fegato svolgono un ruolo significativo nella progressione dell' insufficienza epatica dopo sovradosaggio da paracetamolo; la precoce morte cellulare dovuta al danno mitocondriale causa il rilascio di varie specie molecolari associate al danno (DAMPs), compresi frammenti di DNA, *heat shock proteins* (HSP) e la *high mobility group box 1* (HMGB1) che successivamente attivano i recettori *toll-like* (TLR) sulle cellule di Kupffer. Le cellule di Kupffer attivate rilasciano citochine e chemochine che reclutano neutrofili e monociti causando lesioni cellulari. Si pensa che sia l'azione diretta di citochine e chemochine, piuttosto che quella di cellule infiammatorie, a causare le lesioni cellulari alterando i meccanismi intracellulari all'interno degli epatociti. Queste azioni intracellulari comprendono l'induzione dell'ossido nitrico (NO) sintasi e l'espressione di proteine di fase acuta tali come HSP ed eme ossigenasi-1. Le prove attuali supportano l'ipotesi che l'infiammazione sterile all'interno del fegato svolga un ruolo benefico rimuovendo i detriti e promuovendo proliferazione e riparazione degli epatociti (Jaeschke et al., 2012).

Se il meccanismo primario di morte cellulare nell'insufficienza epatica da paracetamolo sia dovuto ad apoptosi o necrosi, è ancora dibattuto. Gli studi sugli animali avevano precedentemente suggerito che il principale meccanismo di morte cellulare fosse l'esaurimento dell'ATP intracellulare, ma uno studio più recente ha dimostrato un incremento dei marcatori sierici dell'apoptosi (*caspase cleaved* CK-18, definito anche come M30). Inoltre, sembra che elevati livelli di CK-18 possano predire la progressione del danno verso la necessità di trapianto epatico o morte, con sensibilità del 89% e specificità del 69%, suggerendo un ruolo importante dell'apoptosi nella progressione dell'insufficienza epatica acuta in caso di overdose da paracetamolo. (Possamai et al., 2013; Lancaster EM et al., 2015).

Pur essendo il fegato l'organo bersaglio, anche il rene, il pancreas ed il cuore possono essere coinvolti nell'intossicazione. Il danno renale (necrosi tubulare prossimale, ischemia midollare) che accompagna il 25% dei casi di grave epatite tossica da paracetamolo, sembra mediato almeno in parte da un meccanismo simile a quello che causa il danno epatico (formazione di NAPQI da parte della prostaglandino-sintetasi renale). Il danno miocardico, riportato in alcuni casi di epatite fulminante da paracetamolo, sembra inquadrabile più nell'ambito di un'insufficienza multi-organo che può dipendere da un effetto tossico diretto del farmaco (Hendrickson RG e Bizovi KE 2006).

#### **4.5 Peculiarità nei bambini**

È importante sottolineare che la farmacocinetica e la farmacodinamica del paracetamolo nei neonati e nei bambini sotto i 5 anni differiscono sostanzialmente da quelle dei bambini più grandi e degli adulti. Nonostante le ridotte velocità del metabolismo dell'enzima CYP2E1 P450 e l'aumentata capacità di sintetizzare il glutatione che fornisce una maggiore resistenza dopo il sovradosaggio, è possibile produrre metaboliti epatotossici (N-acetil-p-benzochinone) che causano danno epatico quando le riserve di glutatione vengono esaurite. La clearance del paracetamolo è ridotta e l'emivita dell'eliminazione è prolungata. Pertanto, un particolare regime di dosaggio deve essere seguito in considerazione del rischio di tossicità dovuta a dosi cumulative.

Per quanto i bambini siano più esposti a un sovradosaggio di paracetamolo, esposizioni tossiche sono rare nei neonati, benchè queste possano verificarsi attraverso la placenta a causa di un sovradosaggio intenzionale da parte delle madri nelle ore precedenti al parto (Lederman S et al., 1983), per errori di dosaggio orale (Isbister GK et al., 2001) o endovenoso nell'ordine di 10 volte la dose terapeutica o, infine, a causa di dosi ripetute per via orale (Walls L et al., 2007; Tittarelli M et al., 2017).

#### **4.6 Categorie di soggetti a rischio aumentato**

Poiché non tutti gli individui con overdose da paracetamolo progrediscono verso un danno acuto d'organo, una significativa area di studio è l'identificazione dei fattori di rischio di epatotossicità in questi pazienti: la malnutrizione, il digiuno e le malattie croniche del fegato sono tutti fattori di rischio noti per aumentare l'epatotossicità a causa delle diminuite riserve di glutatione. Inoltre, anche i farmaci che inducono il sistema CYP 450 o interferiscono con la lesione epatica e i meccanismi di riparazione possono esporre il paziente ad un maggiore rischio di epatotossicità (Lancaster EM et al., 2015).

I farmaci che inducono il CYP450 comunemente usati comprendono l'isoniazide, la rifampicina e il fenobarbital, ma anche l'uso cronico di alcool induce il sistema CYP450, portando a un aumento della produzione di NAPQI. In uno studio su oltre 6.000 pazienti con danno epatico associato a paracetamolo, farmaci come i fibrati, gli anti-infiammatori non steroidei (FANS) e l'alcool erano associati a una maggiore incidenza di morte. Le statine erano messe in relazione a una diminuzione dell'incidenza della morte negli uomini, ma a un aumento della mortalità nelle donne (Suzuki et al., 2009).

Tra le diverse tipologie di sovradosaggio da paracetamolo, quello involontario è apparso come fattore di rischio per epatotossicità, rispetto al sovradosaggio intenzionale (Myers et al., 2008). Riflettendo sulla crescente incidenza di fegato steatosico non alcolico (NAFLD) negli Stati Uniti e sulla nota associazione tra malattia epatica sottostante e epatotossicità da paracetamolo, studi recenti si sono concentrati sulla determinazione del ruolo dell'obesità e della NAFLD in associazione con il danno epatico indotto da paracetamolo: i tassi di NAFLD negli USA hanno superato il 20% negli adulti e il 10% nei bambini e negli adolescenti, con progressione verso la steatoepatite non alcolica nel 10-20% dei casi. Mentre sia l'obesità che la NAFLD sono associati a un aumento dell'attività del CYP2E1, alcuni studi clinici hanno dimostrato un rischio di epatotossicità indotta da paracetamolo in pazienti con NAFLD di 4-7 volte maggiore, ma nessun rischio aumentato in pazienti affetti soltanto da obesità (Michaut et al., 2014).

La farmacogenomica è un campo di indagine promettente nel caratterizzare il rischio di un paziente per lo sviluppo di insufficienza epatica dopo sovradosaggio da paracetamolo. Se da una parte sono stati identificati alcuni alleli che possono modulare questo rischio, in particolare quelli che interessano il sistema CYP 450, dall'altra tuttavia mancano studi clinici per sostenere queste prove (Zhao e Pickering 2011; Court et al. 2014). Oltre all'identificazione della variazione genetica all'interno del sistema CYP 450, recenti dati suggeriscono che NAD(P)H chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1) svolga un ruolo protettivo, metabolizzando il NAPQI in un idrochinone non tossico; studi con knockout NQO1 in topi mostrano una disfunzione mitocondriale più grave e aree più ampie di necrosi epatica in seguito a sovradosaggio da paracetamolo, rispetto ai controlli (Hwang et al 2014). Anche la variazione nel microbiota intestinale può svolgere un ruolo nella suscettibilità dell'epatotossicità, ad es. topi privi di germi mostrano una forma più mite di epatite acuta indotta da paracetamolo, probabilmente per una riduzione dei segnali di TLR4 e LPS (Possamai et al., 2014; Lancaster EM et al., 2015; Caparrotta TM et al., 2018).

#### 4.7 Manifestazioni cliniche

Il quadro clinico dell'intossicazione da paracetamolo evolve secondo la seguente sequenza temporale:

- Fase 1 (0 - 24 ore)

Nausea, vomito, inappetenza, malessere generale, sudorazione. Nei casi eccezionali di overdose massiva possono essere già presenti coma e acidosi metabolica, non correlati ad insufficienza epatica, assente in questa fase.

- Fase 2 (24 - 72 ore)

Dopo un apparente miglioramento della sintomatologia iniziale, compaiono i segni bio-umorali di danno epatico (aumento delle transaminasi, della bilirubina, del tempo di protrombina).

- Fase 3 (72 - 96 ore)

E' la fase della necrosi epatica centrolobulare, caratterizzata da nausea, vomito, ittero, sanguinamento da deficit coagulativo, ipoglicemia, acidosi metabolica, encefalopatia epatica, letargia, coma. In questa fase, inoltre, può evidenziarsi il danno renale, con innalzamento di azotemia e creatininemia, comparsa di proteinuria, ematuria, oliguria, anuria.

La morte generalmente avviene in 3 – 5 gg.

- Fase 4 (> 4 giorni)

Nei pazienti che superano la Fase 3 inizia il recupero funzionale del fegato, con risoluzione completa in qualche settimana.

La variabilità della presentazione clinica dei pazienti può essere interpretata come segue:

- Estremamente comune: nausea e vomito.
- Molto raramente: coma e grave acidosi metabolica in pazienti con concentrazioni plasmatiche di paracetamolo estremamente elevate (generalmente superiori a 800 mg / L).
- Quadri tardivi in casi gravi (12-36 ore): dolore addominale.

Dopo 2-3 giorni: caratteristiche relazionate alla necrosi epatica con dolore e dolorabilità sottocostale di destra, recidiva di nausea, vomito, ittero, insufficienza renale e coma epatico Test di funzionalità epatica alterati, acidosi, ipoglicemia, elevata creatinina.

Dolore al lombare, ematuria e proteinuria dopo le prime 24 ore suggeriscono fortemente l'incipiente insorgenza di insufficienza renale acuta.

Da considerare, inoltre, che le anomalie della coagulazione aumentano il rischio di sanguinamento dovuto a procedure come la chirurgia e l'estrazione dentaria

Va notato che soltanto una piccola percentuale di bambini di età inferiore ai 6 anni ingerisce di solito una quantità tossica, infatti la maggior parte di coloro che ingeriscono accidentalmente il paracetamolo non richiede un trattamento attivo (TOXBASE®).

#### 4.8 Aspetti biumorali

I cambiamenti biumorali sono indice delle modificazioni e del danno epatico che avvengono a seguito del sovradosaggio di paracetamolo.

Solitamente i parametri tenuti in considerazione nella monitorizzazione dell'overdose da paracetamolo sono l'INR e la glicemia per la funzionalità epatica, l'ALT per il danno epatico, la creatinina per la funzionalità renale, insieme ai valori di pH ematico.

- Effetti ematologici

Oyedeji et al. hanno mostrato che la somministrazione di una bassa dose di acetaminofene (7,5 mg / kg di peso corporeo) non causa un significativo ( $p > 0,05$ ) cambiamento nei profili ematologici: volume corpuscolare medio (MCV), emoglobina corpuscolare media (MCH), concentrazione di emoglobina corpuscolare media (MCHC), emoglobina (Hb), globuli rossi (GR), globuli bianchi (GB) e piastrine. Anche i conteggi differenziali non hanno valori relativi significativi rispetto ai controlli (Oyedeji KO et al., 2013). In uno studio separato condotto su ratti Wistar, Payasi et al. hanno sottolineato che dopo avvelenamento da paracetamolo non si sono verificati cambiamenti ematologici importanti nei livelli plasmatici di GR, GB, piastrine, velocità di eritrosedimentazione (ESR) ed Hb ( $p < 0,05$ ) (Payasi A et al., 2010).

Un altro studio, che ha adottato un modello di somministrazione con dosi ripetute di paracetamolo comprese tra 100 mg / kg e 500 mg / kg di peso corporeo, ha dimostrato che il danno epatico indotto dal paracetamolo innesca vari gradi di alterazione dei parametri ematologici, come le variazioni della conta leucocitaria, dell'emoglobina totale, MCH, MCHC e MCV, suggerendo interferenze con il profilo ematologico alle diverse dosi (Adeneye AA et al., 2008). Altri studi hanno mostrato una significativa trombocitopenia associata a tossicità acuta da paracetamolo, correlata con il livello di epatotossicità. Inoltre, è stato anche suggerito che una trombocitopenia nel corso del sovradosaggio da paracetamolo può essere correlata ad un aumentato rischio di epatotossicità (Fischereder M et al., 1994).

- Effetti sul sistema di coagulazione

Gli studi nei topi hanno messo in evidenza che il sistema della coagulazione è attivato a partire da 2 ore dopo la somministrazione di paracetamolo: tale processo è determinato dall'aumentata concentrazione di trombina e complessi anti-trombina (TAT), unito a un danno epatico indicato dall'aumento dell'enzima ALT. È stato dunque suggerito che l'attivazione del sistema della coagulazione possa essere coinvolto nella patogenesi del danno epatico da paracetamolo, in particolare la trombina. In uno studio la somministrazione di eparina ha inibito l'attivazione di sistema della coagulazione, ritardando il danno epatico da paracetamolo fino a 6 ore (Monte S e Lyons G, 2004; Ganey PE et al., 2007).

Lemini et al. hanno rimarcato l'impatto delle differenze di genere sui vari parametri di coagulazione del sangue, come il tempo di protrombina, il tempo parziale di tromboplastina attivata (aPTT), il tempo di trombina e la concentrazione di fibrinogeno (FIB) nelle analisi svolte sui topi in vivo, importante elemento quindi da tenere in considerazione nella valutazione dell'effetto degli estrogeni e di altri farmaci sul sistema della coagulazione (Lemini C et al., 2007).

- Effetti sugli enzimi epatici

Uno studio sull'effetto di basse dosi di paracetamolo (16-66 mg / kg) ha mostrato un insignificante alterazione dei valori di azotemia, AST, ALT, ALP, glucosio, bilirubina e creatinina rispetto ai controlli. Di contro, uno studio su elevati dosaggi di paracetamolo, pari a 400 mg / kg di peso corporeo, ha evidenziato un'elevata significativamente i livelli delle ALT, iniziando da 2 a 6 ore dalla somministrazione di paracetamolo (Ganey PE et al., 2007). A conferma, un altro studio, in cui invece erano stati usati 300 mg / kg, 400 mg / kg e 500 mg / kg di paracetamolo, ha riscontrato un aumento significativo dell'attività dei valori delle ALT, i quali solitamente suggeriscono un danno al fegato (Gujral JS et al., 2002; Juma KK et al., 2015).

#### **4.9 Aspetti istopatologici**

Studi istologici su tessuto epatico, analizzato dopo somministrazione di paracetamolo pari a 7,5 mg / kg di peso corporeo, non hanno segnalato lesioni visibili, i tessuti piuttosto continuavano a rimanere simili a quelli dei controlli (Oyedeki KO et al., 2013); allo stesso modo è stato indicato che, anche a una dose di 16-66 mg / kg di paracetamolo, i tessuti epatici non mostravano differenze statisticamente significative nel cambiamento istopatologico.

La morte degli epatociti può verificarsi per apoptosi e per necrosi. In uno studio che ha utilizzato 300 mg / kg di paracetamolo per indurre epatotossicità, è stato dimostrato che l'apoptosi era presente a partire da 2 ore dopo la somministrazione di paracetamolo. L'apoptosi aumentava significativamente (circa 6,3 cellule su 10) circa 6 ore dopo la somministrazione di paracetamolo e il numero di cellule necrotiche era fortemente correlato all'aumento dell'attività delle ALT. Infine, lo studio ha concluso che la necrosi oncotica è il meccanismo predominante della morte delle cellule del fegato dopo sovradosaggio da paracetamolo in vivo (Gujral JS et al., 2002). La modalità di morte cellulare nell'epatotossicità non era stata influenzata da dosi crescenti di paracetamolo pari a 300 mg / kg, 400 mg / kg e 500 mg / kg.

Un altro studio ha mostrato necrosi significativa nelle cellule epatocitarie, a seguito di una somministrazione di 400 mg / kg di paracetamolo, da 6 ore dopo la somministrazione di paracetamolo (Ganey PE et al., 2007; Juma KK et al., 2015).

#### 4.10 Diagnosi

Una valutazione del rischio, in cui il clinico cerchi di predire il decorso più probabile e le potenziali complicanze nel paziente, dovrebbe avvenire il prima possibile nella gestione di tutti i casi di avvelenamento. I fattori chiave da considerare per l'avvelenamento da paracetamolo sono la dose e la concentrazione ematica (precoci), le caratteristiche cliniche e di laboratorio che suggeriscono il danno al fegato (tardive) e qualsiasi indicazione anamnestica che suggerisca una maggiore suscettibilità alla tossicità. La soglia di dosaggio alla quale si verifica la lesione epatica dopo l'ingestione di paracetamolo sovratrapeutico sembra essere soggetta ad ampia variazione interindividuale e dipende dalla tipologia del sovradosaggio. I livelli sierici di paracetamolo devono essere utilizzati per valutare la necessità di somministrazione dell'antidoto, l'N-acetilcisteina (NAC) in tutti i pazienti con avvelenamento deliberato da paracetamolo, indipendentemente dalla dose di assunzione riferita.

L'evidenza clinica o biochimica del danno epatico può non essere evidente fino a 24 ore dopo il sovradosaggio acuto da paracetamolo. Il miglior marker surrogato indicante il potenziale di lesione è il livello di paracetamolo sierico posto in relazione con il tempo trascorso dall'assunzione, attraverso il nomogramma di Rumack-Mattew; tuttavia, il nomogramma non può essere applicato per dosi ripetute o frazionate oppure se il tempo di ingestione non può essere determinato con certezza.

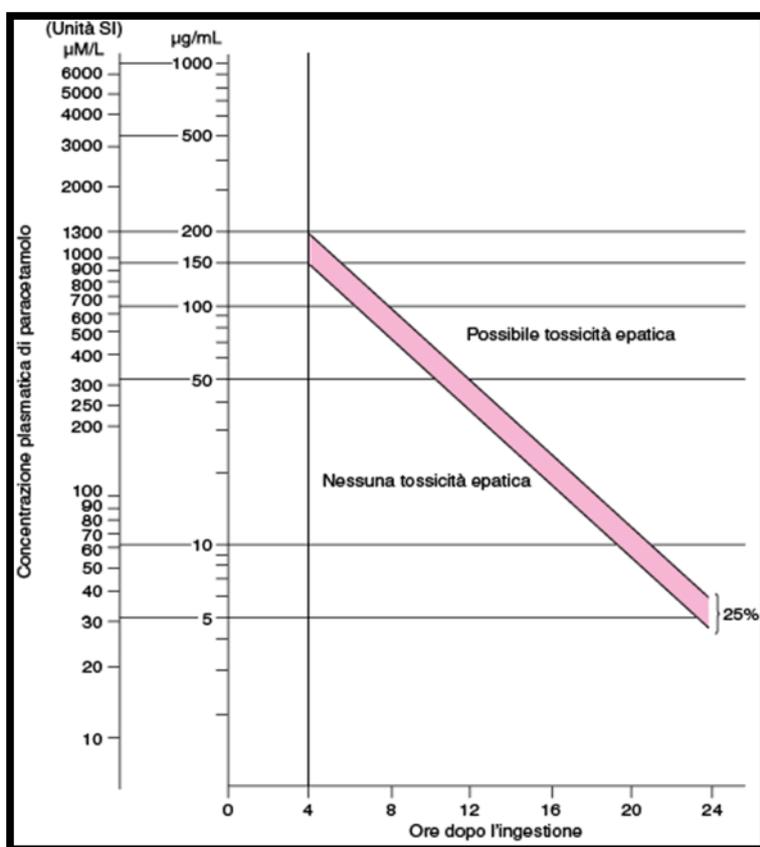
##### *Lo sviluppo de nomogramma di Rumack-Mattew*

Valutare l'effettiva necessità di somministrazione dell'antidoto rimane il punto cruciale nella gestione del paziente con sovradosaggio da paracetamolo.

Nei primi anni '70 presso il Royal Infirmary di Edimburgo, Prescott e colleghi tentarono di definire un criterio per individuare i pazienti che avrebbero potuto sviluppare tossicità in relazione alla dose di paracetamolo ingerita. Venne dimostrato che i pazienti con concentrazioni più elevate di paracetamolo avevano maggiori probabilità di sviluppare epatotossicità, ma avevano anche una più lenta eliminazione del paracetamolo dal corpo (Davidson DG e Eastham WN 1966); queste osservazioni hanno portato allo sviluppo di una serie di linee parallele disegnate su un grafico che sull'asse delle ordinate presentava la concentrazione di paracetamolo dopo 4 o più ore dall'ingestione, mentre sull'asse delle ascisse il tempo intercorso dall'ingestione (Prescott LF et al., 1977, Boyer TD e Rouff SL, 1971). Le linee vennero tracciate a diverse concentrazioni di paracetamolo, 300 mg l<sup>-1</sup>, 200 mg l<sup>-1</sup> e 100 mg l<sup>-1</sup> a partire da 4 ore dopo il sovradosaggio.

In coloro con una più alta concentrazione di paracetamolo, al di sopra della linea di 300 mg, il danno epatico misurato usando l'aumento delle ALT sopra 1000 IU l<sup>-1</sup> era quasi sempre presente, ed è stato solo in questo gruppo che si sono verificati decessi (Boyer TD e Rouff SL, 1971). A basse concentrazioni, anche il rischio di lesioni epatiche si riduceva e in questa coorte, relativamente piccola, non si verificarono decessi.

Nel Regno Unito, negli anni '70, la linea del nomogramma dei 200 mg l<sup>-1</sup> è stata quindi utilizzata per le decisioni terapeutiche. Un approccio simile era stato raccomandato anche da Rumack & Matthew negli Stati Uniti (Gujral JS et al., 2002), ma la FDA statunitense richiese un margine di sicurezza più ampio, adottando una linea con una concentrazione di paracetamolo a partire da 150 mg l<sup>-1</sup> a 4 ore (Smilkstein MJ et al., 1988 e Rumack BH et al 2012). **Figura 13**

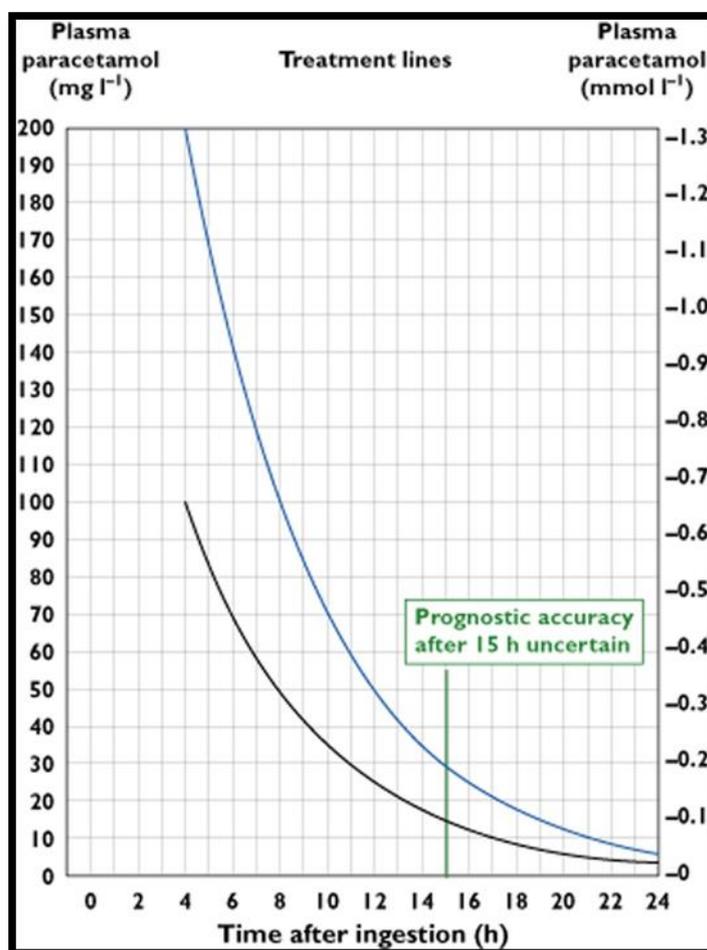


**Figura 13.** nomogramma utilizzato negli USA e in altri paesi europei con la linea inferiore fissata a 150 mg l<sup>-1</sup> a 4 ore. L'area in rosa indica le concentrazioni di paracetamolemia per cui è indicato il trattamento in caso di presenza di fattori di rischio

Sempre nel Regno Unito, inoltre, sono state segnalate morti occasionali in pazienti che presentavano concentrazioni ematiche apparentemente inferiori alla linea limite di Prescott dei 200 mg l<sup>-1</sup>: a causa delle preoccupazioni causate da questi eventi, nel 1995 il Servizio nazionale dei Centri Anti Veleni ha prescritto che fosse adottato un approccio di valutazione del rischio per i pazienti con concentrazione di

paracetamolo tra le linee dei 200 a 100 mg l<sup>-1</sup> del nomogramma (Ganey PE et al., 2007) Fig NNN. L'aumento del rischio era basato sulla storia di digiuno o malnutrizione, sul consumo di farmaci che inducono gli enzimi epatici, sulla storia di un uso cronico di alcol e su malattie croniche debilitanti (Beer C et al., 2007). (Bateman DN, 2015).

Dal 2012 nel Regno Unito a seguito di una decisione del "Commission on Human Medicine (CHM)" sono state promulgate nuove linee guida che indicano il trattamento di tutti i pazienti con una concentrazione di paracetamolo al di sopra della linea di 100 mg/l a 4 ore del nomogramma, indipendentemente dalla presenza di fattori di rischio, come anche il trattamento di tutti i pazienti con overdose frazionata o con tempistiche di ingestione ignote (Caparrotta TM et al., 2018). **Figura 14**



**Figura 14.** Nomogramma utilizzato nel Regno Unito fino al Settembre 2012; in blu la normale linea di trattamento, in nero la linea di trattamento in caso di fattori di rischio (Bateman ND et al 2014)

#### 4.11 Gestione clinica

Il fattore di rischio più importante per il danno epatico dopo ingestione acuta di paracetamolo è il ritardo dell'inizio del trattamento con N-acetilcisteina oltre le 8 ore: infatti, il trattamento precoce previene il danno epatico grave. Purtroppo, la N-acetilcisteina ha frequenti effetti avversi, è moderatamente costosa e richiede il ricovero in ospedale, quindi non è ragionevole somministrarla a ogni paziente con possibile sovradosaggio di paracetamolo. In base ai diversi possibili scenari che possono presentarsi vi sono precise indicazioni da seguire per una gestione clinica ottimale.

Di seguito vengono riportate le definizioni per i possibili scenari di sovradosaggio da paracetamolo e le indicazioni per le rispettive gestioni cliniche. Tali informazioni possono variare leggermente nei differenti paesi e le seguenti sono basate principalmente sulle indicazioni riportate dal database nazionale del Regno Unito, TOXBASE, alla data del 12/12/2016 (TOXBASE® 2016).

Come già esposto in precedenza, la dose raccomandata di paracetamolo per un paziente adulto è di 4 g (o 75 mg / kg) nelle 24 ore e qualsiasi ingestione eccedente tale dosaggio è da considerarsi un sovradosaggio. Raramente si hanno effetti tossici per dosaggi compresi tra i 75 e i 150 mg / kg, mentre una grave tossicità è prevista per dosaggi superiori ai 150 mg / kg.

##### *Sovradosaggio acuto/singolo (adulti e bambini > 6 anni)*

In seguito a un singolo sovradosaggio acuto, assunto in un arco temporale inferiore a 1 ora, la necessità di trattamento con N-acetilcisteina viene determinata confrontando la concentrazione plasmatica di paracetamolo misurata rispetto al tempo trascorso dall'assunzione del farmaco, mediante l'uso del nomogramma di Rumack-Matthew. Inoltre, vengono tenuti in considerazione gli esami plasmatici per la funzionalità epatica e renale unitamente ai normali *screening* ematici di accesso in pronto soccorso.

I pazienti con una concentrazione plasmatica di paracetamolo superiore alla linea limite del nomogramma (100 mg l<sup>-1</sup> a 4 ore) richiedono un trattamento antidotale, mentre i pazienti con una concentrazione plasmatica al di sotto di tale linea del nomogramma non hanno bisogno di trattamento. Da ricordare che in altri paesi europei il limite per il trattamento permane fissato a 200 mg l<sup>-1</sup> o 150 mg l<sup>-1</sup> in caso di fattori di rischio concomitanti.

Se vi fosse una qualche incertezza sul fatto che la concentrazione di paracetamolo del paziente sia sopra o sotto la linea del nomogramma, il paziente deve essere trattato con N-acetilcisteina. Il nomogramma non può invece essere utilizzato se i tempi di ingestione sono incerti o se si tratta di un sovradosaggio frazionato.

#### *Presentazione entro 1 ora dall'ingestione*

Se il paziente si presenta entro un'ora dall'ingestione, possono essere messe in atto le consuete pratiche di decontaminazione, come gastrolusi e/o somministrazione di carbone vegetale attivato, a seconda del giudizio clinico. In seguito, il paziente dovrà essere trattato come indicato nel ¶ 2.8.1.2, relativo alle prime 4 ore dall'assunzione.

#### *Presentazione entro le prime 4 ore dall'ingestione*

Se non sono ancora trascorse 4 ore dall'assunzione, è comunque consigliato attendere tale limite temporale dall'ingestione, in quanto le concentrazioni plasmatiche misurate non possono essere interpretate prima di questo lasso temporale mediante l'utilizzo del nomogramma, per motivazioni farmacocinetiche.

Una volta trascorse le 4 ore, dovrà essere prelevato un campione di sangue venoso per la misurazione urgente della concentrazione plasmatica di paracetamolo insieme alla misurazione della funzionalità epatica e renale, oltre ai normali screening di accesso in pronto soccorso, se non già prelevati.

#### *Presentazione tra le 4 e le 8 ore dall'ingestione*

Se il paziente si presenta tra le 4 e le 8 ore dall'ingestione del paracetamolo dovrà essere prelevato immediatamente un campione di sangue venoso per la misurazione urgente della concentrazione plasmatica di paracetamolo, insieme alla misurazione della funzionalità epatica e renale, oltre ai normali screening di accesso in pronto soccorso.

Se il risultato non può essere ottenuto entro 8 ore dall'ingestione o si prevede un ritardo eccessivo nell'ottenere la concentrazione di paracetamolo, il trattamento dovrà essere iniziato se sono stati ingeriti più di 150 mg / kg di paracetamolo per ottenere il massimo risultato dal trattamento antidotale; se il paziente presenta test biochimici che suggeriscono un danno epatico acuto (ad es. ALT oltre il limite superiore della norma), si dovrà valutare l'uso di N-acetilcisteina, sebbene la concentrazione plasmatica di paracetamolo sia inferiore alla linea a rischio sul nomogramma (in caso di avvelenamento grave l'ALT è comunemente anormale alla prima presentazione in ospedale).

#### *Presentazione tra le 8 e le 24 ore dall'ingestione*

In questo caso, andranno prelevati immediatamente i campioni ematici dai pazienti per la misurazione urgente della concentrazione plasmatica di paracetamolo (prima che venga somministrato NAC se possibile), oltre alla misurazione della funzionalità epatica e renale e ai normali screening di accesso in pronto soccorso.

E' indicato, inoltre, di somministrare immediatamente N-acetilcisteina a tutti i pazienti, qualora si ritenga che più di 150 mg / kg di peso corporeo di paracetamolo sia stato ingerito come sovradosaggio acuto.

Va sottolineato, stavolta, la necessità di non aspettare il risultato della concentrazione di paracetamolo nel plasma. L'efficacia dell'antidoto diminuisce rapidamente durante questo periodo e deve quindi essere avviato con urgenza.

Se il paziente ha ingerito meno di 150 mg / kg, si dovranno attendere i risultati degli esami ematici prima di considerare il trattamento con NAC.

Se il rischio di danno epatico è confermato, si dovrà continuare con la somministrazione dell'antidoto, tenendo il paziente sotto osservazione e monitorando la funzionalità epatica e renale; i parametri migliori per valutare la gravità del danno l'INR le ALT e la creatinina plasmatica.

L'N-acetilcisteina può essere sospesa se il paziente non è considerato a rischio di danno epatico, cioè la concentrazione di paracetamolo è inferiore alla linea di trattamento del nomogramma, l'INR e l'ALT sono normali e il paziente è asintomatico; infine, se il paziente presenta anche una normale creatinina sierica, può essere dimesso con il consiglio di rientrare in ospedale in caso di vomito o dolore addominale.

Il trattamento non deve essere interrotto in caso di dubbi sulla tempistica del sovradosaggio.

#### *Presentazione oltre le 24 ore dall'ingestione*

Andranno misurate la concentrazione plasmatica di paracetamolo (se possibile, prima che venga somministrato NAC) ed effettuati gli esami ematici di routine con particolare attenzione a:

- tempo di protrombina (INR)
- emocromo completo
- attività delle transaminasi sierica (cioè ALT)
- concentrazione sierica di creatinina
- valori emogasanalitici
- glicemia

Se il paziente è chiaramente itterico o ha dolorabilità in ipocondrio destro, andrà trattato con NAC, altrimenti si dovranno attendere i risultati degli esami del sangue prima di iniziare il trattamento. È utile sottolineare, tuttavia, che non vi sono prove che il trattamento con N-acetilcisteina prima della disponibilità

di esami del sangue sia vantaggioso o che il trattamento ritardato per un breve periodo in attesa di risultati del sangue peggiori la prognosi nei pazienti arrivati più di 24 ore dopo il sovradosaggio.

I pazienti asintomatici che si sono presentati più di 7 giorni dopo l'ultima dose di paracetamolo ingerita, che non hanno avuto nuovi sintomi dal momento dell'ingestione e che non hanno storia di insufficienza renale cronica o epatica, di norma non richiedono ulteriori accertamenti, a condizione che i tempi di ingestione siano certi.

E' probabile che la concentrazione plasmatica di paracetamolo più di 24 ore dopo il sovradosaggio sia inferiore al limite di rilevazione, anche dopo un sovradosaggio consistente. Una concentrazione misurabile di paracetamolo più di 24 ore dopo l'ingestione indica un sovradosaggio molto ampio, un errore nel tempo di ingestione o un sovradosaggio frazionato. Normalmente, deve essere somministrato un ciclo completo di terapia antidotale in questi pazienti con paracetamolemia positiva.

Se oltre 24 ore dopo il sospetto di ingestione di paracetamolo:

- l'INR è normale (1.3 o meno) ma l'ALT ha un valore due volte il limite superiore del normale o più

oppure

- l'INR è maggiore di 1,3 (in assenza di un'altra causa, ad esempio warfarin), ma l'ALT è normale (meno di due volte il limite superiore della norma) si dovrà procedere al trattamento con acetilcisteina e si dovrà ripetere gli esami ematici a 8 e-16 ore, prendendo anche in considerazione altre cause. Il NAC può, quindi, essere interrotto se l'INR è 1,3 o inferiore e l'ALT non è ulteriormente aumentato. Altrimenti, si dovrà continuare il NAC, ricontrollando gli esami ematici ad intervalli di 8-16 ore.

Una epatotossicità clinicamente significativa è improbabile se, 24 ore o più dopo l'ultima assunzione di paracetamolo, tutti i seguenti criteri sono soddisfatti:

- la concentrazione di paracetamolo non è rilevabile
- l'INR è 1.3 o inferiore
- l'ALT è inferiore di due volte al limite superiore della norma
- il paziente è asintomatico

### *Sovradosaggio volontario frazionato (staggered overdose)*

Il sovradosaggio frazionato, ovvero due o più dosi sovraterapeutiche di paracetamolo assunte in un intervallo temporale superiore a 1 ora e inferiore a 8 ore, è stato associato ad una prognosi peggiore. In un ampio studio di coorte effettuato da Craig et al, nell'Unità di Trapianto Epatico di Edimburgo, è stato evidenziato come i pazienti con overdose frazionata, anche per dosaggi inferiori a quelli assunti in una overdose singola acuta, presentino una prognosi peggiore sia in termini di danno epatico evolutivo verso la necessità di trapianto, sia come mortalità (Craig DG et al., 2012).

Inoltre, in questi casi l'applicazione del nomogramma di Rumack-Mattew non è affidabile.

Pertanto, in tutti questi pazienti è indicata la somministrazione di terapia antidotale alla prima presentazione in pronto soccorso, subito dopo il prelievo per gli esami ematici, senza aspettare il risultato della paracetamolemia e dei test di funzionalità epatica e renale.

Le linee guida di Australia e Nuova Zelanda per la gestione dei sovradosaggi frazionati forniscono indicazioni leggermente diverse, che tengono in considerazione il dosaggio assunto e l'arco temporale in cui è avvenuta l'overdose (Daly FFS, 2008):

#### Adulti

- > 200 mg / kg / 24 ore o 10 g / 24 ore, in un singolo periodo di 24 ore
- > 150 mg / kg / 24 ore o 6 g / 24 ore, nelle precedenti 48 ore
- > 100 mg / kg / 24 ore o 4 g / 24 ore, in pazienti con fattori di rischio

#### Bambini

- > 200 mg / kg su un singolo periodo di 24 ore
- > 150 mg / kg / 24 ore, per le precedenti 48 ore
- > 100 mg / kg / 24 ore per le precedenti 72 ore

### *Sovradosaggio involontario per eccesso terapeutico*

Il sovradosaggio per eccesso terapeutico è definito dall'assunzione di una dose cumulativa superiore ai 4 gr o a 150 mg/kg nelle 24 ore, in qualsiasi arco temporale. Nonostante questo gruppo di pazienti non assuma il farmaco con intento autolesivo e dunque si tratti spesso di dosaggi non molto superiori ai limiti superiori della posologia consigliata, è probabile che questi si presentino in ospedale tardivamente, quando cominciano ad apparire i primi sintomi di danno epatico. Per questo gruppo di pazienti, è indicato il trattamento antidotale senza aspettare il risultato degli esami ematici. Se la dose

assunta nelle 24 ore fosse tra i 75 e i 150 mg / kg è indicato attendere il risultato dei test di funzionalità epatica e iniziare il trattamento se questi risultano alterati.

Qualora siano trascorse più di 24 ore dall'ultima ingestione si inizia immediatamente il trattamento con NAC se il paziente è sintomatico, se la paracetamolemia è rilevabile (qualsiasi valore), se l'INR è maggior e di 1,3 e le ALT sono raddoppiate rispetto al limite superiore del valore normale.

#### **4.12 Modalità inusuale di avvelenamento da paracetamolo**

E' noto che alcuni pazienti, pur presentando una concentrazione plasmatica di paracetamolo che appariva al di sotto della soglia raccomandata per l'uso dell'antidoto, successivamente tuttavia abbiano sviluppato una grave tossicità epatica.

In alcuni di questi casi, ci sono stati errori nella storia, nella dose dichiarata o nei tempi di ingestione; inoltre, l'assunzione di più dosi causa problemi particolari e potrebbe essere responsabile di alcune di queste segnalazioni.

#### **4.13 Categorie particolari di pazienti**

Nei bambini di età inferiore ai 6 anni valgono le indicazioni di gestione clinica fornite nei precedenti paragrafi, tranne per quanto concerne la presentazione del paziente entro le prime 8 ore, per la quale devono essere osservate le seguenti considerazioni:

- i neonati (cioè con meno di 45 settimane di età postmestruale) possono essere più suscettibili alla tossicità epatica indotta da paracetamolo e pertanto il trattamento con N-acetilcisteina deve essere considerato in tutte le overdosi di paracetamolo;
- per i bambini di età superiore a 1 mese che hanno ingerito più di 75 mg / kg di peso corporeo di paracetamolo entro un'ora, attendere fino a 4 ore dall'inizio dell'ingestione, quindi prelevare un campione di sangue venoso per misurare urgentemente la concentrazione plasmatica di paracetamolo. Le concentrazioni plasmatiche misurate a meno di 4 ore dopo l'ingestione non possono essere interpretate. Valutare inoltre gli esami per la funzionalità epatica e renale insieme alla routine di ingresso del pronto soccorso.
- se esistesse la certezza assoluta che è stata assunta una dose singola inferiore a 75 mg / kg di peso corporeo di paracetamolo, il prelievo di sangue può essere ragionevolmente considerato non

necessario e il bambino può essere dimesso;

- valutare il rischio di gravi danni al fegato utilizzando il nomogramma la linea del nomogramma di Rumack-Mattew come se si trattasse di un soggetto con fattori di rischio;
- se il paziente presenta test biochimici che suggeriscono un danno epatico acuto (ad es. ALT oltre il limite superiore della norma), considerare l'uso di NAC anche se la concentrazione plasmatica di paracetamolo è inferiore alla linea a rischio sul nomogramma.

Nel caso di pazienti gravide, la dose tossica deve essere calcolata utilizzando il peso pre-gravidanza, mentre la dose di antidoto deve essere calcolata utilizzando il peso effettivo al momento del sovradosaggio.

Per quanto riguarda il calcolo della dose tossica negli adulti obesi, è consigliato che per qualsiasi paziente adulto di peso superiore ai 110 kg la dose tossica in mg / kg debba essere calcolata utilizzando un massimo di 110 kg, anziché il peso effettivo del paziente. Sempre in relazione a questa categoria, per qualsiasi paziente adulto di peso superiore a 110 kg la dose di antidoto deve essere calcolata utilizzando un massimo di 110 kg, anziché il peso effettivo del paziente.

Parlando ora non di pazienti obesi adulti, bensì di pazienti obesi bambini, le raccomandazioni indicano di utilizzare il peso effettivo del bambino per calcolare sia la dose tossica che la dose di NAC, fino a un massimo di 110 kg (TOXBASE® 2016)

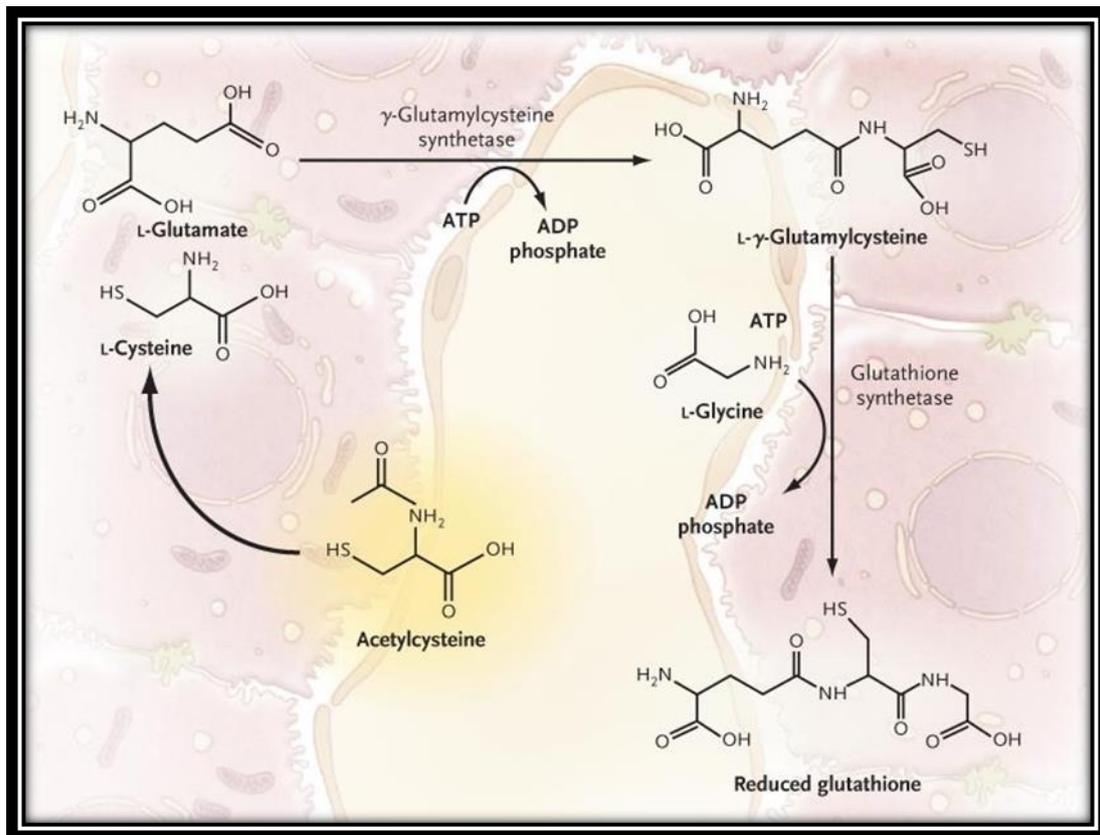
#### **4.14 Terapia**

La terapia dell'overdose da paracetamolo si basa sulla somministrazione di NAC, con lo scopo di fornire il substrato per ricostituire il glutathione epatico necessario per detossificare il metabolita reattivo del paracetamolo (NAPQI) (**Figura 15**). Il dosaggio di NAC è determinato sulla base del peso del paziente, indipendentemente dalla dose ingerita di paracetamolo e la somministrazione può avvenire per via endovenosa o per via orale. Nel 1970 a Edimburgo venne messo a punto da Prescott e colleghi lo schema terapeutico con N-acetilcisteina somministrata per via endovenosa che trasformò radicalmente la gestione dell'avvelenamento da paracetamolo. Nonostante la complessità di questo regime, che prevedeva tre diverse infusioni somministrate nell'arco di 21 ore, esso è stato usato di routine nella gestione del sovradosaggio da paracetamolo per oltre 30 anni, non solo nel Regno Unito ma anche in numerosi paesi europei.

Negli Stati Uniti, invece, la mancanza dell'approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) di una preparazione di NAC per la somministrazione endovenosa ha portato allo sviluppo di un

regime terapeutico che prevedeva la somministrazione di NAC per via orale per una durata complessiva di 3 giorni; solo nell'ultimo decennio negli USA, a seguito dell'approvazione da parte della FDA nel 2004, vi è stato un passaggio alla somministrazione più breve per via endovenosa (Thanacoody HKR et al. 2013).

Da recenti studi di meta-analisi, nessuno dei due regimi di somministrazione, endovenoso ed orale, è stato stabilito come più efficace rispetto all'altro (Brok J et al., 2006).



**Figura 15.** Sintesi del glutathione (modificata da Kennon J. Heard, M.D. 2008)

### *Somministrazione intravenosa*

L'intero ciclo di trattamento per somministrazione intravenosa prevede l'infusione di un totale di 300 mg di NAC suddiviso in diverse dosi. Le dosi devono essere somministrate sequenzialmente, senza interruzioni tra le infusioni.

#### *Protocollo Europeo di 21 ore*

- Prima infusione

Una dose iniziale di carico di NAC pari a 150 mg / kg di peso corporeo (massimo 16,5 g) in 200 mL di soluzione glucosata al 5%, infusa in 1 ora.

- Seconda infusione

Una dose di 50 mg / kg di peso corporeo (massimo 5,5 g) di NAC in 500 mL di soluzione glucosata al 5%, infusa nelle successive 4 ore.

- Terza infusione

Una dose di 100 mg / kg di peso corporeo (massimo 11 g) di NAC in 1000 mL di soluzione glucosata al 5%, infusa nelle successive 16 ore.

#### *Protocollo ridotto di 12 ore (SNAP; UK)*

- Prima infusione

Una dose iniziale di carico di NAC pari a 100 mg / kg di peso corporeo (massimo 16,5 g) in 200 mL di soluzione glucosata al 5%, infusa in 2 ore.

- Seconda infusione

Una dose di 200 mg / kg di peso corporeo (massimo 5,5 g) di NAC in 1000 mL di soluzione glucosata al 5%, infusa nelle successive 10 ore.

- Terza Infusione

Quest'ultima parte continua a essere tuttora effettuata, ma solamente come controllo dell'efficacia del nuovo protocollo ridotto e consiste nella somministrazione di soluzione glucosata al 5% in 8 ore (Thanacoody HKR et al. 2013).

### *Somministrazione endovenosa nei bambini*

I bambini vengono trattati con le stesse dosi degli adulti, tuttavia la quantità di fluido endovenoso utilizzato deve essere modificata tenendo conto dell'età e del peso, poiché il sovraccarico di liquidi è un potenziale pericolo. Di seguito il protocollo di somministrazione in base al peso corporeo (Daly FF, et al., 2008):

Bambini  $\leq$  20 kg di peso corporeo

150 mg / kg di NAC in 3 ml / kg di glucosio al 5% in 15 minuti  
Seguito da 50 mg / kg in 7 ml / kg di glucosio al 5% in 4 ore  
Seguito da 50 mg / kg in 7 ml / kg di glucosio al 5% in 8 ore  
Seguito da 50 mg / kg in 7 ml / kg di glucosio al 5% in 8 ore

– Bambini  $>$  20 kg di peso corporeo

150 mg / kg di NAC in 100 ml di glucosio al 5% nell'arco di 15 minuti  
Seguito da 50 mg / kg in 250 ml di glucosio al 5% in 4 ore  
Seguito da 50 mg / kg in 250 ml di glucosio al 5% in 8 ore  
Seguito da 50 mg / kg in 250 ml di glucosio al 5% in 8 ore

### *Somministrazione orale*

Questo ciclo di trattamento prevede

- una dose di carico di NAC di 140 mg/kg di peso corporeo
- dosi successive di mantenimento di NAC di 70 mg/kg di peso corporeo, da ripetere ogni 4 ore durante 72 ore, per un totale di 17 dosi (Smilkstein MJ, 1988).

Solitamente i pazienti con un basso rischio di sviluppare epatotossicità vengono dimessi in seguito ad un periodo di osservazione dopo la somministrazione dell'iniziale dose di carico e vengono lasciate loro istruzioni per l'assunzione orale dell'antidoto a domicilio, con un controllo degli esami ematochimici a distanza a livello ambulatoriale (Kennon J and Heard MD, 2008).

### *Gestione del paziente dopo il trattamento infusivo con NAC*

In questo tipo di trattamento, è necessario ricontrollare l'INR, la creatinina plasmatica, il pH e bicarbonati ematici e le ALT alla ventesima ora di infusione nel protocollo di 21 ore o alle decima ora di somministrazione del protocollo ridotto di 12 ore.

Se tutti i risultati degli esami ematici sono normali (l'INR è 1,3 o inferiore, l'ALT è meno di due volte il limite superiore del normale e l'ALT non è più del doppio della misurazione di ammissione, con paracetamolemia non superiore al range terapeutico), il paziente può essere dimesso in sicurezza, con il consiglio di tornare in ospedale in caso di vomito o dolore addominale.

Se i risultati del sangue sono anormali, ossia se:

- l'ALT è più che raddoppiata dalla misura di ammissione

oppure

- l'ALT è due volte il limite superiore del normale o più

oppure

- l'INR è maggiore di 1,3 (in assenza di un'altra causa, come ad es. warfarin)

si dovrà continuare il NAC alla dose e alla velocità di infusione utilizzata nell'ultima infusione.

Non è necessario somministrare un'ulteriore dose di carico, a meno che non sia stato assunto un secondo sovradosaggio.

Sarà, inoltre, opportuno ripetere tutti gli esami ematici ogni 8 ore per consentire una valutazione precoce della progressione della tossicità epatica.

Ulteriori infusioni di NAC devono essere somministrate quando:

- l'INR è pari a 1,3 o meno

oppure

- l'INR è inferiore a 3,0 e in diminuzione verso valori normali in due esami ematici consecutivi.

Un aumento isolato più piccolo (fino a due volte il limite superiore della norma) delle ALT, in presenza di un INR di 1,3 o inferiore, non richiede ulteriori trattamenti. Il paziente può essere dimesso con il consiglio di rientrare in ospedale in caso di vomito o dolore addominale.

L'acetilcisteina ha un odore e un sapore sgradevoli e il vomito è comune con la somministrazione orale; tuttavia solo il 5% dei pazienti negli USA richiede la terapia con somministrazione endovenosa perché non tollera il NAC per via orale (Yip L et al., 1998)

Negli adulti, dosi anche molto elevate di NAC orale non sono finora state associate a gravi effetti tossici. (Miller LF e Rumack BH, 1983)

Gli effetti avversi più comunemente riportati causati dall'acetilcisteina per via endovenosa sono reazioni di tipo anafilattoide, come rash, prurito, angioedema, broncospasmo, tachicardia e ipotensione: dati in letteratura suggeriscono che circa il 15% dei pazienti trattati con NAC per via endovenosa ha avuto una reazione anafilattoide nelle prime 2 ore dall'inizio dell'infusione. L'aumento del tempo di infusione della prima somministrazione da 15 a 60 minuti non ha alterato il tasso di eventi avversi (Kerr F et al., 2005)

Altri comuni effetti collaterali sono vomito e vampate di calore presenti in circa il 5% dei casi.

Al di là dei possibili e differenti effetti collaterali, la somministrazione del farmaco viene interrotta solo nel 2% dei pazienti a causa di una grave reazione avversa.

L'utilizzo del NAC dunque deve essere ben ponderato e devono essere prese particolari precauzioni in caso di soggetti con nota ipersensibilità al farmaco o atopici. Per questo motivo l'uso di NAC per il trattamento del sovradosaggio acuto prima che siano note le concentrazioni plasmatiche di paracetamolo deve essere evitato, a meno che non siano trascorse più di 8 ore dal sovradosaggio o che si tratti di un sovradosaggio frazionato o eccesso terapeutico: ciò è particolarmente importante nei pazienti con asma grave, che devono essere monitorati con particolare attenzione durante la terapia con NAC, soprattutto nelle prime ore.

In caso di comparsa di reazioni avverse in pazienti trattati con NAC per sovradosaggio da paracetamolo possono essere tenute in considerazione le seguenti indicazioni:

- i pazienti che presentano orticaria devono essere trattati con difenidramina, mentre quelli con angioedema, ipotensione, o sintomi respiratori (ad es., broncospasmo) devono essere trattati con difenidramina, corticosteroidi e broncodilatatori per via inalatoria;
- l'infusione di acetilcisteina deve essere interrotta, ma può essere riavviata più lentamente 1 ora dopo la somministrazione di difenidramina se la sintomatologia si è risolta; 37
- in alternativa, i pazienti con sintomi gravi, che non hanno insufficienza epatica, possono essere trattati con NAC per via orale.

Nei bambini, gli effetti avversi più gravi si verificano per errore terapeutico dovuto a un dosaggio errato di NAC per via endovenosa: questi effetti includono edema cerebrale e iponatremia (dovuta alla somministrazione in destrosio al 5%). Esistono rari casi di morte a causa di reazioni anafilattoidi (Kennon J e Heard MD., 2008).

Come detto in precedenza, il calcolo della quantità di NAC da somministrare viene fatto in base al peso corporeo. In caso di trattamento di un paziente obeso, deve essere tenuto presente che il NAC è solubile in acqua e la componente ematica di un paziente obeso non sarà molto diversa da quella di un paziente con peso medio. Secondo i produttori, il dosaggio massimo di NAC si basa su un paziente di 110 kg. Viene suggerito pertanto in TOXBASE di calcolare le dosi di NAC utilizzando un peso corporeo di 110 kg per quei pazienti che pesano più di 110 kg. L'uso di dosi più elevate di NAC può aumentare il rischio di reazioni anafilattoidi.

Una precedente reazione anafilattoide al NAC non rappresenta una controindicazione per un ulteriore ciclo di trattamento. Il NAC ha maggiori probabilità di provocare effetti avversi se le concentrazioni di paracetamolo sono basse o assenti. Gli effetti avversi sono anche più probabili nelle donne, negli asmatici e nei pazienti con una storia familiare di allergia. Nei pazienti con una storia di precedenti reazioni al NAC deve essere considerato un trattamento profilattico con antistaminici H1 e H2 (ad esempio clorfenamina 10 mg IV e ranitidina 50 mg diluita in 20 ml e somministrata per via endovenosa per almeno 2 minuti).

Il pretrattamento con salbutamolo nebulizzato può essere preso in considerazione in quei pazienti con anamnesi positiva per broncospasmo dopo assunzione di NAC.

Va inoltre considerata una somministrazione della prima flebo più lentamente del normale, ad es. oltre 2 ore, se il paziente ha avuto una precedente reazione avversa al NAC.

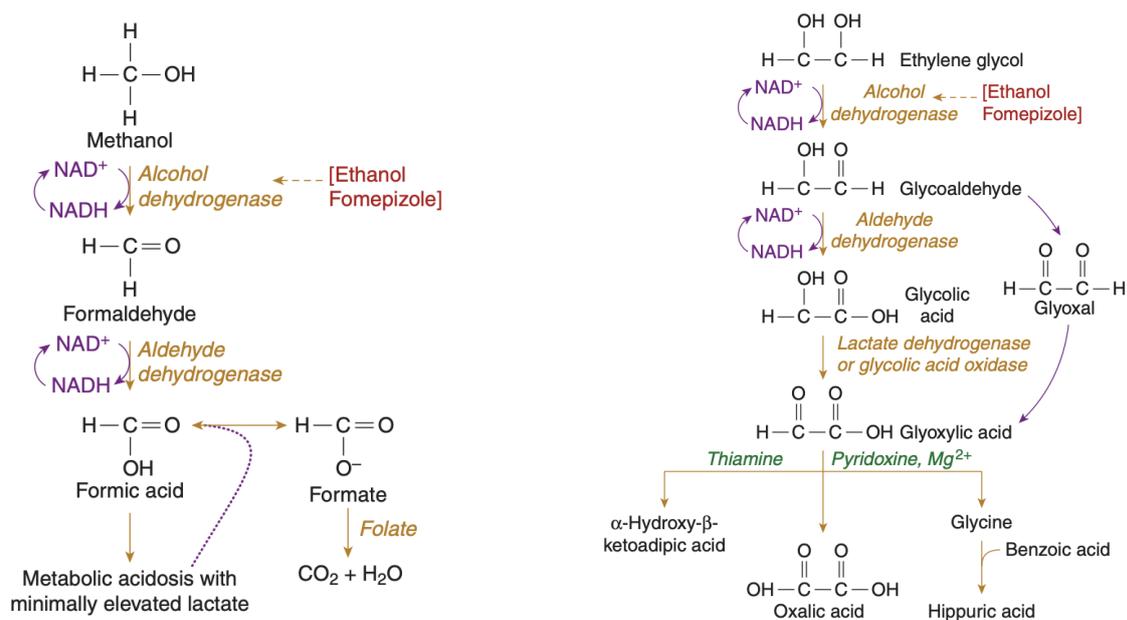
### *Terapie alternative*

Diversi studi hanno dimostrato l'effetto protettivo sulla tossicità del paracetamolo attraverso il targeting delle varie vie che portano all'inibizione del NAPQI. Ad es., il piperonil butossido e il cloruro di cobalto sono stati sperimentati nel pretrattamento della tossicità acuta da paracetamolo in animali (Bitiren M et al., 2010). La cimetidina, anti H2 di vecchia generazione utilizzato anche nella gestione di pazienti con ulcere, ha dimostrato di proteggere dall'epatotossicità del paracetamolo negli animali inibendo la biotrasformazione metabolica e l'attivazione del paracetamolo (Speeg KV Jr et al., 1985); finora non sono però stati condotti studi sui modelli umani per valutare il suo ruolo come epatoprotettore (Critchley JA et al., 1983).

Curiosamente, l'esposizione parallela di paracetamolo ed etanolo nei ratti sembra ridurre la conversione del paracetamolo nei metaboliti attivi (Wong LT et al., 1980). Inoltre i bloccanti dei canali del calcio, come la nifedipina, hanno mostrato di ridurre lo sviluppo della necrosi epatica in seguito ad avvelenamento da paracetamolo (Landon EJ et al., 1986; Deakin CD et al., 1991). Altri agenti testati includono gli inibitori della fosfolipasi A2, delle ciclossigenasi e dellatrombossano sintetasi (Horton AA e Wood JM 1989; Juma et al., 2015).

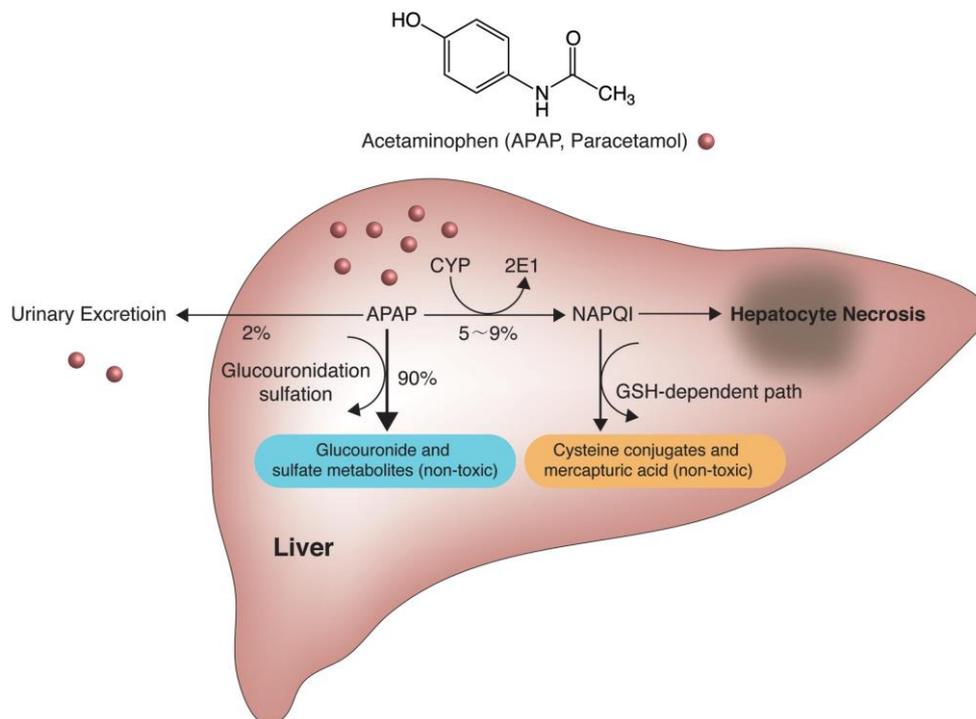
Una particolare menzione va fatta per i recenti studi incentrati sulla valutazione dell'efficacia del fomepizolo nell'inibizione del danno epatico indotto da paracetamolo.

Il fomepizolo, o 4-metilpirazolo, è un antidoto ampiamente usato nel trattamento dell'avvelenamento da glicole etilenico e metanolo. In queste intossicazioni, i metaboliti tossici responsabili del danno cellulare e d'organo vengono prodotti attraverso tappe enzimatiche che sono le stesse del metabolismo dell'etanolo. Il fomepizolo, attraverso l'inibizione dell'enzima alcol deidrogenasi, inibisce la metabolizzazione degli alcoli nei loro metaboliti tossici. **Figura 16**



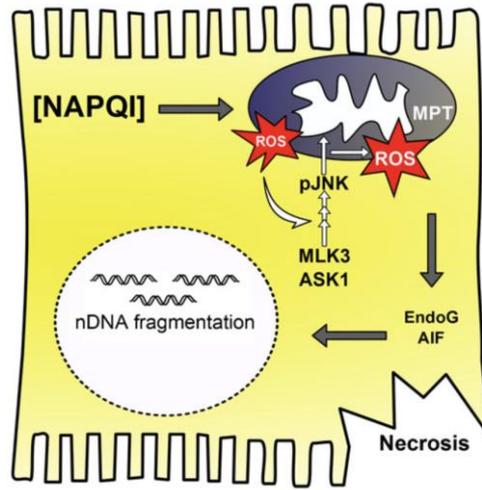
**Figura 16:** *Tappe enzimatiche del metabolismo di metanolo e fomepizolo (Goldfrank's Toxicology)*

Il razionale dell'uso del fomepizolo nell'intossicazione da paracetamolo risiede nella capacità di questo antidoto di bloccare i citocromi della famiglia p450 responsabili della formazione del reattivo tossico NAPQI, principalmente Cyt2E1 ma anche Cyt2A6 (Hazai E et. al, Akakpo JY et al). **Figura 17**



**Figura 17.** *Metabolismo del paracetamolo (Yoon E et al. 2016)*

Inoltre, sembra che il fomepizolo vada ad interagire anche con alcune fasi intracellulari di danno ossidativo e mitocondriale epatico. A livello molecolare, infatti, il paracetamolo causa un iniziale stress ossidativo che attiva, tramite fosforilazione, la chinasi c-JNK (c-Jun N-terminal kinase) causandone la sua traslocazione all'interno del mitocondrio, con conseguente amplificazione dell'iniziale danno ossidativo indotto dal NAPQI e alterazioni mitocondriali come il rigonfiamento e il danno di membrana. Questi eventi portano alla rottura della membrana esterna mitocondriale con conseguente liberazione di proteine inter-membrana con attività pro-apoptotica, tra cui l'Apoptosis Inducible Factor (AIF), che contribuiscono ulteriormente al danno cellulare e necrosi epatocitaria (Saito C et al). Da recenti dati sperimentali sembra che il fomepizolo vada anche ad inibire l'attivazione della chinasi c-JNK nel citosol cellulare e la sua traslocazione nel mitocondrio, proteggendo quindi la cellula epatocitaria dal danno mitocondriale (Akakpo JY et al.). **Figura 18** Attualmente l'uso del fomepizolo è riservato a casi di intossicazioni gravi come terapia off-label.



**Figura 18.** Meccanismo molecolare di danno mitocondriale (Akakpo JY et al. 2018)

#### 4.14.1 Algoritmo diagnostico e terapeutico

Nei paesi anglosassoni il personale sanitario di ogni ospedale si trova a trattare frequentemente pazienti con avvelenamento da paracetamolo. La gestione clinica, per i medici non specialisti in Tossicologie o meno esperti può risultare difficoltosa e dispendiosa in termini di tempo ed energie al momento di dover consultare le linee guida nazionali per diagnosi e trattamento. Negli anni sono stati proposti alcuni algoritmi diagnostici per semplificare la gestione clinica del paziente con sovradosaggio da paracetamolo.

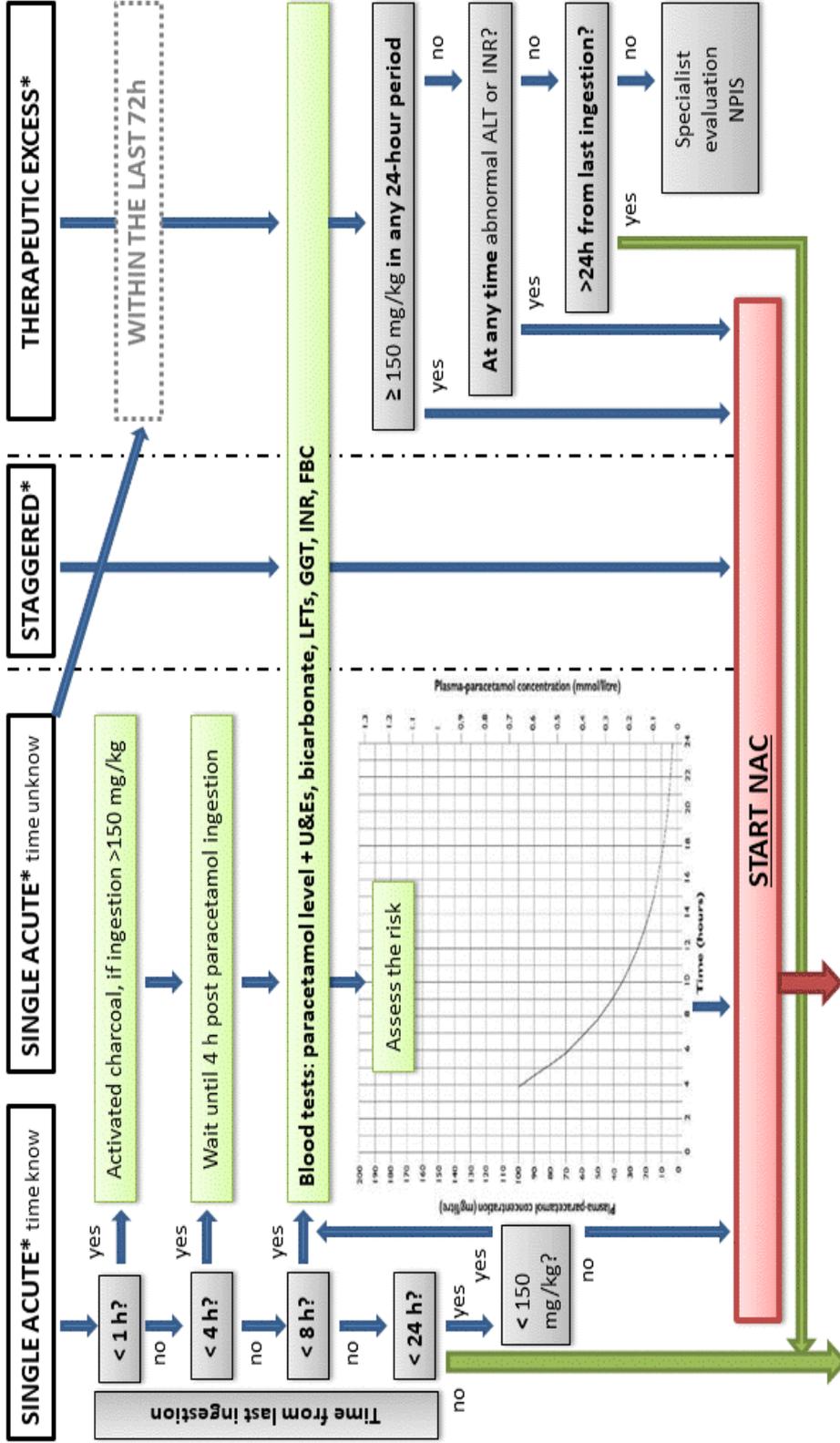
Di seguito, in **Figura 19**, è riportato l'algoritmo diagnostico da me creato utilizzando le informazioni estrapolate da TOXBASE durante la permanenza nella unità di Tossicologia Clinica e Centro Antiveneni di Edimburgo per lo svolgimento dell'attività di ricerca clinica su cui verte questa tesi, mentre in **Figura 20**, come altro esempio, è riportata la flow-chart suggerita da Wallace et al (Wallace CI et al. 2002).

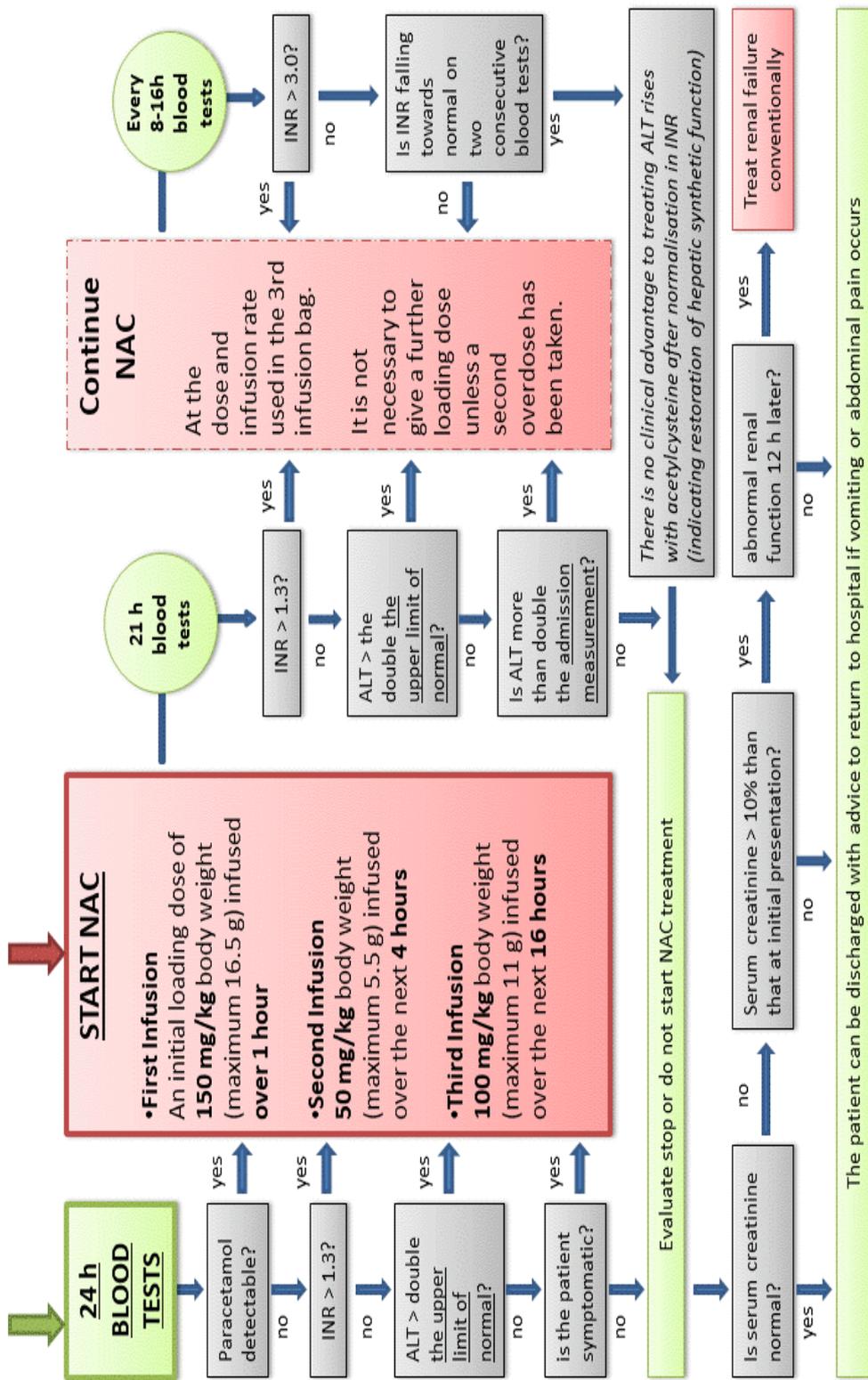
# Management of Paracetamol Poisoning (UK)

*If less than 75 mg/kg or 4 gr/day, serious toxicity is unlikely*

*Remember: reported doses may be unreliable (always start NAC in symptomatic patients)*

*\* Single acute: all doses taken within 1 h; Staggered: doses taken over more than 1 h; Therapeutic excess: more than 75 mg/kg or 4 gr/day*





**Figura 19.** Diagramma diagnostico-terapeutico per il sovradosaggio da paracetamolo elaborato dall'autore del presente testo sulla base delle linee guida del Regno Unito presenti in TOXBASE (TOXBASE® 2016).

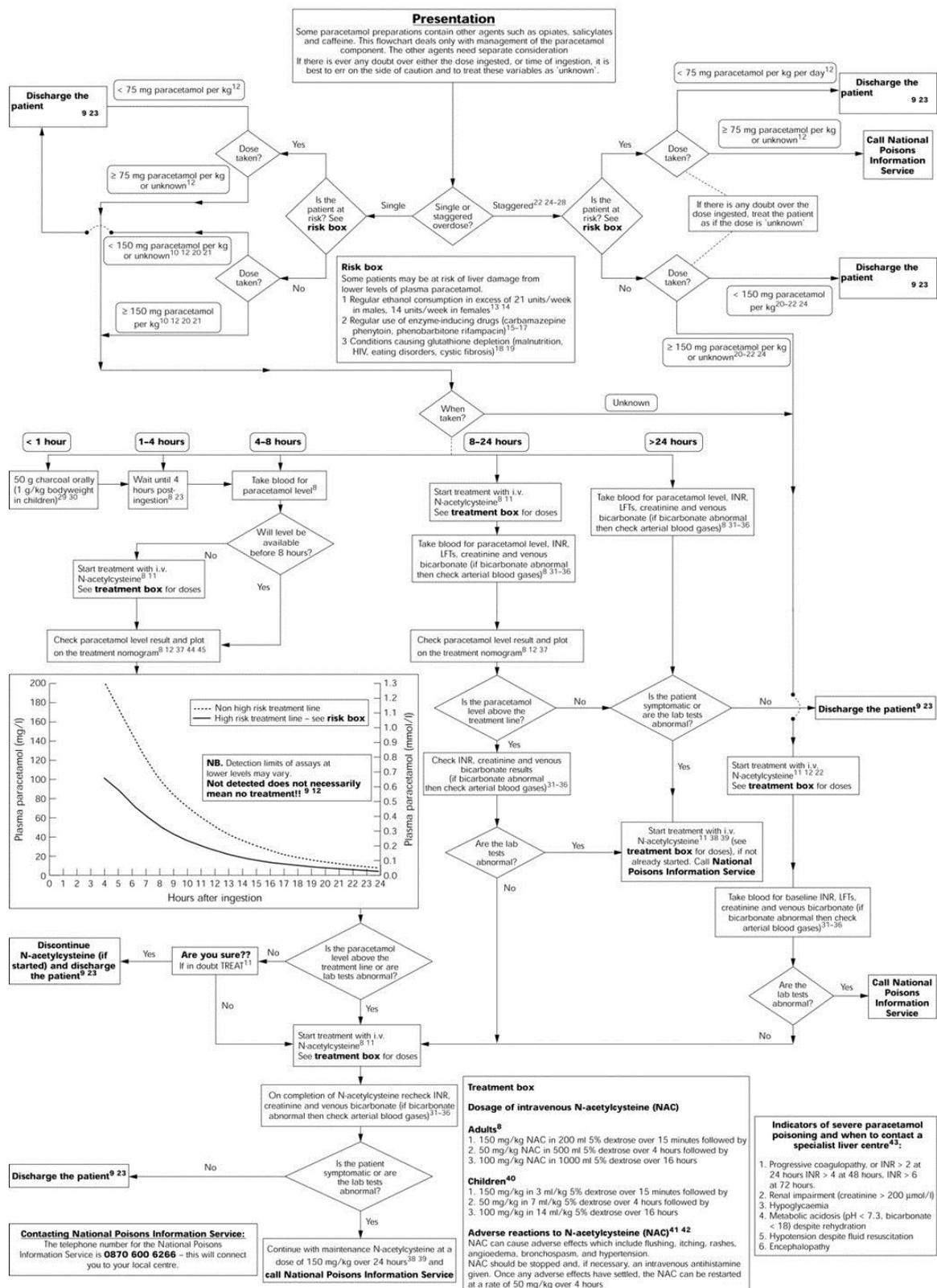


Figura 20. Flowchart diagnostico-terapeutica per l'overdose da paracetamolo (Wallace CI et al. 2002)

#### 4.15 Problematiche della stratificazione del rischio

I metodi per la stratificazione del rischio e la conseguente decisione di avviare una terapia con NAC non sono completamente ottimali. Sottostimare il rischio di danno epatico può infatti portare a un ritardo nell'inizio del trattamento antidotale con conseguenze importanti, come la necessità di un trapianto epatico o addirittura l'exitus. D'altro canto, trattare preventivamente ogni sovradosaggio di paracetamolo con N-acetilcisteina anche quando il rischio di avvelenamento è basso, aumenterebbe le probabilità di sviluppare reazioni anafilattoidi al farmaco, incrementando inoltre notevolmente il carico degli ospedali e di conseguenza la spesa sanitaria. Ne è un esempio il sovradosaggio acuto frazionato, per cui le linee guida del Regno Unito indicano un diretto trattamento antidotale senza attendere i risultati delle analisi ematiche.

La valutazione della necessità di una terapia antidotale si basa attualmente su marcatori di rischio e biomarcatori di danno d'organo. Come marcatori di rischio vengono utilizzati la dose ingerita e la concentrazione plasmatica di paracetamolo messa in relazione sul nomogramma di Rumack-Matthew con le ore trascorse dall'assunzione del farmaco: questi parametri presentano lo svantaggio di basarsi sull'attendibilità di quanto riferito dal paziente, per quanto riguarda il nome del farmaco, il suo dosaggio e le tempistiche di ingestione (Antoine DJ et al 2013).

Per quanto riguarda il danno d'organo, vengono utilizzati routinariamente per la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico indotto da paracetamolo i comuni biomarcatori sierici di lesioni epatiche generali, quali l'alanina aminotransferasi (ALT), l'aspartato aminotransferasi (AST), la fosfatasi alcalina (ALP) e la bilirubina totale (TBL). ALT, AST e ALP sono tutti enzimi intracellulari, che quando rilevati nel siero possono indicare lesioni degli epatociti o delle cellule biliari. Un aumento della TBL sierica, inoltre, riflette la disfunzione epatica, ma pur essendo specifica per il fegato è in realtà relativamente insensibile e appare tardivamente nella progressione della malattia. ALT, AST e ALP non sono biomarcatori specifici solo per patologie epatiche, ma aumentano anche in seguito ad alterazioni extraepatiche come il danno miocardico, alcune malattie muscolo scheletriche, l'ipertiroidismo e le patologie ossee. È interessante notare come i livelli plasmatici di ALT e ALP possano anche essere influenzati da variazioni genetiche (Yuan X et al. 2008).

Si ritiene che l'ALT sia più specifica per il danno epatico rispetto all'AST, poiché è presente nel fegato principalmente come proteina citosolica e altrove in basse concentrazioni, mentre l'AST è presente sia nelle forme citosoliche che mitocondriali in fegato, cuore, muscoli scheletrici, rene, cervello, pancreas e tessuto polmonare, così come nei globuli bianchi e rossi (Giboney, PT 2005).

Tuttavia, sono stati dimostrati aumenti dell'attività delle ALT anche in seguito a elevati livelli di attività sportiva (Skenderi KP et al., 2006; Koutedakis Y et al., 1993; Robles-Díaz M et al., 2016).

Sia la specificità che la sensibilità di questi marcatori sono inoltre limitate, poiché esiste una mancanza di correlazione tra le variazioni degli enzimi epatici e il danno istopatologico (Campion S et al., 2013).

Nei pazienti con sovradosaggio da paracetamolo, un importante fattore prognostico è il danno renale, in particolare a livello del tubulo prossimale; infatti, i biomarcatori del danno, come la creatinina sierica, sono di solito impiegati negli algoritmi prognostici. Tuttavia, va notato che anche l'incremento della creatinina sierica avviene solo tardivamente rispetto all'overdose (Sabbisetti VS et., 2014).

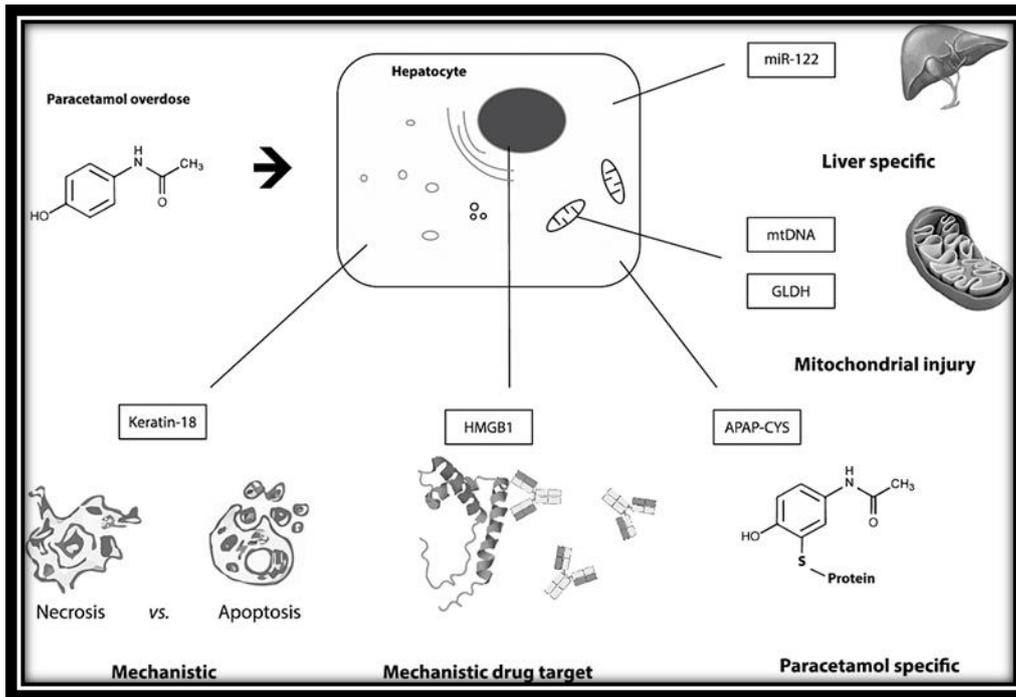
Da quanto esposto, emerge chiaramente che vi sia una necessità in campo medico, finora insoddisfatta, di individuare nuovi biomarcatori per il sovradosaggio da paracetamolo che siano più specifici e sensibili dei meccanismi di stratificazione del rischio utilizzati fino ad oggi.

#### **4.16 Caratteristiche e proprietà dei nuovi biomarcatori**

Al fine di identificare nuovi biomarcatori che potrebbero apportare un reale miglioramento nella gestione del sovradosaggio da paracetamolo sono state individuate alcune proprietà che essi dovrebbero soddisfare. I criteri proposti sono i seguenti:

- specificità per la tossicità indotta da paracetamolo;
- predittività dell'instaurarsi del danno epatico entro 4 o al massimo 8 ore dall'overdose;
- sensibilità per escludere il danno in corso;
- capacità di distinzione tra un incremento delle ALT benigno o meno, buona relazione quantitativa/qualitativa con la patologia;
- traslazonalità tra i modelli in vitro e quelli in-vivo, nonché tra animali e uomo, testabili con metodiche rapide;
- facile riproducibilità e scarsa invasività;
- capacità di porsi come mediatori del danno epatico, così da poter essere considerati in seguito come obiettivi terapeutici.

Con l'obiettivo di queste caratteristiche, una vasta gamma di biomarcatori, con differenti peculiarità, è stata investigata negli ultimi anni (Vliegenthart ADB et al., 2015). **Figura 21**



**Figura 21:** Nuovi biomarcatori e loro proprietà (Vliegenthart ADB et al., 2015).

In seguito alle evidenze presentate da studi prclinici (Wang Y et al., 2013; Bala S et al., 2012; Wang X et al., 2013; Acharya M et al., 2012; Williams CD et al., 2011; Naguib YM et al 2014), nuovi potenziali biomarcatori sono stati investigati nell'uomo da Vliegenthart AD et al. (2015). Si tratta dei seguenti marcatori:

a) *Addotti proteici del paracetamolo (Paracetamol protein adducts):*

Quando il metabolita reattivo NAPQI si forma durante il metabolismo del paracetamolo, esso si lega in modo covalente con proteine andando a formare addotti proteici, tra cui quelli con la cisteina sono i più comuni; [Streeter AJ et al., 1984] dopo il legame di NAPQI con la cisteina, la struttura di NAPQI ritorna a essere quella del paracetamolo e ne risulta così un addotto paracetamolo-cisteina (APAP-CYS) (Vliegenthart ADB et al., 2015).

Le proprietà di questo marcatore sono:

- viene conservato tra i modelli di roditori e gli umani
- è specifico per il sovradosaggio da paracetamolo
- riflette l'evento molecolare iniziale

b) *K-18 (Keratine-18)*

Filamenti intermedi di cheratina si ritrovano nei tessuti epiteliali, nello strato corneo e sono responsabili della struttura cellulare, della differenziazione, della mitosi e della apoptosi (Omary MB et al., 2006; Vijayaraj P et al., 2007).

La cheratina 18 (K18) è abbondantemente espressa anche nel fegato e in altri epitelii delle cellule del tratto digestivo. (Ku NO et al., 1999) K18 non frammentate (Full-length K18) vengono rilasciate passivamente dalle cellule necrotiche, mentre K18 frammentate (Cleaved K18) vengono rilasciate dalle cellule apoptotiche una volta perduta l'integrità di membrana (Schutte B et al., 2004).

In report britannici e statunitensi, livelli aumentati delle due forme sono stati segnalati in modelli murini di overdose da paracetamolo e in studi clinici su pazienti con sovradosaggio da paracetamolo rispetto ai controlli sani; in particolare, questi valori erano sensibilmente più elevati in coloro che soddisfacevano i criteri per il trapianto epatico (Williams CD et al., 2011; Antoine DJ et al., 2012).

Le proprietà di questo marcatore sono:

- viene conservato tra i modelli di roditori e gli esseri umani
- è possibile una distinzione del tipo di meccanismo di danno (apoptosi vs. necrosi)
- è un marcatore precoce di ALI
- è predittivo di un aumento di ALT
- è un marcatore prognostico

c) *HMGB1 (High Mobility Group Box 1)*

Il gruppo box 1 ad alta mobilità (HMGB1) è una proteina strutturale, non istonica, della cromatina, abbondante nel nucleo di tutte le cellule eucariote dove ha un ruolo importante nel rimodellamento della cromatina (Bianchi ME 1989). È anche un mediatore fondamentale dell'infiammazione, in particolare nel caso di necrosi, ed è rilasciato sia attivamente che passivamente; livelli aumentati possono essere rilevati nel circolo ematico in seguito a sepsi, pancreatite, artrite reumatoide, nonché in modelli murini di tossicità da paracetamolo, confermando il ruolo di indicatore del processo di morte cellulare. Livelli più alti di questa proteina sono stati inoltre evidenziati anche in pazienti con PALI rispetto a controlli sani, con valori direttamente proporzionali alla gravità del danno epatico (Antoine DJ et al 2012; Vliegenthart ADB et al., 2015).

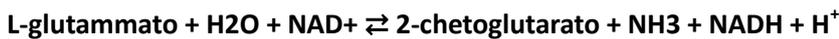
Le proprietà di questo marcatore sono:

- viene conservato tra i modelli di roditori e gli esseri umani
- è un marcatore prognostico
- è relazionato al meccanismo di danno (mediatore infiammatorio/necrosi)
- è un marcatore precoce di ALI
- è predittivo di un incremento delle ALT
- è un potenziale obiettivo terapeutico

d) *GLDH (glutammato deidrogenasi)*

La glutammato deidrogenasi (GLDH) è un enzima mitocondriale appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la deaminazione reversibile del glutammato ad  $\alpha$ -chetoglutarato più ammoniaca libera usando NAD o NADP come cofattore (Fang J et al., 2002).

È possibile chiarire la sua funzione con la seguente reazione,



opposta a quella catalizzata dalle transaminasi che trasferiscono il gruppo aminico dall'aspartato o dall'alanina all' $\alpha$ -chetoglutarato per ottenere glutammato più ossalacetato o piruvato.

È stato suggerito che il GLDH circolante possa essere un marcatore specifico per il danno mitocondriale. Un aumento del GLDH parallelo alle ALT è stato segnalato in topi con overdose da paracetamolo, ma non in animali trattati con furosemide, che crea necrosi epatica centro lobulare senza però coinvolgere i mitocondri (Wong SG et al., 2000; McGill MR 2012; Vliegenthart ADB et al., 2015).

Le proprietà di questo marcatore sono:

- viene conservato tra i modelli di roditori e gli esseri umani
- è predittivo di un incremento delle ALT

È stato messo in evidenza che anche il DNA mitocondriale circolante (mtDNA) può agire come molecola associata al danno mediato da cellule infiammatorie; aumenti delle concentrazioni di mtDNA circolante sono stati associati alla sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), alla sindrome da disfunzione multiorgano (MOF) e al danno epatico. Ne consegue che, come il GLDH, esso può essere un marcatore di danno mitocondriale indotto da paracetamolo (McGill MR et al., 2012; Krysko DV et al., 2011).

d) *KIM-1 (kidney injury molecule-1)*

La molecola-1 della lesione renale (KIM-1) è una glicoproteina trans membrana con attività fagocitaria a livello delle cellule tubulari prossimali del rene. Durante il danno renale acuto, i livelli ematici e urinari di KIM-1 aumentano rapidamente e difatti viene utilizzata come biomarcatore sensibile e specifico di danno renale acuto in modelli preclinici.

Per quanto riguarda il danno a livello delle cellule del tubulo prossimale renale indotto da paracetamolo, dati di modelli animali hanno dimostrato che KIM-1 si modifica più precocemente rispetto alla creatinina e in uno studio su una coorte di pazienti con PALI si è dimostrata più sensibile e specifica della creatinina, con valori molto più elevati in pazienti con esiti peggiori (trapianto o morte) (Antoine DJ et al., 2015).

Le proprietà di questo marcatore sono:

- viene conservato tra i modelli di roditori e gli esseri umani
  - è un marcatore prognostico
  - ha un test diagnostico efficace e con un rapido tempo di risposta
  - è formalmente accreditato per l'indagine di danno renale farmaco-indotto in campo preclinico
- e) *miRNA-122 (microRNA-122)*

I microRNA (miRNA) sono piccoli (~ 22 nucleotidi lunghi) frammenti di RNA non codificanti, coinvolti nel meccanismo post trascrizionale della regolazione dell'espressione genica. Anche se un certo numero di miRNA sono pleiotropicamente espressi, alcuni miRNA sembrano essere altamente collegati a un organo specifico. Il tessuto epatico esprime distinti tipi di miRNA, ma tra di essi il 70% è rappresentato dal miR-122, il quale ha anche un'espressione molto bassa o nulla in altri tessuti sani (Liang Y et al., 2007). Il miR-122 modula altresì molteplici vie coinvolte nella risposta allo stress (Bhattacharyya SN et al., 2006), nel metabolismo degli acidi grassi (Esau C et al., 2006), nella sintesi del colesterolo (Krutzfeldt Jet al., 2006) e nel carcinoma epatocellulare (Tsai WC et al., 2012).

I miRNA circolanti, come il miR-122-5p e il miR-192-5p, entrambi altamente concentrati nel tessuto epatico, presentano variazioni ematiche dipendenti dalla dose e dal tempo di esposizione allo xenobiotico, le quali si rivelano essere parallele ai livelli sierici di aminotransferasi e all'istopatologia della degenerazione del fegato (Wang K et al., 2009). A conferma della specificità epatica del miR-122, in uno studio relativamente recente Zhang et al. hanno dimostrato che in pazienti con danno muscolare da polimiosite o conseguente a esercizio fisico vi era un aumento delle ALT, senza un concomitante aumento del miR-122 (Zhang Y et al., 2010; Vliegenthart ADB et al., 2015).

Le proprietà di questo marcatore sono:

- viene conservato tra i modelli di roditori e gli esseri umani
- è specifico per il danno epatico

- è un marcatore precoce di ALI
- è predittivo di un incremento delle ALT

#### *Recenti studi relativi ai nuovi biomarcatori*

Negli anni numerosi studi si sono succeduti per valutare il ruolo di questi nuovi biomarcatori nel danno epatico indotto da paracetamolo (Vliegthart ADB et al., 2015; Wang K et al., 2009; Antoine DJ et al., 2012 e 2013; McGill MR et al., 2012).

Secondo due recenti studi prospettici di coorte, effettuati nel Regno Unito e approfonditi da Dear et al. nel corso di quest'ultimo anno, non è la prevalenza di un biomarcatore rispetto ad altri a essere efficace, quanto piuttosto è il ricorso alla combinazione dei nuovi biomarcatori ematici che consentirebbe di stratificare il rischio di danno epatico in caso di overdose da paracetamolo in maniera migliore rispetto al solo utilizzo delle transaminasi.

Nel primo studio, sono stati misurati i livelli di quattro marcatori di danno epatico (microRNA-122, cheratina-18, HMGB1 e glutammato deidrogenasi) in 985 pazienti giunti in pronto soccorso per una overdose da paracetamolo. Il prelievo è stato eseguito prima di iniziare la terapia endovenosa con N-acetilcisteina. In base ai risultati di questi marcatori, i pazienti venivano suddivisi in gruppi per valutare in seguito i diversi esiti, ovvero la presenza di un danno epatico acuto tale da continuare il trattamento con N-acetilcisteina oltre la durata abituale.

Nel secondo studio, sui 202 pazienti coinvolti sono stati applicati i dati ottenuti nel primo studio per convalidare l'attendibilità dei biomarcatori. La combinazione dei quattro marcatori forniva dati più attendibili per la stratificazione del rischio epatico rispetto al solo dosaggio della ALT ( $p < 0,0001$  in entrambe le coorti) (Dear J et al., 2018).

Ulteriori studi clinici porteranno sempre maggiore chiarezza in merito all'affidabilità di questi nuovi biomarcatori nel PALI. Nondimeno, nuove terapie volte a ridurre l'infiammazione e alla rigenerazione tissutale si stanno sviluppando proprio mediante l'utilizzo di questi che, se oggi sono solo biomarcatori, un domani potrebbero essere anche target terapeutici; questi studi sono ancora soltanto in fase di sperimentazione iniziale.

Riflettendo sulle caratteristiche dei differenti biomarcatori e confrontando i vari studi sull'argomento, sono emerse alcune proprietà essenziali del miR-122 che lo rendono ottimale come nuovo

biomarcatore di danno epatico nel sovradosaggio da paracetamolo: per queste motivazioni, parte del lavoro sperimentale è incentrato sullo studio del miR-122.



## 5. Intossicazione da macromiceti

### 5.2 Epidemiologia

L'avvelenamento da funghi rappresenta un'importante problematica medica in tutto il mondo, Italia compresa.

L'incidenza dell'avvelenamento da funghi varia geograficamente a seconda del clima, presenza di funghi tossici, stile di vita e tradizioni locali. L'ingestione di funghi tossici può essere correlata a **(Persson H, 2016)**:

- confusione tra specie commestibili e velenose;
- ignoranza dei rischi;
- ingestione intenzionale di funghi psicotropi;
- ingestione accidentale da parte dei bambini;
- ingestione a scopo suicidario (raro).

I soggetti più frequentemente coinvolti sono "esperti" autoctoni che vengono tratti in inganno da diverse variabili morfologiche del fungo, ma anche giovani adulti in cerca di funghi a scopo psicodislettico (funghi allucinogeni), immigrati che confondono specie velenose con quelle eduli presenti nei paesi di origine, escursionisti e militari (Diaz JH, et al., 2018).

Tra migliaia di specie di funghi in tutto il mondo, meno di cento sono gravemente tossiche. La maggior parte degli avvelenamenti da macromiceti è causata da funghi sconosciuti e la maggior parte delle tossine fungine causa avvelenamento lieve o moderato, spesso solo gastroenterite (sindrome resinosa o gastroenterica); tuttavia, l'ingestione di alcune specie di funghi estremamente velenosi può provocare danno epatico irreversibile ed exitus.

Gli avvelenamenti più temuti sono quelli causati da funghi citotossici contenenti amatossine e fallotossine, come l'*Amanita phalloides* e *Amanita virosa*, che causano gravi gastroenteriti e danno epatico (sindrome falloidea). L'orellanina, presente in alcuni *Cortinarius* spp., può indurre danno renale grave e persistente. Effetti drammatici, ma raramente letali sono causati da funghi contenenti neurotossine come la muscarina (*Clitocybe* e *Inocybe* spp.), Psilocibina (*Psilocybe* e *Panaeolus* spp. e funghi "magici"), isossazoli (*Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*) e giromitrina (*Gyromitra esculenta*).

Il trattamento si concentra sulla sintomatologia generale e il trattamento supportivo, sebbene esistano antidoti per i funghi contenenti muscarina (atropina), giromitrina (piridossina) e amatossine (n-acetilcisteina, penicillina, silibinina) (Persson H, 2016).

Essendo la sindrome falloidea, la più grave manifestazione di intossicazione è pertanto di primaria importanza individuare precocemente le intossicazioni da funghi contenenti amatossine al fine di assicurare al paziente il trattamento appropriato (Diaz JH, et al., 2018).

Per far ciò è di primaria importanza distinguere se la sintomatologia gastroenterica e correlata ad una sindrome resinoidale o una sindrome falloidea.

### 5.3 Intossicazioni a breve e lunga incubazione

Le intossicazioni da funghi che causano gastroenterite (sindrome resinoidale e sindrome falloidea) vengono classificate in base alla durata del tempo di latenza fra assunzione e comparsa della sintomatologia: si distinguono sindromi a breve incubazione, caratterizzate dalla comparsa precoce dei sintomi (da 30 minuti a 4 ore dall'ingestione), e sindromi a lunga incubazione, caratterizzate dalla comparsa tardiva dei sintomi (dopo 6-12 ore e oltre, fino a 24 ore - 5 giorni dall'ingestione).

Le sindromi a breve incubazione sono di tipo funzionale e raramente letali (se non nei bambini o in pazienti debilitati).

Le sindromi a lunga incubazione sono invece responsabili della più alta incidenza di mortalità; ciò è dovuto non solo al danno lesionale citotossico causato dalle tossine contenute in queste specie di funghi, ma anche al fatto che la comparsa tardiva dei sintomi iniziali può indurre a consumare, durante il periodo di latenza, ulteriori quantità dello stesso fungo. I primi sintomi, inoltre, possono avere carattere lieve e di breve durata, ed essere seguiti da una fase di remissione spontanea con relativo benessere prima del manifestarsi del danno lesionale d'organo. Questo può essere causa di una possibile sottovalutazione della gravità dell'intossicazione sia da parte del paziente che del medico, portando in molti casi al ricovero e al trattamento ospedaliero in fase ormai tardiva (Crevani M, 2015).

Fra le sindromi a lunga incubazione riveste primaria importanza la **sindrome falloidea**, causata da funghi contenenti amatossine e fallotossine.

Le fallotossine sono responsabili del danno a livello della membrana cellulare degli enterociti e delle iniziali manifestazioni gastroenteriche (Broussard C et al, 2001), mentre le amatossine (tra cui la principale è la  $\alpha$ -amanitina) determinano il danno citotossico a livello epatico (Lindell TJ et al, 1970).

#### 5.4 Amatossine e fallotossine

I funghi responsabili di effetti epatotossici contengono diversi ciclopeptidi. Due classi di questi peptidi resistenti al calore, le amatossine e le fallotossine, sono responsabili dei sintomi dell'intossicazione. Sono stati identificati anche altri peptidi, che non sembrano tuttavia rivestire alcun ruolo tossico nell'uomo; esempi di questi sono l'amanullina, l'amanina e le virotossine, identificate fino ad ora soltanto nell'*Amanita virosa*.

Le **fallotossine** sono eptapeptidi diciclici che, non essendo assorbiti a livello enterico, non entrano in gioco nel derminismo del danno epatico: esse sono tuttavia responsabili delle manifestazioni gastroenteriche dovute al danno a livello della membrana enterocitaria (Broussard C et al, 2001; Wieland T e Faulstich H, 1978). Più specificamente esse, una volta attraversato il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare enterocitaria, stimolano la polimerizzazione della G-actina e stabilizzano, legandosi tenacemente ad essi, i filamenti di F-actina (Wieland, 1967).

Le **amatossine**, responsabili dei danni a carico del fegato, sono octapeptidi diciclici che agiscono principalmente come inibitori dell'RNA polimerasi nucleare di molti organismi eucarioti; tra esse le più importanti sono la  $\alpha$ - e la  $\gamma$ -amanitina e la  $\beta$ -amanitina. Sono peptidi termostabili, insolubili in acqua e non perdono attività in seguito ad essiccazione se non in un lasso di tempo lungo molti anni (Faulstich H, 1977).

#### 5.5 Contenuto di tossine nei funghi

Amatossine e fallotossine sono contenute in molti generi di funghi, tra cui alcune Amanite (*Amanita phalloides*, *Amanita virosa*, *Amanita verna*), alcune Galerine (*Galerina autumnalis*, *Galerina venerata*, *Galerina marginata*) e alcune Lepiote (*Lepiota helveola*, *Lepiota subincarnata*, *Lepiota brunneoincarnata*).

I dati attualmente disponibili in letteratura riportano l'esistenza di 35 specie di funghi contenenti amanitina, di cui 10 appartenenti al genere *Amanita*, 9 al genere *Galerina* e 16 al genere *Lepiota* (**Tabella 3**).

Si ritiene probabile, ma non ancora confermata, la presenza di amanitina in altre 8 specie di *Lepiota* (Klan J, 1993; Enjalbert F et al, 2002).

<b>Specie di <i>Amanita</i></b>	<b>Specie di <i>Galerina</i></b>	<b>Specie di <i>Lepiota</i></b>	
<u><i>A. phalloides</i></u>	<i>G. autumnalis</i>	<u><i>L. brunneoincarnata</i></u>	<i>L. helveda</i>
<i>A. bisporigena</i>	<i>G. badipes</i>	<i>L. brunneolilacea</i>	<i>L. josserandii</i>
<i>A. decipiens</i>	<i>G. beinrothii</i>	<i>L. castanea</i>	<i>L. kuehneri</i>
<i>A. hygroskopica</i>	<i>G. fasciculata</i>	<i>L. clypedarioides</i>	<i>L. langei</i>
<i>A. ocreata</i>	<i>G. helvoliceps</i>	<i>L. felina</i>	<i>L. ochraceofulva</i>
<i>A. suballiacea</i>	<u><i>G. marginata</i></u>	<i>L. fulvella</i>	<i>L. pseudohelveola</i>
<i>A. tenuifolia</i>	<u><i>G. sulcipes</i></u>	<i>L. griseovirens</i>	<i>L. subincarnata</i>
<i>A. verna</i>	<i>G. unicolor</i>	<i>L. heinei</i>	<i>L. xanthophylla</i>
<u><i>A. virosa</i></u>	<i>G. venerata</i>		
<i>A. magnivelaris*</i>			
* sospetto contenuto di amatossine basato sulle manifestazioni cliniche conseguenti all'ingestione del fungo; presenza non confermata da tecniche cromatografiche.			

**Tabella 3:** Specie di funghi contenenti amanitina. Sono sottolineate quelle contenenti le concentrazioni di tossine più elevate.

Almeno 22 di queste 35 specie crescono spontaneamente in Europa: 3 del genere *Amanita*, 8 del genere *Galerina*, 11 del genere *Lepiota*. In base al quantitativo di tossine presenti, la *Galerina sulcipes* è risultato il fungo a maggiore tossicità, seguito da *Amanita phalloides*, *A. virosa*, *Galerina marginata* e *Lepiota brunneoincarnata* (Klan J, 1993).

Nella specie *Amanita phalloides* la quantità media di tossine contenuta in un grammo di fungo fresco è pari a 0.78 mg; il 62% circa è rappresentato da fallotossine, il rimanente 38% da amatossine (tab. 2). Venti

grammi di fungo fresco contengono quindi circa 6 mg di tossina, molto più della dose di amanitina considerata letale per l'uomo: 0.1 mg/Kg (Faulstich H, 1979). Nel fungo secco (prendendo in considerazione l'*A. phalloides* di origine europea, la quale contiene più tossine rispetto a quella che cresce nel Nord America) il contenuto di amatossine risulta compreso tra 3 e 5 mg/g, di cui il 43% è rappresentato da  $\alpha$ -amanitina, il 49% da  $\beta$ -amanitina e il restante 8% da  $\gamma$ -amanitina (Enjalbert F et al, 1993).

Le falloidine sono presenti in un quantitativo di circa 2,4 mg/g di fungo secco, anche se in alcuni campioni sono risultate del tutto assenti (Stijve T e Seeger T, 1979).

La quantità e il rapporto tra le diverse tossine contenute nei funghi del genere *Amanita* non sono costanti: è stata documentata una notevole variabilità dal punto di vista quantitativo tra esemplari di *A. virosa* e *A. verna* (Zhang X et al, 1998). Nei funghi della specie *A. verna* Bull. sono state riscontrate quantità analoghe di tossine, in campioni di *A. verna* di origine americana è stata invece segnalata la possibilità di riscontrare la sola  $\beta$ -amanitina, peraltro in tracce (Seeger R e Stijve T, 1979). **Tabella 4**

	<i>A. phalloides</i>	<i>A. verna</i>
<b>Amanitine</b> (mg/g fungo secco)	2,010-7,300	2,250-4,570
<b><math>\alpha</math>-amanitina</b>	43 %	~ 44 %
<b><math>\beta</math>-amanitina</b>	49 %	~ 44 %
<b><math>\gamma</math>-amanitina</b>	8 %	12 %
<b>Falloidine</b> (mg/g fungo secco)	2,400	non valutate

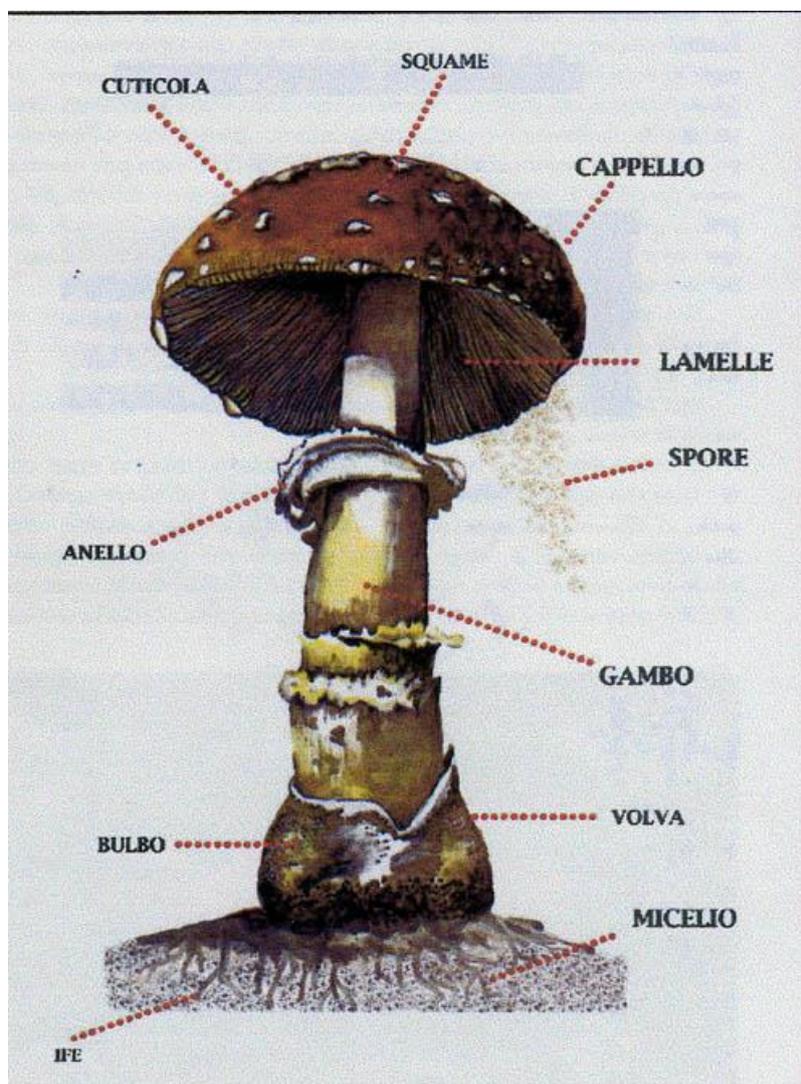
**Tabella 4.** Contenuto di amanitine in *Amanita phalloides* e *A. verna*

Anche nello stesso tipo di fungo è possibile rilevare concentrazioni differenti di tossine, in quanto numerosi sono i fattori, ambientali e intrinseci, che determinano questa variabilità.

In parti diverse del carpoforo dello stesso fungo (**Figura 22**), ad esempio, è possibile rilevare una diversa concentrazione di tossine. In uno studio effettuato su 25 esemplari di *Amanita phalloides* il contenuto di amatossine è risultato maggiore nei tessuti di gambo, lamelle, cappella e anello, mentre le fallotossine sono

maggiormente rappresentate in volva e bulbo. La quantità di tossine presenti dipende inoltre dallo stadio maturativo del fungo, essendo minore nelle prime fasi dello sviluppo (Enjalbert F et al, 1999).

Un ulteriore fattore che influenza in modo rilevante la concentrazione delle componenti tossiche del fungo è costituito dalle caratteristiche dell'habitat di crescita, in particolare del suolo (Enjalbert F, et al, 1999). Funghi raccolti nella medesima stagione in sedi diverse possono presentare una concentrazione di tossine con un fattore di variabilità pari a 1.7. Parallelamente, nella stessa sede di raccolta, la quantità di tossine contenuta in Amanite presenta un fattore di variabilità di 3.7 (Stijve T e Seeger T, 1979). Queste variabili contribuiscono a rendere conto della maggiore concentrazione di amatossine dell'*Amanita phalloides* di origine europea (circa 5,2 mg/g di fungo secco) rispetto a quella di origine nordamericana (circa 4 mg/g di fungo secco) (Vetter J, 1998).



**Figura 22.** anatomia del fungo

## 5.6 Struttura chimica delle tossine

Le diverse sostanze tossiche contenute nell'*A. phalloides* furono isolate da Lynen e U. Wieland tra il 1937 e il 1941 (Lynen F e Wieland U, 1937). La Seconda Guerra Mondiale interruppe le ricerche, che ripresero subito dopo la sua fine, beneficiando dei metodi moderni di separazione dei composti chimici, come la cromatografia su carta, l'elettroforesi e l'estrazione controcorrente. Questi studi portarono alla scoperta che l'amanitina è in realtà costituita da due tossine: uno neutro (l' $\alpha$ -amanitina) e uno acido (la  $\beta$ -amanitina).

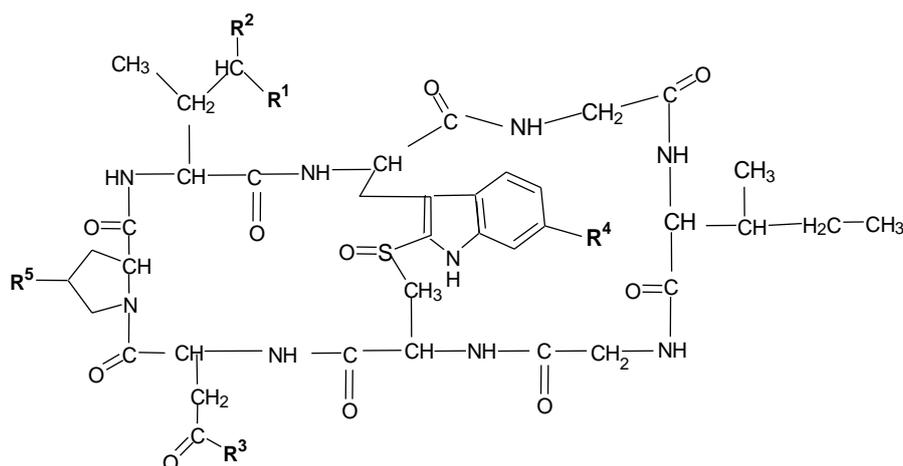
Sia le amatossine che le fallotossine sono composti incolori, principalmente cristallini, solubili in acqua, metanolo e altri solventi organici polari.

Possono essere caratterizzate al meglio mediante le già citate procedure cromatografiche, seguite da specifiche reazioni colorimetriche. Possono tuttavia essere caratterizzate anche mediante l'analisi degli aminoacidi, lo spettro UV, gli spettri ORD e CD e mediante valutazione della loro tossicità nel topo bianco (Wieland T e Faulstich H, 1978).

Non esiste enzima in grado di degradarle e il calore a 100° C per diversi minuti non le distrugge (Wieland T e Faulstich H, 1978).

Dal punto di vista puramente strutturale, queste tossine condividono alcune caratteristiche (Wieland T, 1964; Wieland T, 1967):

- sono peptidi di peso molecolare intorno a 1000 Dalton, comprendenti un certo numero di aminoacidi (sette per le fallotossine, otto per le amatossine) che entrano a far parte di una struttura ciclica (**Figura 23**). In particolare, le amatossine hanno in comune una sequenza ciclica di otto peptidi (Wieland T e Gebert U, 1966).
- questi ciclopeptidi hanno in comune un aminoacido  $\beta$ -idrossilato (derivato dalla L-leucina per le fallotossine, dalla L-soleucina per le amatossine) e un atomo di zolfo proveniente dalla cisteina, legato ad un residuo indolico di triptofano, che divide i ciclopeptidi in due parti;
- queste molecole assorbono tutte intensamente la luce ultravioletta, con un picco massimo a 300 nm.



**Figura 23:** struttura ciclica delle amatossine. L'atomo di zolfo divide la struttura in due parti.

Tossine	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	DL <sub>50</sub> (mg/kg)
α-amanitina	CH <sub>2</sub> OH	OH	NH <sub>2</sub>	OH	OH	0.3
β-amanitina	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH	OH	OH	0.5
γ-amanitina	CH <sub>3</sub>	OH	NH <sub>2</sub>	OH	OH	0.2
ε-amanitina	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OH	0.3
Amanina	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH	H	OH	0.5
Amaninamide	CH <sub>2</sub> OH	OH	NH <sub>2</sub>	H	OH	0.3
Amanullina	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH	20
Acido amanullinico	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH	20
Proamanullina	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	OH	H	20

**Tabella 5:** residui delle catene laterali che entrano a far parte delle specifiche tossine e DL<sub>50</sub> di ciascuna di esse (Vetter J 1998).

Le amatossine, per idrolisi acida, liberano gli aminoacidi di cui sono costituite, in seguito alla rottura del ponte sulfossido (Wieland T e Gebert U, 1966): due molecole di glicina, una molecola di acido L-aspartico, una molecola di isoleucina, una molecola di L-idrossiprolina, una molecola di L-isoleucina e la L-γ-idrossi-isoleucina in forma lattonica per la γ- e la ε-amanitina, la L-γ-δ-diidrossi-isoleucina per l'α- e la β-amanitina, nonché per l'amanina. **Tabella 5**

L'amanullina, non tossica, contiene nel sito della catena laterale  $\beta$ -idrossilato una molecola di isoleucina (Wieland T e Buku A, 1968): ciò sottolinea l'importanza di questa catena per la tossicità delle amatossine.

Da studi chimici delle tossine risulta che:

- i derivati monociclici delle amatossine non sono tossici;
- l'accorciamento della catena laterale al residuo 3 altera l'affinità della tossina per l'enzima RNA-polimerasi II, dimostrando quindi la necessità di un numero minimo di atomi di carbonio in questa posizione per avere un'azione tossica;
- la coniugazione delle amatossine con molecole come l'albumina, la  $\beta$ -globulina, la polilisina e il destrano le rende più tossiche delle tossine da sole.

Cercando componenti minori delle fallotossine nella parte lipofila degli estratti di *A. phalloides*, Wieland T and Faulstich H. (1978) ottennero una frazione che, pur contenendo fallotossine, si è rivelata atossica nei test sugli animali. Il sospetto principio antitossico venne purificato, cristallizzato e caratterizzato come un decapeptide ciclico chiamato antamanide.

La percentuale di questo peptide all'interno del fungo può essere responsabile della tossicità dello stesso.

## 5.7 Tossicocinetica dell'amanitina

### 5.7.2 Tossicocinetica in condizioni sperimentali

Gli studi di tossicocinetica dell'amanitina sono stati tradizionalmente condotti utilizzando la via di somministrazione parenterale. Ciò ha limitato sensibilmente l'utilità dei dati ottenuti ai fini della valutazione delle intossicazioni nell'uomo.

Un solo studio ha valutato la cinetica dell'amanitina dopo somministrazione orale di una  $DL_{100}$  (250 mg/kg di estratto secco di *Amanita* contenente 1.9 mg/g di amanitina) nel cane. Il picco plasmatico è stato registrato dopo 1-8 ore dall'ingestione; dopo 20 ore dalla somministrazione dell'estratto non erano più rilevabili tracce di amanitina nel plasma. Il picco plasmatico è risultato pari a 38.4 ng/ml, inferiore a quanto teoricamente atteso (Busi C et al, 1977). Tuttavia basse concentrazioni di amanitina nel circolo sistemico non escludono la presenza di concentrazioni maggiori nel sangue portale o una rapida captazione epatica (Faulstich H et al, 1985).

Nel plasma del topo la concentrazione di  $\alpha$ -amanitina, analizzata con metodica radioimmunologica un'ora dopo somministrazione intraperitoneale di una DL<sub>100</sub>, è risultata pari a 100 ng/ml (Fiume L et al, 1975).

Dopo somministrazione per via endovenosa di  $\alpha$ - e  $\gamma$ -amanitina marcate, il volume di distribuzione delle tossine è risultato analogo al volume dello spazio extracellulare, in accordo con il carattere polare delle molecole. Non è stato documentato legame con le proteine plasmatiche (Faulstich H et al, 1985). In un altro studio l'amanitina non è stata più rilevata nel plasma a 5 ore dall'ingestione e la dose somministrata è stata eliminata nelle urine entro 6 ore (Faulstich H e Fauser U, 1973).

Non è però mai stata dimostrata una correlazione tra le concentrazioni plasmatiche di amatossine e la gravità del quadro clinico, né con l'esito del paziente (Crevani M. 2015).

Più dell'80% dell'amanitina viene eliminata per via renale, con una *clearance* sovrapponibile a quella della creatinina. Come suggerito dalla *clearance* elevata, l'emivita di  $\alpha$ - e  $\gamma$ -amanitina è breve e oscilla tra 26.7 e 49.6 min (Faulstich H et al, 1985).

L'amanitina è eliminata per circa il 10% per via biliare. Questa quota, seppur modesta, può influire sul decorso dell'intossicazione, poiché il ricircolo enteroepatico apporta nuovamente al fegato parte delle tossine (Faulstich H et al, 1985).

La rilevanza di questo aspetto tossicocinetico è supportata da dati sperimentali che indicano che l'induzione sperimentale di fistola biliare aumenta la sopravvivenza dopo somministrazione di dosi letali di amanitina (Faulstich H et al, 1985).

Il peso molecolare inferiore a 1000 Dalton (Wieland T, 1972) comporta che le tossine possano filtrare attraverso i glomeruli renali con la preurina. Le ricerche sperimentali di Fiume e Coll (Fiume L et al, 1969) hanno suggerito la possibilità che nel topo le amatossine filtrate con la preurina vengano poi parzialmente riassorbite a livello dei tubuli contorti prossimali. L'alta concentrazione di amanitine in questa parte del nefrone sarebbe così la causa della necrosi irreversibile a cui va incontro questo organo.

Il fatto che, in seguito all'iniezione di amatossina nel ratto, le lesioni si riscontrino solo a livello epatico, fa supporre che in questi animali le cellule epiteliali tubulari non siano in grado di effettuare il riassorbimento della tossina (Fiume L et al, 1969).

Nell'uomo il meccanismo di eliminazione attraverso l'emuntorio renale non è ancora del tutto chiarito, soprattutto per quanto riguarda la possibilità di riassorbimento dell'amanitina a livello del tubulo contorto prossimale (Crevani M. 2015).

### 5.7.3 Tossicocinetica nelle intossicazioni

In tutti gli studi effettuati sulla cinetica dell'amanitina in pazienti intossicati, la presenza della tossina non è stata rilevata nel plasma oltre le 48 ore dall'ingestione dei funghi, ad eccezione dei casi con insufficienza renale acuta.

I livelli plasmatici di  $\alpha$ - e  $\beta$ -amanitina riscontrati sono rispettivamente risultati pari a 8-190 ng/ml e 15.9-162 ng/ml. Non è però mai stata dimostrata una correlazione tra le concentrazioni plasmatiche di amatossine e la gravità del quadro clinico, né con l'outcome del paziente (Faulstich H et al, 1985; Jaeger A et al, 1993).

Nei pazienti per i quali è stato possibile determinare il valore dell'amanitina su campioni di plasma e urine prelevati simultaneamente, la concentrazione urinaria della tossina è risultata da 10 a 100 volte maggiore rispetto a quella plasmatica. In alcuni casi sono stati riscontrati elevati livelli di amanitina urinaria nonostante la tossina fosse completamente assente nel plasma (Jaeger A et al, 1993).

Dallo studio di Costantino e Coll. (1977) effettuato su due pazienti giunti in pronto soccorso con un quadro sintomatologico compatibile con quello da intossicazione falloidea (anamnesi positiva per ingestione di funghi non controllati, lunga latenza di comparsa dei sintomi) e monitorati per quanto riguarda i valori di amanitina nel plasma e nelle urine, è risultato che

- i valori plasmatici possono subire notevoli variazioni interindividuali a seconda di fattori come il diverso assorbimento intestinale, le condizioni del fegato, i cibi e le bevande assunti in concomitanza con l'ingestione dei funghi, ecc.
- l'eliminazione massiva nelle urine avviene entro 24-26 ore dall'ingestione dei funghi.

È ragionevole assumere che nell'uomo, come nell'animale, il volume di distribuzione dell'amanitina corrisponda allo spazio extracellulare (Faulstich H et al, 1985).

Esperienze effettuate con un coniugato albumina-amanitina hanno inoltre dimostrato che quest'ultimo è dotato di una tossicità di gran lunga superiore a quella della tossina non coniugata (Cessi C e Fiume L, 1969; Derenzini M et al, 1973).

Partendo da questi presupposti Floersheim (Floersheim GL, 1971) ha supposto che *in vivo* l'amanitina si leghi alle albumine sieriche e che tale legame ne aumenti la tossicità, sia favorendone la captazione cellulare per pinocitosi, sia impedendone l'escrezione renale, condizionando quindi una più lunga permanenza in circolo.

Queste osservazioni hanno rappresentato per anni il razionale della somministrazione nei pazienti intossicati, a scopo terapeutico, di sostanze dotate di alta affinità per l'albumina (penicillina, Bactrim, fenilbutazone, ecc.) e quindi in grado di competere con le amatossine per il legame all'albumina (Costantino D et al, 1977). Sarebbe quindi auspicabile un intervento il più precoce possibile nei confronti del legame tra amanitina ed albumina, volto a spiazzare la tossina.

Nell'uomo la principale via di eliminazione delle amatossine è quella urinaria. È ampiamente documentata l'escrezione di elevate dosi di amanitina nelle prime 24 ore successive all'ingestione (Vesconi S et al, 1985); la tossina è comunque è stata comunque rilevata nelle urine fino a 72 ore e, in alcuni casi, fino a 96 ore dal consumo dei funghi (Piqueras J, 1989).

Non sono disponibili dati circa la *clearance* dell'amanitina nell'uomo; i dati sperimentali non sono applicabili all'uomo in quanto i processi di secrezione, riassorbimento ed escrezione tubulari delle specie testate sono diversi (Faulstich H et al, 1985).

Nell'uomo, metodiche di depurazione extrarenale come l'emoperfusione sono di dubbia utilità, dato che la breve emivita delle tossine rende queste metodiche indicate solo in caso di elevate quote di riassorbimento tubulare o in caso di rallentata escrezione renale a causa di compromissione dell'organo emuntore. Inoltre, sebbene un basso livello di amanitina nella circolazione sistemica non escluda la presenza di elevati livelli nel circolo portale, la quota presente a questo livello è inaccessibile all'emoperfusione. La tossina ricircolante può però essere ridotta notevolmente con la somministrazione ripetuta di un adsorbente a livello gastrico e duodenale, in grado di legare sia la quota ricircolante sia la quota secreta nel duodeno o nel tratto iniziale del digiuno (Jaeger A et al, 1993; Piqueras J, 1989).

Sono state riscontrate concentrazioni misurabili di amatossine nell'aspirato gastroduodenale di pazienti intossicati 2-5 giorni dopo l'ingestione dei funghi (Jaeger A et al, 1993; Piqueras J, 1989). Riscontri così tardivi suggeriscono che la presenza di amanitina non sia più attribuibile alla permanenza di residui del pasto consumato, ma che le amatossine subiscano un processo di secrezione biliare. Quantitativamente, tuttavia, l'escrezione biliare di amatossine nell'uomo appare modesta (Jaeger A et al, 1993; Busi C et al, 1979).

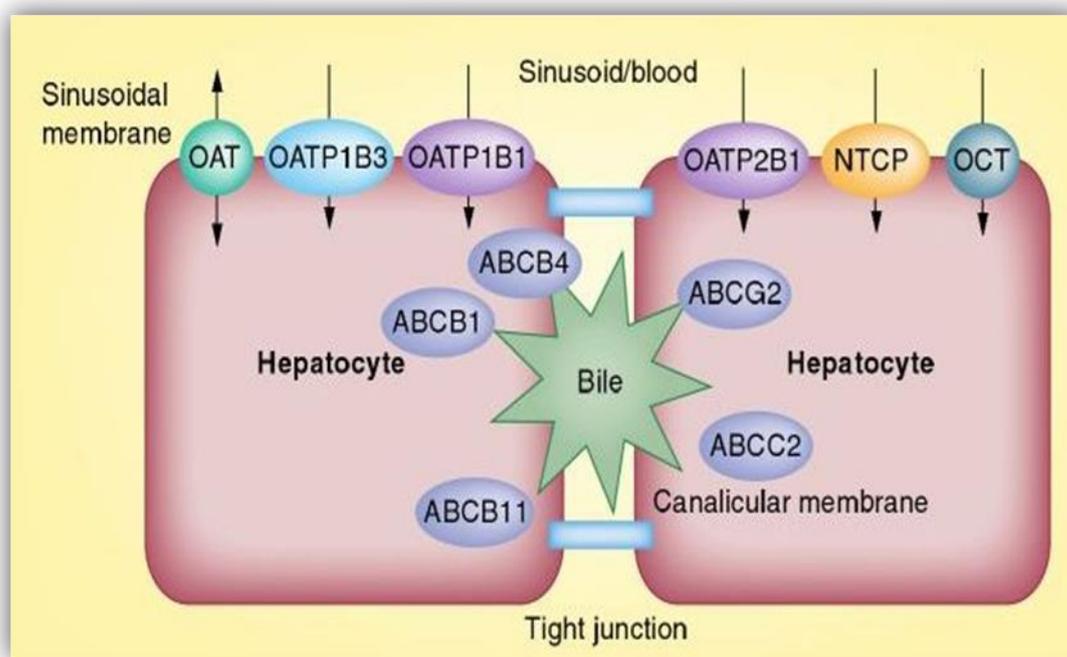
Le amatossine eliminate con le feci sono verosimilmente costituite dalla quota non assorbita e da quanto sfugge al ricircolo entero-epatico. In un paziente è stata documentata l'escrezione per via fecale di 6.3 mg nelle 24 ore, pari ad una dose potenzialmente letale (Jaeger A et al, 1993).

Le concentrazioni di amatossine nei tessuti epatico e renale sono state documentate in 4 pazienti. Nel fegato sono state osservate concentrazioni elevate tra i 9 e 22 giorni dopo l'ingestione dei funghi. La

concentrazione riscontrata nel rene è risultata 6-90 volte superiore rispetto a quella osservata nel parenchima epatico (Jaeger A et al, 1993).

## 5.8 Meccanismo d'azione

La captazione epatica della tossina circolante avviene mediante legame a un trasportatore situato sulla membrana basolaterale degli epatociti. Questo trasportatore fa parte della famiglia di polipeptidi *carrier* OATP, sodio-indipendenti, tra i quali l'OATP1B3 è stato dimostrato essere quello maggiormente implicato (**Figura 24**) (Letscher K et al, 2006). I substrati endogeni dell'OATP1B3 sono, tra gli altri, acidi biliari, steroidi e loro coniugati, ormoni tiroidei, prostaglandine e vari peptidi.



**Figura 24:** trasportatore OATP 1B3 sulla membrana basolaterale dell'epatocita (Letscher K et al, 2006)

L'azione delle amatoossine, in particolare dell' $\alpha$ -amanitina, non è ancora stata del tutto chiarita. Certo è il suo ruolo di inibizione nei confronti della sintesi proteica, esplicato mediante legame selettivo 1:1 alla RNA-polimerasi II nucleoplasmica di diverse cellule eucariote. L' $\alpha$ -amanitina inibisce specificatamente questo enzima, mentre non si lega agli enzimi RNA-polimerasi I (nucleolare) e III (nucleoplasmica) (Stirpe F e Fiume L, 1967; Kedinger et al, 1970; Roeder & Rutter, 1970; Chambon et al, 1972).

Il legame avviene direttamente con l'enzima in una specifica tasca e la mancata interazione tra la tossina e il DNA è dimostrata dal fatto che l'aggiunta di DNA alle colture testate non modifica quantitativamente l'attività inibitoria della tossina (Lindell T J et al, 1970).

Esperimenti *in vivo* hanno però dimostrato che l' $\alpha$ -amanitina compromette sia la sintesi dell'RNA messaggero (prodotto dalla RNA-polimerasi II nucleoplasmica) che quella dell'RNA ribosomiale (prodotto dalla RNA-polimerasi I nucleolare). Di fatto, l'amanitina non si lega direttamente all'RNA polimerasi I: la frammentazione nucleolare osservata in seguito all'iniezione di  $\alpha$ -amanitina nelle cellule epatiche, non dipende da un'azione inibitoria nei confronti dell'RNA-polimerasi I (nucleolare), ma è in realtà dovuta ad una parziale dipendenza (diretta o indiretta) della struttura nucleolare dall'attività dell'enzima RNA-polimerasi II e non solo dall'enzima RNA-polimerasi I (Lindell T J et al, 1970). Questo dato è avvalorato dalla dimostrazione che l'inibizione della sintesi dell'RNA nucleolare è preceduta da una riduzione dell'attività dell'RNA-polimerasi II nucleoplasmica (Tata JR et al, 1972).

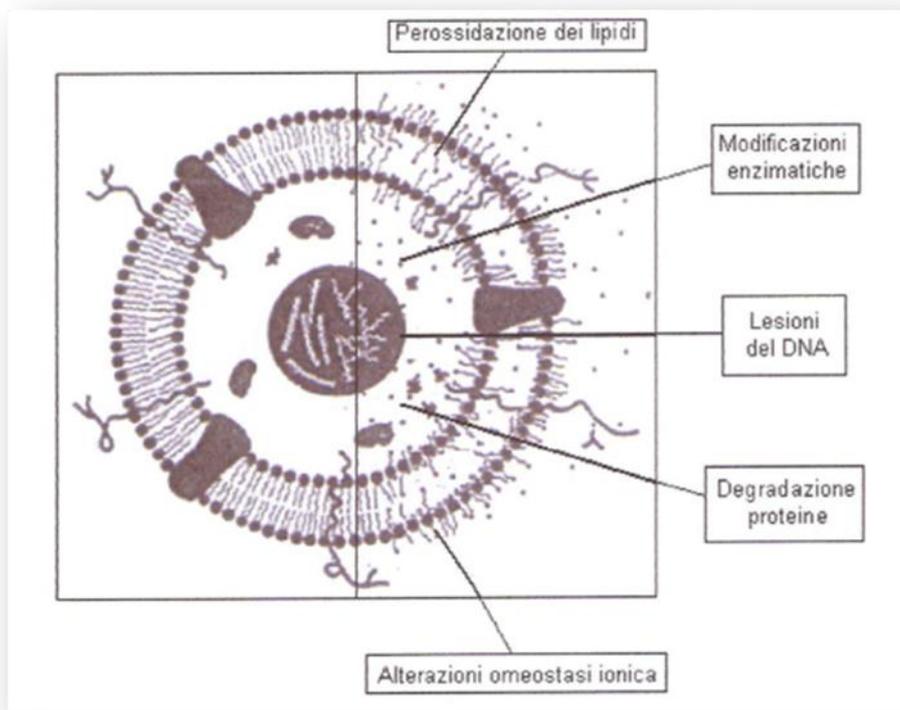
Si possono notare differenze tra l'attività della tossina *in vivo* e *in vitro*: mentre *in vitro* la sintesi dell'RNA extranucleolare risulta potenziata, probabilmente per effetto della tossina solo sull'enzima RNA polimerasi II, al contrario *in vivo* risulta compromessa l'incorporazione di precursori marcati sia nell'RNA nucleolare che in quello extranucleolare. Questa differenza può essere spiegata dal fatto che *in vivo*, per azione della tossina, l'RNA polimerasi I trasli dal nucleolo allo spazio extranucleolare, e che in tal caso si verifichi che l'enzima non sia attivo nella sintesi dell'RNA oppure l'RNA sintetizzato sia repentinamente digerito dalle nucleasi nucleari (Sekeris CE e Schmid W, 1972).

L'osservazione al microscopio elettronico di colture epatocitarie di ratto dopo colorazione con EDTA ha permesso di identificare le prime fini modificazioni ultrastrutturali dei nuclei cellulari dopo somministrazione di  $\alpha$ -amanitina alla concentrazione di 1  $\mu\text{g/g}$  di peso dell'animale. I dati testimoniano la perfetta correlazione con il dato biochimico di inibizione dell'RNA-polimerasi extranucleolare. Già 30 minuti dopo la somministrazione della tossina è possibile infatti osservare una riduzione di componenti ribonucleoproteiche prima sconosciute e chiamate *fibrille di pericromatina* nelle aree periferiche di cromatina addensata. Tali cambiamenti ultrastrutturali precedono qualsiasi alterazione nucleolare otticamente visibile: si può quindi identificare nelle *fibrille di pericromatina* la componente più sensibile per definire l'azione citotossica dell' $\alpha$ -amanitina sulle cellule, rappresentando l'espressione morfologica dell'RNA extranucleolare. In particolare le fibrille possono essere considerate l'equivalente morfologico del complesso tra la porzione maggiore dell'mRNA e le particelle ribonucleoproteiche (Petrov P et al, 1971).

In conseguenza dell'esposizione alla tossina, le cellule vanno in sofferenza per carenza di informazioni trascrizionali, a cui consegue la carenza di proteine essenziali e quindi la morte della cellula stessa.

Un fattore importante per lo sviluppo del danno cellulare è risultato essere il periodo di permanenza della tossina all'interno della cellula stessa a una concentrazione sufficiente ad inibire la trascrizione del DNA ( $\geq 10^{-8}\text{M}$ ), a sua volta dipendente dalla concentrazione ematica di amatossina (Faulstich H, 1979).

Da dati sperimentali risulta inoltre che il danno da  $\alpha$ -amanitina sia amplificato dalla produzione, da parte della tossina, di radicali ossidrilici dell'ossigeno. **Figura 25**



**Figura 25:** *effetti dei radicali liberi sulle varie strutture cellulari e responsabili dell'amplificazione del danno d'organo provocato dalla  $\alpha$ -amanitina.*

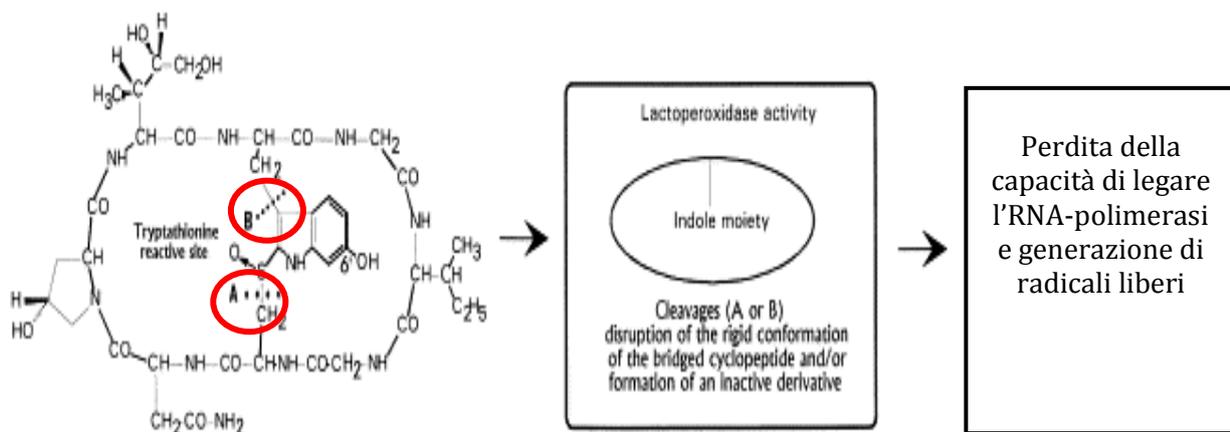
La porzione di  $\alpha$ -amanitina critica per il suo effetto tossico (la frazione contenente triptationina) è in grado di interagire con il radicale libero stabile 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). La tossina riduce infatti l'assorbimento del DPPH nei saggi di spettroscopia EPR usati per misurare le concentrazioni di radicali liberi (Zheleva A et al, 1990). In particolare più siti della triptationina risultano coinvolti nella reazione con il DPPH (Zheleva A et al, 1994).

È importante sottolineare come l'interazione tra un radicale libero stabile e un composto non radicale, quale quella che avviene tra DPPH e  $\alpha$ -amanitina, porti in ultimo luogo alla produzione di radicali liberi instabili e al successivo innesco di reazioni a catena che hanno come risultato finale l'ossidazione di acidi

grassi polinsaturi di membrana (Southorn PA e Powis G, 1988). Sembra che la tossina formi questi radicali liberi instabili dal gruppo fenolico e/o sulfossido.

Grazie alla spettroscopia UV/visibile è stato possibile dimostrare che l' $\alpha$ -amanitina è sensibile all'ossidazione da parte di un sistema di lattoperossidasi/ $H_2O_2$ , che porta alla formazione di radicali liberi intermedi e in particolare radicali sulfinilici a partire dalla stessa molecola tossica (Zheleva A et al, 2000).

**Figura 26**



**Figura 26:** rappresentazione dei siti di clivaggio su cui agisce l'enzima lattoperossidasi. Tali siti sono in prossimità della frazione attiva della molecola, contenente triptationina. Questo porta alla inattivazione della tossina stessa, con produzione però di radicali liberi.

Un metodo indiretto per dimostrare la produzione di radicali ossidrilici implicati nei processi di ossidazione degli acidi polinsaturi di membrana è la misurazione *in vitro* e *in vivo* degli effetti dell' $\alpha$ -amanitina sull'attività di enzimi quali la superossido-dismutasi (SOD) e la catalasi (CAT), implicati nella difesa dell'organismo dal danno ossidativo.

Sono stati presi in esame anche i livelli dei prodotti di reazione sul supernatante isolato da omogenati di topi trattati con dosi di  $\alpha$ -amanitina pari alla  $DL_{50}$ .

L'attività di SOD è risultata significativamente aumentata nei topi trattati rispetto ai controlli (proprietà antiossidante), mentre l'attività di CAT è risultata ridotta rispetto ai controlli (proprietà pro-ossidante). Una spiegazione per quest'ultimo risultato è data dal verosimile blocco dell'accesso del perossido di idrogeno alla tasca di legame dell'enzima da parte dell' $\alpha$ -amanitina.

Trattando ratti in vivo con dosi subletali di tossina è stato possibile monitorare il suo effetto a distanza di giorni sull'attività enzimatica: l'accumulo della tossina a livello epatico porta ad una prevalenza dell'effetto

pro-ossidativo dovuto all'inibizione di CAT, con conseguente aumento nella concentrazione di perossido di idrogeno a livello dell'organo stesso (Zheleva A et al, 2006).

Un ulteriore contributo al danno da  $\alpha$ -amanitina viene dato dal Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Questa citochina non è indispensabile per il ruolo di inibizione nei confronti dell'enzima RNA polimerasi, ma riduce notevolmente la latenza e ne amplifica gli effetti tossici. Anche la perossidazione lipidica risulta marcatamente aumentata in caso di somministrazione contemporanea di  $\alpha$ -amanitina e TNF- $\alpha$  in colture epatocitarie di ratto.

Tuttavia l'espressione genetica endogena di TNF- $\alpha$  negli epatociti risulta inibita dal trattamento con  $\alpha$ -amanitina. I risultati sperimentali dimostrano infatti che la tossina causa un'abbreviazione dei tempi di latenza e un'amplificazione del danno citotossico attraverso un meccanismo coinvolgente anche specie reattive dell'ossigeno, sottolineando una compartecipazione delle due vie tossiche (El-Bahay C et al, 1999).

Da esperimenti condotti da Leist et al. nel 1994 e nel 1997 si è dimostrato che linee epatocitarie primitive di topo e linee cellulari Hep G2, che sono completamente insensibili all'azione dell' $\alpha$ -amanitina somministrata fino a concentrazioni di 25-50  $\mu$ M (ben oltre i valori dell'intossicazione da funghi), mostrano un danno tossico massivo a dosi intorno a 10  $\mu$ M, se incubate insieme a TNF- $\alpha$ .

La considerazione che l' $\alpha$ -amanitina non è epatotossica in assenza dell'azione del TNF- $\alpha$  è supportata anche dall'osservazione che topi trattati con anticorpi anti-TNF- $\alpha$  e topi transgenici carenti del recettore di 55 kDa del TNF- $\alpha$  dimostrano solo una minima tossicità agli effetti della tossina (El-Bahay C et al, 1999).

Ulteriori studi condotti da altri autori hanno infine dimostrato un ruolo critico del glutatione (GSH) nell'azione del TNF- $\alpha$ . Le cellule epatiche rispondono infatti a questa citochina con una rapida alterazione dell'omeostasi del GSH. La deplezione epatocitaria di GSH può a sua volta amplificare la potenza del TNF- $\alpha$  nel generare specie reattive dell'ossigeno e perpetuare così il danno ossidativo (Leist M et al, 1997).

Vista la correlazione tra la deplezione di glutatione a livello epatocitario e il precoce innalzamento degli enzimi di citolisi epatica, alcuni autori hanno suggerito come la prevenzione di alterazioni nell'omeostasi del GSH epatico possa rivestire un importante ruolo nell'intossicazione da *Amanita phalloides*.

## 5.9 Epidemiologia delle intossicazioni

Non esistono dati precisi relativi all'incidenza delle intossicazioni da funghi velenosi. La variabilità annuale è notevole, giacché la crescita e lo sviluppo dei funghi in generale, e di alcune specie in particolare, è correlata a specifiche condizioni meteo-climatiche.

Benché il picco di incidenza si registri in autunno, avvelenamenti da funghi si possono verificare durante tutto l'anno, per consumo di funghi freschi o conservati (sott'olio, congelati, essiccati) che non perdono la loro tossicità.

L'intossicazione da funghi contenenti amatossine è responsabile di più del 90% dei decessi conseguenti al consumo di funghi velenosi (Klein AS et al, 1989). Nella maggior parte dei casi, l'intossicazione è attribuibile al consumo di esemplari appartenenti alla specie *Amanita phalloides*; più raramente, ne sono responsabili altre specie di funghi contenenti amatossine (Enjalbert F et al, 2002). I dati del Centro Antiveneni di Pavia negli ultimi anni indicano anche una prevalenza significativa sul territorio nazionale di casi di intossicazione a lunga incubazione correlati al consumo di Lepiote.

Si stima che ogni anno in Europa si possano verificare circa duecento decessi per intossicazione da funghi. Sulla base di questo dato di mortalità e considerando le possibili variazioni annuali, si può supporre che ogni anno si verifichino circa 2000-3000 casi di avvelenamenti da Amanite velenose (*Amanita phalloides*, *A. verna*, *A. virosa*) e altri 6000-8000 casi di intossicazione da altre specie di funghi (Becker CE et al, 1976; Bresinsky A e Besl H, 1990).

I dati di nove Centri Antiveneni italiani elaborati dal Ministero della Salute indicano che il numero delle consulenze per sospette intossicazioni da funghi è di circa 2000 ogni anno, pari al 4% di tutte le consulenze effettuate.

Il Centro Antiveneni di Pavia gestisce annualmente tra 500 e 1000 casi di intossicazione da funghi, il 10% dei quali è costituito da intossicazione da funghi contenenti  $\alpha$ -amanitina.

Da tradizione tipicamente europea, il consumo di funghi è divenuto negli ultimi decenni relativamente frequente anche negli Stati Uniti, dove l'incidenza delle intossicazioni da funghi è stata stimata intorno ai 5 casi ogni 100.000 abitanti/anno, con caratteristiche geografiche e annuali variabili (Trestail JH, 1991). Nel resto del mondo le intossicazioni da funghi sono apparentemente più rare o meno riportate (Enjalbert F et al, 2002).

L'intossicazione da funghi contenenti amanitina è tuttora gravata da una mortalità elevata. Nelle casistiche più datate, essa si attestava intorno al 30-50% (Floersheim GL, 1987); il miglioramento dell'assistenza di

supporto e delle tecniche intensivistiche ha consentito nel corso degli anni di ridurre la mortalità, che permane ciononostante elevata.

Non è tuttavia possibile escludere una sottostima dell'incidenza e della mortalità delle intossicazioni da funghi contenenti amanitina riportate in letteratura, perché spesso non è possibile identificare con precisione la specie di funghi responsabile dell'avvelenamento, analizzare le tossine e perché non tutte le intossicazioni letali vengono riportate o comunicate ai Centri Antiveleni.

In definitiva non esistono quindi dati precisi riguardo le percentuali di mortalità, data anche la mancanza di una rigorosa modalità di segnalazione dei casi afferenti ai vari ospedali sul territorio nazionale.

### 5.10 Manifestazioni cliniche

Caratteristica frequente, ma non specifica, delle intossicazioni da funghi è quella di configurare spesso un avvelenamento "familiare" o "di gruppo": in genere tutti i commensali dello stesso pasto manifestano gli stessi sintomi, benché in alcuni casi la loro comparsa possa avere tempi di latenza diversi.

I sintomi e segni dell'intossicazione da funghi contenenti amatossine possono essere raggruppati temporalmente in quattro fasi (Bozza Marrubini M et al, 1989; Vercellone A et al, 1968; Resina A et al, 1984).

La **prima fase** è caratterizzata sul piano clinico dal silenzio sintomatologico. Questa "fase di latenza" o "incubazione", che si protrae per circa 6-16 ore dopo il consumo di funghi, è particolarmente insidiosa in quanto l'assenza di sintomi può indurre il paziente a consumare ripetutamente gli stessi funghi in più pasti. La sua durata è indipendente dalla quantità di funghi ingerita e può essere abbreviata dalla contemporanea ingestione di funghi velenosi a breve incubazione.

La **seconda fase** inizia con la comparsa delle manifestazioni gastrointestinali ("sindrome gastrointestinale"): dolori addominali, vomito ripetuto, diarrea profusa con andamento a crisi. L'intensità dei sintomi può comportare l'insorgenza di grave disidratazione, con shock e insufficienza renale acuta di tipo pre-renale.

Dopo un apparente miglioramento delle condizioni cliniche generali per remissione dei sintomi gastroenterici, si manifestano i segni del danno epatico (**terza fase**). A partire da 24-48 (talvolta fino a 72) ore dopo l'ingestione, gli esami di laboratorio documentano – spesso in progressione rapida e andamento a poussée – marcato aumento delle transaminasi, ipoglicemia, caduta dell'attività protrombinica e alterazioni di grado variabile degli altri parametri emocoagulativi.

La **quarta fase** è quella dell'insufficienza epatica: i valori di attività protrombinica possono scendere al di sotto del 10%; si hanno iperbilirubinemia e iperammoniemia. Dopo la quarta-quinta giornata ci sono due possibilità: lenta risoluzione con riduzione graduale degli enzimi epatici e aumento dei valori di attività protrombinica, oppure crollo degli enzimi, persistenza di bassi valori di attività protrombinica, aumento dell'ammoniemia, coagulazione intravascolare disseminata e sviluppo di coma epatico.

Le cause di morte nell'intossicazione da funghi contenenti amanitina sono rappresentate da shock ipovolemico intrattabile e insufficienza renale acuta nella fase gastroenterica, mentre nelle fasi più avanzate dell'intossicazione la prognosi *quoad vitam* è condizionata dall'insufficienza epatica fulminante (Goldfrank LR, 2006).

### 5.11 Diagnosi

Il più frequente motivo di presentazione in pronto soccorso dopo consumo di funghi contenenti amanitina è rappresentato dalla comparsa di un quadro gastroenterico molto grave, con nausea, vomito, dolori addominali e diarrea profusa di tipo coleriforme. Si rende comunque necessaria la diagnosi differenziale con altre cause di gastroenterite, quali patologie infettive ad eziologia virale o batterica, tossinfezioni alimentari, cause di addome acuto chirurgico, cause iatrogene, cause tossiche (funghi non epatotossici compresi), oltre a riesacerbazioni di patologie individuali già note.

L'intossicazione da funghi deve sempre essere sospettata nei pazienti che manifestino un quadro gastroenterico acuto con anamnesi di recente ingestione di funghi non controllati all'origine. L'ingestione di funghi controllati, consumati in ristoranti o acquistati in mercati e supermercati, induce in genere a scartare l'ipotesi di un'intossicazione da specie velenose (Bozza Marrubini M et al, 1989).

La raccolta dei dati anamnestici non deve essere limitata all'ultimo pasto a base di funghi, ma deve verificare l'assunzione dello stesso alimento nei due-tre giorni precedenti l'esordio della sintomatologia, al fine di valutare in modo preciso il tempo trascorso tra l'ingestione e l'insorgenza dei sintomi.

Il tempo di latenza della sintomatologia gastroenterica consente infatti di distinguere tra sindromi a breve incubazione (caratterizzate da effetti di tipo funzionale) e sindromi a lunga incubazione (comparsa dei sintomi dopo almeno 6 ore dall'ingestione dei funghi), potenzialmente letali o ad esito invalidante per gli effetti lesionali citotossici a carico dei diversi organi bersaglio. Un'anamnesi attenta può consentire di evitare ritardi diagnostico-terapeutici con importanti ripercussioni sull'esito clinico del paziente.

L'elemento anamnestico di comparsa di sintomi gastroenterici entro 4 ore dall'ingestione dei funghi non consente di escludere con certezza l'intossicazione da funghi contenenti amanitina, poiché è possibile la

contemporanea ingestione di funghi responsabili di sindromi a breve e lunga latenza. In questo caso il paziente va monitorizzato per la possibile ingravescenza dei sintomi e/o il loro protrarsi nel tempo.

Un elemento che può essere di aiuto nella diagnosi è rappresentato dal riconoscimento micologico mediante analisi macroscopica e microscopica delle specie fungine consumate dal paziente. Tuttavia, la negatività all'indagine micologica non esclude la possibilità di intossicazione da funghi velenosi poiché viene usualmente effettuata su quanto non è stato consumato dal paziente (residui degli alimenti preparati). (Crevani M. 2015)

### 5.12 Dosaggio dell'amanitina

La conferma diagnostica dell'intossicazione da funghi contenenti amanitina consiste nel dosaggio di  $\alpha$ -amanitina nei liquidi biologici (Locatelli C et al, 1995). Dal 2002 questa analisi viene effettuata con metodo ELISA su matrice urinaria.

Il metodo ELISA consiste in un test immunoenzimatico competitivo che prevede l'utilizzo di un anticorpo policlonale specifico per l'amanitina adeso alla piastra. L'amanitina presente nei campioni di urina e negli standard compete con l'amanitina biotinilata per i siti di *binding* dell'anticorpo specifico anti-amanitina (di coniglio) adeso alla piastra. La streptavidina coniugata alla perossidasi (di cavallo) si lega al complesso amanitina-biotina-anticorpo: la reazione colorimetrica si sviluppa mediante l'aggiunta del substrato tetrametilbenzidina in tampone citrato con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'intensità della colorazione prodotta è inversamente proporzionale alla quantità di amanitina presente nel campione: la reazione è bloccata dall'aggiunta di una soluzione di acido solforico 0.25 M che fa virare il colore da blu a giallo. La lettura spettrofotometrica viene eseguita a 450 nm con lettore di micropiastre.

La sensibilità funzionale del metodo è pari a 1.5 ng/ml (Bühlmann Laboratories, 2001). Non è stato identificato in modo univoco il *cut-off* per valutare la positività del test. La prima edizione del manuale di istruzioni fornito dal produttore indicava come positivi livelli di amanitina urinaria superiori a 10 ng/ml. La successiva edizione omette questa informazione e indica che valori di amanitina urinaria al di sopra della sensibilità funzionale del metodo (1.5 ng/ml) possono indicare un'intossicazione da amanitina (Bühlmann Laboratories, 2001).

In un recente studio è stata valutata la possibilità che la stessa matrice urinaria, o la presenza di sostanze esogene quali farmaci e relativi metaboliti fossero responsabili di falsi positivi alla ricerca dell'amanitina urinaria con la metodica ELISA. Tutti i campioni testati sono risultati negativi per valori inferiori al limite di sensibilità funzionale del metodo (1.5 ng/ml). I campioni di urine testati provenivano da pazienti che

verosimilmente non avevano consumato funghi; allo stato attuale delle conoscenze, non è tuttavia possibile escludere che interferenze da parte di altre micotossine diverse dall'amanitina e non ancora note o caratterizzate possano determinare falsi positivi (Staack RF e Maurer HH, 2002).

## 5.13 Terapie

### 5.13.1 Terapie di base

L'intossicazione da funghi contenenti amanitina richiede un trattamento complesso, più articolato rispetto a quello delle altre intossicazioni da funghi, che comprende la contemporanea attuazione di più procedure terapeutiche non scevre da rischi.

Nonostante l'esordio ritardato della sintomatologia rispetto al consumo dei funghi, questa intossicazione deve essere considerata un'urgenza che richiede la tempestiva attuazione della decontaminazione gastrointestinale.

In tutte le intossicazioni da funghi, e specialmente in quelle a lunga incubazione, vi è indicazione alla **decontaminazione gastrointestinale** mediante gastrolusi e somministrazione di carbone vegetale attivato (Goldfrank LR, 2006; Floersheim GL, 1987; Bozza Marrubini M et al, 1989; Shannon MW e Haddad LM, 1998). Tali manovre consentono di diminuire il carico tossico assorbibile e devono essere messe in atto anche se al momento della presa in carico il paziente ha già presentato vomito ripetuto e diarrea profusa: nell'aspirato gastroduodenale dei pazienti intossicati è stata infatti documentata la presenza di amanitina anche a distanza di 36-60 ore dall'ingestione (Busi C et al, 1979). Non esistono dati certi sull'efficacia della somministrazione di catartici in aggiunta al carbone vegetale attivato, anche se tale procedura risulta empiricamente accettata. E' invece controindicata la somministrazione di farmaci antidiarroici, poiché la diarrea rappresenta una forma di decontaminazione spontanea (Locatelli C et al, 2001).

Studi di tossicocinetica sull'uomo hanno dimostrato che l'eliminazione dell'amanitina risulta notevolmente aumentata con l'incremento della diuresi (Vesconi S et al, 1980). Ciò è verosimile in considerazione dell'assenza di legame proteico e della prevalente escrezione per via renale (Jaeger A et al, 1993). La **diuresi forzata**, che consiste nella iperidratazione del paziente al fine di ottenere una diuresi di circa 100 ml/kg nelle 24 ore, rappresenta la tecnica di depurazione non invasiva d'elezione; essa deve essere instaurata precocemente, avendo cura di monitorare e correggere gli eventuali squilibri elettrolitici (Vesconi S et al, 1980; Faulstich H et al, 1985).

Le **tecniche dialitiche** trovano indicazione nei casi di compromissione dell'emuntorio renale. L'efficacia della plasmateresi, utilizzata da sola o in associazione ad altre tecniche invasive di depurazione è tuttora

controversa (Mydlik M et al, 1994). L'emoperfusione su colonna di carbone è risultata inefficace (Mullins EM e Horowitz ZMD, 2000).

Una diversa tecnica di depurazione è rappresentata dalla "dialisi gastro-intestinale", che consiste nella somministrazione di dosi ripetute di carbone vegetale attivato per via orale. Questa tecnica limita il ricircolo enteroepatico dell'amanitina, accelerandone l'eliminazione per via fecale (Jaeger A et al, 1993; Piqueras J, 1989).

Al trattamento specifico si associano le opportune **terapie di supporto**. Durante la fase gastroenterica si può rendere necessaria la correzione degli squilibri idroelettrolitici e dello shock ipovolemico conseguenti alla perdita di liquidi. Nella fase dell'insufficienza epatica il trattamento di supporto consiste nell'infusione di plasma fresco, vitamina K e fattori della coagulazione, nonché degli altri trattamenti sintomatici del caso (Enjalbert F et al, 2002; Bozza Marrubini M et al, 1989).

Nei casi a decorso sfavorevole, è necessario considerare il **trapianto di fegato**. Nella selezione dei pazienti candidati al trapianto, fattori indicativi sono età, eventuali alterazioni metaboliche, stadi dell'encefalopatia e indici di funzionalità epatica (Enjalbert F et al, 2002). Studi di cinetica hanno dimostrato che non esiste alcun rischio di tossicità per il fegato trapiantato a partire dal quarto giorno dopo l'ingestione di funghi (Jaeger A et al, 1993). E' comunque prassi avere dei dati di negatività della amanitina urinaria prima di procedere con l'intervento chirurgico.

### 5.13.2 Trattamento antidotico

Negli ultimi vent'anni sono state proposte numerose terapie farmacologiche volte ad impedire o limitare l'effetto delle tossine sugli organi bersaglio, con l'intento di migliorare la prognosi di questa grave intossicazione. In ambito clinico la reale efficacia dei trattamenti proposti risulta difficilmente valutabile, sia per la natura polifarmacologica dei protocolli terapeutici adottati, sia per la mancanza di studi clinici specifici.

Studi sperimentali hanno dimostrato che la **penicillina G** svolge un'azione protettiva nei confronti di dosi letali di amatossine: essa riduce l'uptake epatico dell'amanitina interferendo con il sistema di trasporto presente sulla membrana epatocitaria (Floersheim GL et al, 1971). Il meccanismo d'azione della penicillina G suggerisce che la sua efficacia possa limitarsi alle fasi iniziali dell'intossicazione, in particolare entro 36 ore dall'ingestione dei funghi (Giannini L et al, 2006).

La **silibinina**, nota anche come silibina, il principale componente attivo della silimarina (un estratto standardizzato di acheni di cardo mariano) è un flavonolignano costituito da una miscela di due

diastereoisomeri: silibinina A e silibinina B, in rapporto circa equimolare. La sua somministrazione in questa intossicazione si basa su dati sperimentali che hanno dimostrato un suo ruolo epatoprotettivo mediante diversi meccanismi:

- inibizione del legame dell'amatossina alla membrana epatocitaria
- competizione con l'amatossina per il trasporto transmembrana
- interruzione della secrezione biliare e quindi del ricircolo enteroepatico della tossina
- inibizione del rilascio del TNF- $\alpha$  da parte degli epatociti danneggiati
- stimolazione della sintesi proteica nelle cellule epatiche danneggiate.

L'**acido tiotico**, impiegato come scavenger di radicali liberi per prevenire la perossidazione lipidica, si è rivelato inefficace negli studi sperimentali e non trova prove di efficacia nella pratica clinica (Alleva FR, 1975).

Recentemente alcuni Autori hanno postulato che lo stress ossidativo derivante dalla perturbazione del metabolismo epatocitario indotto dall'amanitina possa essere contrastato dall'impiego di agenti antiossidanti quali cimetidina, acido ascorbico e N-acetilcisteina.

L'uso della **cimetidina**, antistaminico in grado di inibire il citocromo CYP 2E1, si basa sulla similitudine tra l'effetto dell'amanitina sugli epatociti e quello determinato da altre tossine che interferiscono con tale via metabolica (Schneider SM et al, 1987). Non è tuttavia noto se l'amanitina venga in qualche modo metabolizzata attraverso tale via.

L'**acido L-ascorbico** (vitamina C), che inibisce la perossidazione lipidica, è stato utilizzato come "epatoprotettore" nel danno secondario ad intossicazione da paracetamolo e tetracloruro di carbonio; è attualmente impiegato nell'intossicazione da *Amanita phalloides* in associazione ad altri farmaci dai Centri Antiveneni francesi (Jaeger A et al, 1993).

Risultati clinici significativi sono stati ottenuti con la somministrazione di **N-acetilcisteina** (NAC), utilizzata allo scopo di contrastare la deplezione di glutatione ridotto indotta dall'amanitina (Butera R et al, 1993; Locatelli C et al, 1992).



## PARTE SPERIMENTALE

La parte sperimentale si suddivide in due parti. La prima è incentrata sullo studio del miRNA-122 come biomarcatore di danno epatico nelle intossicazioni da paracetamolo ed è stata condotta in collaborazione con l'università di Edimburgo e il centro di Tossicologia Clinica di Edimburgo.

La seconda parte dello studio si è incentrata sullo studio di nuovi biomarcatori nelle intossicazioni da macromiceti ed è stata svolta in collaborazione con il Centro Antiveneni di Pavia (CAV Pavia). Questa è stata a sua volta divisa in due parti; nella prima parte in si è sviluppato un metodo di diagnosi su sangue per l'intossicazione da amatossine, alternativo al classico dosaggio su urine, nel tentativo di avere uno strumento diagnostico più precoce e affidabile. Nella seconda parte l'attenzione è tornata sullo studio dei miRNA e sulla risposta cellulare alla  $\alpha$ -amanitina.

### PRIMA PARTE

#### **6. Il miRNA-122 come marcatore dell'epatotossicità nel sovradosaggio da paracetamolo – Studio clinico prospettico**

##### **6.2 Scopo dello studio**

Lo scopo dello studio è quello di valutare il ruolo di un nuovo biomarcatore di danno epatico indotto dal sovradosaggio di paracetamolo, che sia più specifico e sensibile dei marcatori utilizzati finora nella pratica clinica. Nello Specifico si è voluto studiare il valore diagnostico e prognostico del microRNA-122 nell'identificazione di danno epatico indotto da paracetamolo, in una coorte di pazienti con sovradosaggio da paracetamolo.

Inoltre, come obiettivo secondario vi era quello di avvalorare l'ipotesi della quantificazione del microRNA-122 mediante dosaggio in sangue periferico ottenuto con prelievo capillare.

##### **6.3 Materiali e metodi**

###### *Disegno sperimentale*

In un arco temporale di 6 mesi tutti i pazienti adulti, ammessi al Royal Infirmary di Edimburgo (RIE) dopo overdose di paracetamolo che richieda trattamento antidotale, sono stati valutati se idonei a prendere parte allo studio. Se idonei è stato proposto loro di firmare un consenso informato.

Per quanto riguarda il trattamento antidotale dell'overdose da paracetamolo, nell'unità di Tossicologia Clinica del RIE era in corso uno studio pilota sulla somministrazione di NAC in un regime temporale ridotto di 12 ore, che prevedeva la somministrazione di 300 mg di NAC nell'arco di 12 ore; in questo protocollo era prevista la raccolta di un campione ematico da sangue venoso periferico per il dosaggio dei marcatori di danno epatico da effettuarsi alla 10<sup>a</sup> ora, ovvero 2 ore prima della fine del trattamento. In teoria, questo prelievo eseguito precocemente servirebbe per poter dimettere il paziente non più a rischio di danno epatico una volta terminato il ciclo infusivo antidotale, senza aspettare ore ulteriori per i risultati degli esami ematici. Durante lo svolgimento di questo studio pilota, comunque, i pazienti venivano tenuti in osservazione fino alla 21<sup>a</sup> ora dall'inizio del trattamento, quando veniva verificato con ulteriori esami ematici che non si fossero sviluppati danni epatici non predetti dai marcatori in uso.

E' stato pertanto stabilito che, anche il campione capillare che sarebbe stato prelevato ai pazienti coinvolti nello studio, doveva essere prelevato alla 10<sup>a</sup> ora dall'inizio della terapia, con un margine fino alla 12<sup>a</sup> ora: lo scopo di questo prelievo era di valutare se il miRNA-122 prelevato al termine del ciclo antidotale potesse avere un più affidabile valore predittivo sullo sviluppo postumo di danno epatico.

Il prelievo del campione ematico capillare è stato effettuato mediante l'utilizzo di una lancetta monouso, utilizzata solitamente per la valutazione della glicemia da sangue capillare nei pazienti ricoverati. La provetta contenente tale campione è stata catalogata e conservata in freezer e successivamente analizzata mediante PCR.

I dati clinici dei pazienti sono stati raccolti e catalogati in modo da poterli confrontare successivamente con i risultati di laboratorio.

Il personale clinico e di laboratorio è rimasto all'oscuro dei rispettivi dati fino a che il lavoro non è stato concluso.

Lo studio è stato approvato in modo prospettico dal comitato etico di ricerca locale e il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti.

#### *Popolazione in studio*

Pazienti ricoverati presso l'unità di tossicologia clinica del Royal Infirmary di Edimburgo (RIE) a seguito di sovradosaggio da paracetamolo, che richiedesse il trattamento antidotale con N-acetilcisteina (NAC).

### *Criteria di inclusione*

Pazienti adulti (> 16 anni) con una chiara storia di sovradosaggio di paracetamolo e una concentrazione di paracetamolo nel sangue che richiedeva il ricovero ospedaliero per la terapia con NAC per via endovenosa, secondo le linee guida del Regno Unito al momento dello studio.

### *Criteria di esclusione*

Pazienti detenuti ai sensi della legge sulla salute mentale, pazienti con nota compromissione cognitiva permanente e pazienti con una malattia potenzialmente letale.

## 6.4 Procedure dello studio

### *Reclutamento*

I pazienti afferenti all'unità di Tossicologia Clinica del RIE, a seguito di trattamento per sovradosaggio da paracetamolo che richiedesse il trattamento antidotale, sono stati valutati per decidere se rientrassero nei criteri di inclusione dello studio e non fossero invece presenti criteri di esclusione. Nel corso del ricovero è stato chiesto se volessero partecipare allo studio che è stato in tale occasione esaurientemente spiegato; in caso di assenso, è stato acquisito un consenso firmato e una copia dello stesso è stata fornita al paziente.

### *Procedure cliniche*

Il lasso temporale in cui effettuare il prelievo di sangue capillare è stato stabilito tra la 10<sup>a</sup> e la 12<sup>a</sup> ora. Il prelievo è stato eseguito mediante lancette per prelievo capillare monouso Sterilance Lite II<sup>®</sup> attraverso puntura del 2° dito della mano sinistra. Per ogni paziente è stata prelevata una goccia di sangue raccolta in micro-provette da 1,5 ml tipo Eppendorf: la provetta è stata catalogata con un numero progressivo annotato anche sulla cartella clinica del paziente ed è stata poi inserita immediatamente in un apposito congelatore a -20°C nella infermeria del reparto, con restrizione di accesso.

I dati clinici del paziente sono stati raccolti in un database elettronico Microsoft Excel (2007)<sup>®</sup> al termine del periodo di osservazione medica. I parametri annotati sono stati: data e ora di accesso, concentrazione ematica di paracetamolo, ALT, AST e INR al primo prelievo ematico, al termine del ciclo antidotale e al termine di ogni successivo ciclo antidotale aggiuntivo qualora questo fosse necessario. E' stato inoltre riportato l'esito del ricovero e la data di dimissione.

Al termine del periodo previsto dallo studio, il sangue contenuto nelle provette raccolte e conservate in congelatore è stato analizzato in laboratorio.

## 6.5 Analisi di laboratorio

Le analisi di laboratorio effettuate sui campioni ematici sono state le seguenti:

- *Estrazione del miRNA*

Il MiRNA è stato estratto usando il kit miRNeasy (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi), seguendo le istruzioni del produttore, con alcune piccole modifiche. Ai campioni di sangue capillare (100 µL) è stato aggiunto 1 ml di Qiazol e 200 µL di acqua priva di nucleasi prima dell'estrazione.

I campioni sono stati quindi mescolati per 10 secondi prima dell'aggiunta di 3,5µL di miRNA-39 e 200µL di cloroformio. I campioni sono stati poi vortexati per 20 secondi e centrifugati a 13.000 g per 15 minuti a 4 °C.

Volumi uguali (600µL) della fase acquosa superiore e 900µL di etanolo al 100% sono stati quindi miscelati in un Eppendorf pulito prima di aggiungere 750µL alla colonna RNeasy MinElute. La colonna è stata centrifugata a 8.000 g per 15 secondi a temperatura ambiente.

Dopo la centrifugazione, l'eluato è stato scartato e altri 750µL sono stati aggiunti alla colonna e centrifugati.

- *Purificazione del MiRNA*

La colonna con RNA immobilizzato è stata lavata con vari tamponi prima di un lavaggio finale con etanolo all'80%. Essa è stata poi essiccata mediante centrifugazione. La piccola frazione di RNA è stata eluita con 15 µL di acqua priva di nucleasi e conservata a -80° C.

- *qRT-PCR*

Per ogni campione, 2,5 µL di eluato di RNA sono stati retro-trascritti in cDNA utilizzando *stem-loop* primers specifici per la trascrizione inversa (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Il cDNA sintetizzato è stato quindi diluito 10 volte e utilizzato per l'analisi Real Time mediante il miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi), utilizzando primers miScript specifici per il miR-122 (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi). La real time PCR è stata eseguita su un Light Cycler 480 (Roche, Basel, Switzerland). Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio.

I valori medi dei cicli soglia (CT) di miR-122 sono stati normalizzati su quelli del miR-39.

## **6.6 Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita con il software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla California, USA). I dati sono presentati come intervallo mediano e interquartile (IQR). Per due non-normal data set, sono stati effettuati confronti con il Mann-Whitney U test. Per l'analisi correlativa, sono stati eseguiti i test di correlazione di Pearson. I risultati sono stati considerati significativi quando  $P < 0,05$ .

## 6.7 Risultati

Un totale di 38 pazienti adulti (30 femmine, 8 maschi) è stato reclutato per questo studio, con un'età media di 29 anni. Il 66% della coorte totale è stato ammesso per sovradosaggio singolo acuto di paracetamolo (definito come assunzione di un dosaggio sovraterapeutico nell'arco di 1 ora), il 24% per un sovradosaggio frazionato (definito come un sovradosaggio ripetuto, assunto in un periodo tra 1 e 8 ore) e il 10 % per un eccesso terapeutico di paracetamolo. Tutti i pazienti hanno completato l'intero ciclo di trattamento con NAC. L'attività media della ALT all'ammissione (IRQ) era di 20 UI / L (13,25 - 29,5 UI / L). Il tempo medio (IQR) dalla prima raccolta di campioni di sangue alla raccolta del campione per il dosaggio di miR-122 è stato di 12,5 ore (11,5 - 13,5 ore) e il tempo medio tra il prelievo per il miR-122 e la misurazione della ALT delle 20 ore è stato di 9 ore (7,5-10 ore). Per dieci su 38 pazienti, non è stato possibile determinare le ALT a 20h (per auto dimissione dall'ospedale). Solo 2 pazienti hanno sviluppato danno epatico clinicamente significativo (ALT> 100 IU / L). Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono mostrate nella **tabella 6**, e in maggior dettaglio nell'**appendice 1**.

**Sono stati ottenuti i seguenti risultati:**

***1) Il miR-122 capillare può essere misurato in una goccia di sangue, dopo conservazione a -20 ° C per 6 mesi***

Dopo la raccolta del campione ematico (una goccia di sangue), esso è stato conservato, per un periodo fino a sei mesi, in una provetta Eppendorf in congelatore (-20 ° C); i valori dei campioni capillari di tutti i 38 pazienti ottenuti con qPCR hanno fornito valori CT (Cycle Threshold) entro l'intervallo lineare della curva di calibrazione.

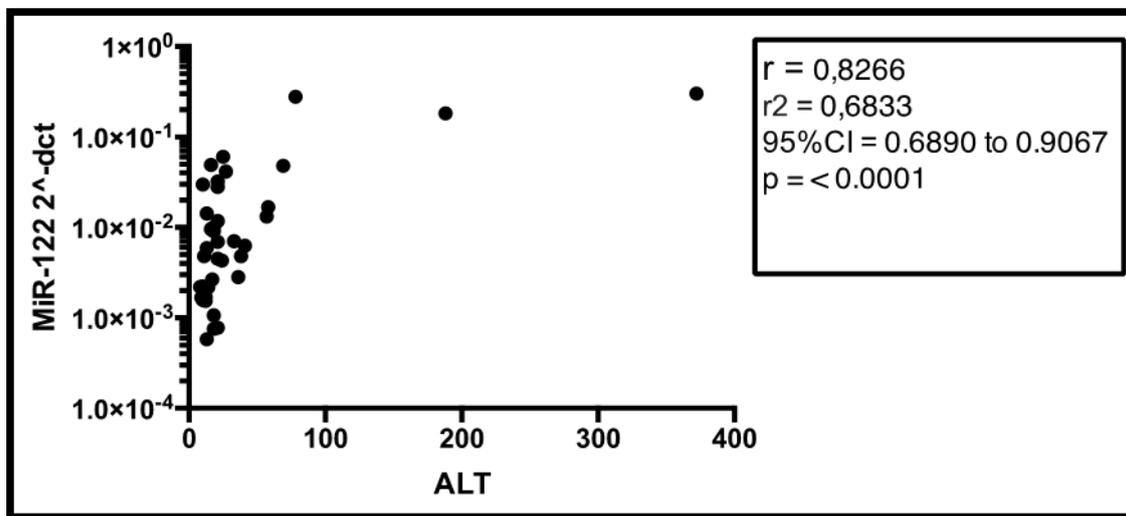
**Tabella 6. Parametri clinici della popolazione in studio**

<b>Numero totale pazienti</b>	<b>38</b>
<b>Sesso (maschio: femmina)</b>	08:30
<b>Età (anni)</b>	29 (20 - 35.5)
<b>Tipologia di sovradosaggio [% ]</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acuto singolo (AS)</li> <li>• Frazionato (F)</li> <li>• Errore terapeutico (ET)</li> </ul>	66%, 24%, 10%
<b>AS: tempo medio dall'ingestione al primo campione di sangue [ore: min]</b>	04:22 (04:05 - 04:42)
<b>F: tempo medio dall'ingestione al primo campione di sangue [ore: min]</b>	17:20 (05:47 - 21:32)
<b>ET: tempo medio dall'ingestione al primo campione di sangue [ore: min]</b>	37:31 (25:13 - 55:16)
<b>Concentrazione media di paracetamolo all' ammissione (mg / L)</b>	103 (36.75 - 181.75)
<b>Attività media di ALT all'ammissione [UI / L]</b>	20 (13.25 - 29.5)
<b>Tempo medio dal primo campione di sangue alla misurazione di miR-122 [ore: min]</b>	13:24 (12:30 - 14:27)
<b>Tempo medio dalla misurazione di miR-122 a 20h ALT [ore:</b>	08:56 (7:22 - 10:05)

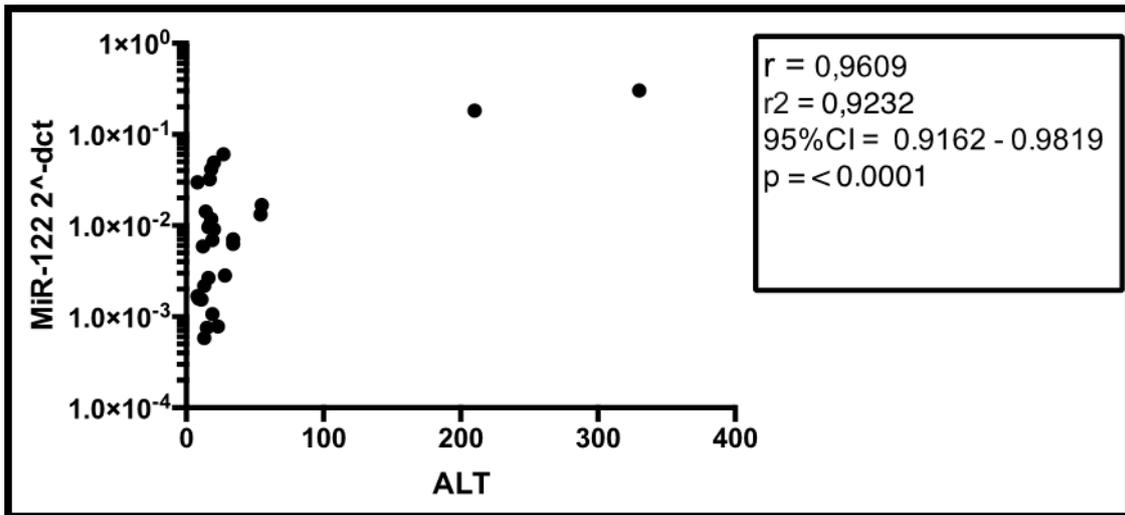
min]	
Numero di pazienti con 20 h ALT > limite superiore	4
Numero di pazienti con 20 h ALT > 2x limite superiore	2

## 2) Il miR-122 capillare correla positivamente con ALT

Il MiR-122 circolante è stato misurato in una goccia di sangue ottenuta dalla puntura di un dito a T10. L'ALT è stata misurata a T10 e T20 mediante venipuntura. E' stata determinata la correlazione tra miR-122 e ALT. Il MiR-122 si è mostrato significativamente correlato con ALT misurato a T10 (N = 38, P <0,0001, **Figura 27A**) e con ALT misurato a T20 (N = 28, P <0,0001, **Figura 27B**). I coefficienti di correlazione (R2) erano 0,68 e 0,92 e i valori di Pearson R (intervallo di confidenza al 95%) erano rispettivamente 0,83 (0,69 - 0,91) e 0,96 (0,92 - 0,98).



(A) T10 miR-122 vs T10 ALT



(B) T10 MiR-122 vs T20 ALT

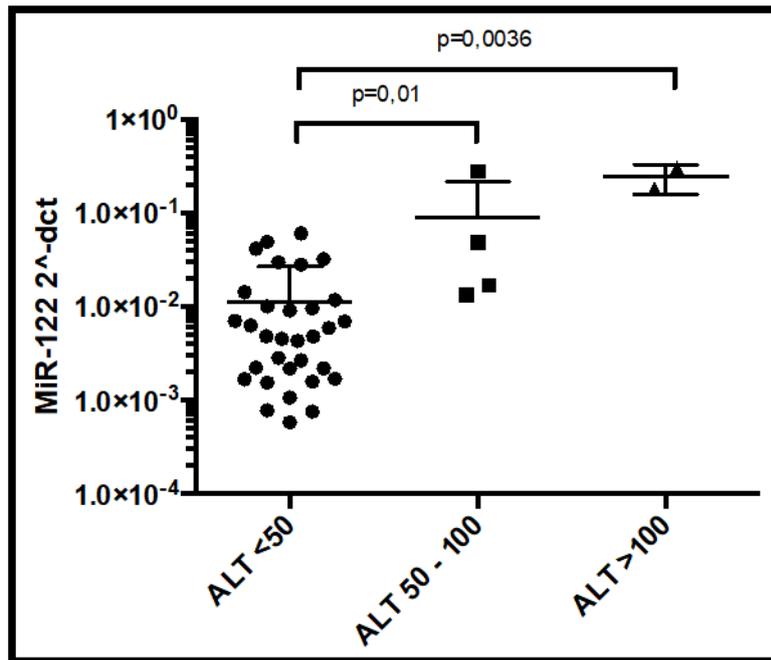
**Figura 27.** I valori miR-122 a T10, espressi in scala logaritmica, sono confrontati con i valori di ALT, espressi in scala lineare, prelevati a T10 (A) e a T20 (B).

### 3) Il miR-122 circolante è più alto nei pazienti che sviluppano ALI

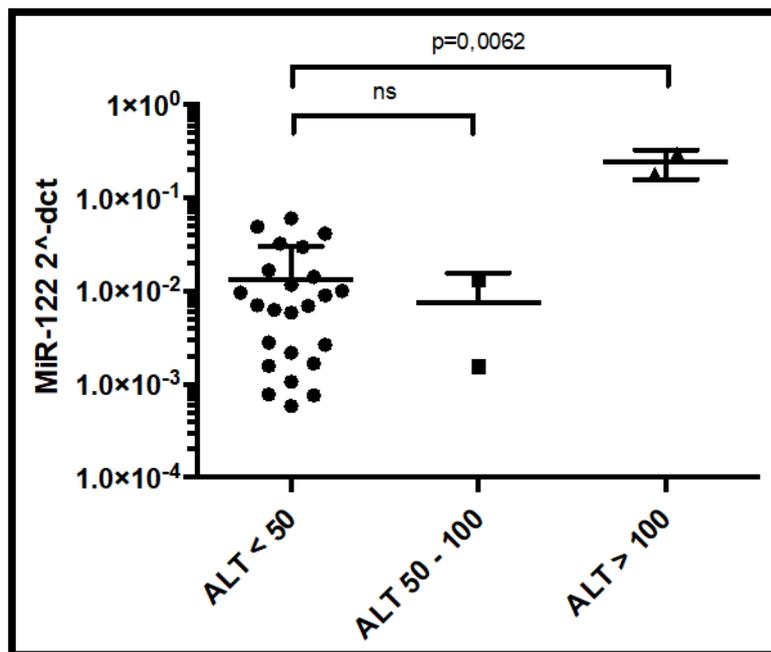
Il MiR-122 capillare è stato confrontato tra pazienti senza danno epatico (NLI, ALT < 50 UI / L), tra pazienti con danno epatico *borderline* (BLI, ALT 50-100 UI / L) e tra pazienti con danno epatico clinicamente significativo (ALI) (ALT > 100 UI / L), sia per valori di ALT misurati a 10 ore (T10) sia per valori misurati a 20 ore (T20).

Per i valori di ALT misurati a T10, il miR-122 si presentava significativamente più alto nei pazienti che sviluppavano ALI, rispetto al gruppo con BLI o NLI (N = 2, P = 0.0036, **Figura 28A**); analoghi risultati sono emersi per valori di ALT misurati a T20 con valori di miR122 più elevati nel gruppo con ALI (N = 2, P = 0,0062, **Figura 28B**). E' stato inoltre riscontrato che il miR-122 era significativamente aumentato nei pazienti con BLI quando ALT è stata misurata a T10 (N = 4, P = 0,001, **Figura 28A**), anche se non si presentava significativamente più elevato quando misurato a T20 (N = 2, P = ns, **Figura 28B**).

Per un paziente su tre con miR-122 elevato a T10, non è stato possibile il *follow-up* e l'ALT a T20 non è stata misurata (**Figura 28A**). La **Figura 29** mostra il decorso temporale di pazienti con ALT elevata a T10 (> 50 IU / L) (N = 4). Il MiR-122 è elevato solo nei pazienti che sviluppano successivamente danno epatico clinicamente significativo. **Figura 29**

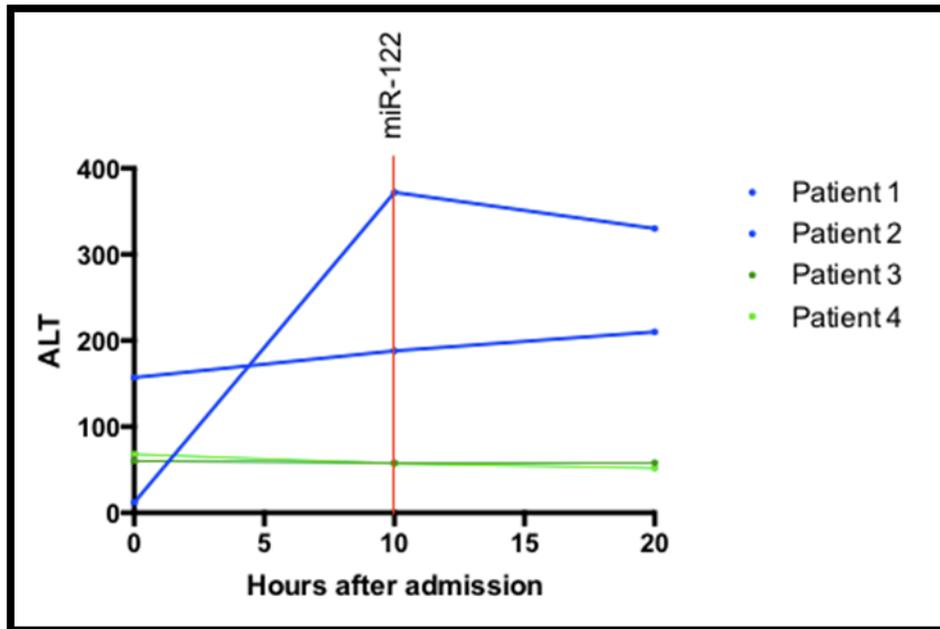


(A) T10 miR-122 vs T10 ALT



(B) T10 MiR-122 Vs T20 ALT

**Figura 28.** I valori miR-122 a T10 sono confrontati tra pazienti che non hanno un aumento dell'attività della ALT (<50 UI / L), pazienti con un aumento clinicamente poco significativo dell'attività della ALT (50-100 UI / L) e pazienti con danno epatico clinicamente significativo con ALT > 100 IU / L.



**Figura 29.** Panoramica del decorso temporale dell'attività delle ALT dei quattro pazienti con elevata attività di ALT (> 50 IU / L) a T10. L'attività ALT è stata quantificata al momento del ricovero (T0), 10 ore dopo l'inizio del trattamento con NAC (T10) e 20 ore dopo l'inizio del NAC (T20). L'attività del MiR-122 è stata misurata a T10 (linea verticale rossa). Le linee blu rappresentano i pazienti con attività miR-122 elevata. Questi pazienti hanno sviluppato ALI (ALT > 100 UI / L). Le linee verdi rappresentano i pazienti senza attività miR-122 elevata. Questi pazienti hanno una lesione epatica borderline (ALT = 50-100 UI / L).

Paziente	Sesso	Età (anni)	Tipo di overdose	T0 [paracet.](mg/L)	T0 ALT (UI/L)	T10 ALT (UI/L)	T20 ALT (UI/L)	2 <sup>Δ</sup> -Delta CT (miR-122 - miR39)	Intervallo tra T0 – miR122 (ore:min)	Intervallo tra miR122 – T20 (ore:min)
1	M	26	ET	9	72	69	X	0,0482	12:36	x
2	F	56	AS	86	58	38	X	0,0048	13:56	x
3	M	32	AS	90	11	10	X	0,0022	15:40	x
4	F	30	AS	70	25	21	X	0,0045	12:06	x
5	M	30	ET	7	157	188	210	0,1830	12:31	11:12
6	F	18	AS	273	16	21	17	0,0323	11:53	10:48
7	M	24	AS	295	12	372	330	0,3035	13:07	09:24
8	M	28	AS	176	15	14	13	0,0021	x	09:29
9	F	30	AS	131	22	18	19	0,0011	14:50	10:51
10	F	30	F	127	22	21	18	0,0118	12:29	07:02
11	F	26	AS	181	28	21	23	0,0001	14:05	10:02
12	F	20	AS	96	30	24	X	0,0043	14:50	x
13	F	18	AS	239	17	16	20	0,0492	11:58	10:42
14	F	18	AS	184	18	18	15	0,0008	12:11	08:29
15	F	55	F	104	46	33	34	0,0071	16:20	08:11
16	F	19	AS	102	10	10	9	0,0016	13:39	12:12
17	F	30	F	42	25	18	20	0,0091	13:46	07:19
18	F	21	AS	96	8	9	8	0,0017	11:36	08:04
19	F	52	AS	94	23	21	19	0,0070	13:14	11:10
20	M	32	AS	150	13	13	12	0,0059	13:07	08:10
21	F	37	F	12	12	11	X	0,0048	12:02	x
22	M	23	ET	7	21	17	16	0,0027	19:49	06:48
23	F	17	AS	283	11	27	18	0,0414	15:13	09:41
24	F	48	AS	189	22	25	27	0,0606	13:37	05:33
25	F	18	AS	329	62	58	55	0,0168	13:31	10:00
26	F	48	AS	182	14	12	11	0,0015	16:41	07:23
27	F	30	AS	146	20	16	16	0,0096	12:30	09:33

28	F	18	AS	184	66	57	54	0,0133	14:27	08:21
29	F	16	F	5	12	12	X	0,0017	12:42	x
30	F	36	F	16	18	21	X	0,0280	12:57	x
31	M	49	AS	283	39	36	28	0,0028	11:50	02:39
32	F	26	AS	166	11	10	8	0,0298	16:16	05:35
33	F	36	F	26	100	78	X	0,2793	16:15	x
34	F	40	F	48	10	8	X	0,0022	12:32	x
35	F	18	AS	23	18	13	14	0,0143	11:23	10:17
36	F	23	F	35	15	13	13	0,0005	13:24	09:50
37	F	34	ET	11	20	18	17	0,0100	14:21	05:03
38	F	20	AS	169	52	41	34	0,0062	14:25	07:54

**Appendice 1.** Parametri clinici della coorte di pazienti con sovradosaggio di paracetamolo (n = 38). F: femmina; M: maschio; Overdose: ET: eccesso terapeutico; AS: acuta singola; F: frazionata; T0: analisi ematica al momento del ricovero; ALT: alanina aminotransferasi; T10: analisi ematica 10 ore dopo l'inizio del trattamento; T20: analisi ematica 20 ore dopo l'inizio del trattamento.



## 7. Sviluppo di una metodica di laboratorio per il dosaggio sierologico delle amatossine

### 7.2 Dosaggio ematico delle amatossine nell'intossicazione da funghi

Come discusso nel capitolo relativo alla gestione clinica dell'intossicazione da funghi, l'ipotesi diagnostica viene inizialmente posta su base anamnestica e clinica. La diagnosi di certezza è però subordinata alla conferma laboratoristica.

I classici esami di laboratorio della funzionalità epatica e renale possono però non essere di aiuto nelle prime fasi dell'avvelenamento (Butera R et al., 2006; Raffaella Butera R et al., 2004).

Il trattamento precoce migliora significativamente la prognosi, ma il trattamento dovrebbe essere cominciato solo in seguito alla conferma dell'esposizione. Questa, ad oggi, avviene tramite il dosaggio dell' $\alpha$  amanitina urinaria.

Dopo l'ingestione orale di *Amanita phalloides* nell'uomo, l' $\alpha$ - e la  $\beta$ -amanitina sono state rilevate nel plasma fino a 36 ore mentre vengono rilevate nelle urine fino a 72 ore dopo l'esposizione (Locatelli et al., 2007).

Tuttavia, la determinazione dell'amanitina nei liquidi biologici è difficoltosa in quanto si tratta una metodica poco affidabile (falsi positivi) e non prontamente disponibile in tutti i laboratori degli ospedali.

Il test di laboratorio comunemente utilizzato è la rilevazione nell'urina utilizzando un saggio immunoassorbente legato all'enzima (ELISA), che non può essere considerato affidabile perché manca di specificità, e quindi richiede che la positività venga confermata con una tecnica alternativa.

Sono stati sviluppati diversi metodi cromatografici per l'analisi dell'amanitina in urina, come *HPLC-UV* (Enjalbert et al., 1992; Enjalbert et al., 2015; Jehl et al., 1985; Sgambelluri et al., 2014), *HPLC-MS after solid-phase extraction* (Helfer et al., 2014; Maurer et al., 1997, 2000; Vujović et al., 2015), *HPLC-MS/MS with ion trap system* (Filigenzi et al., 2007), *time-of-flight (TOF) MS* (Tomková et al., 2015), *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS (MALDI-TOF MS)* (Gonmori et al., 2012), and *UPLC59 MS/MS* (Chung et al., 2007; Nomura et al., 2012; Tanahashi et al., 2010)

Il dosaggio urinario può confermare o escludere la diagnosi, ma non classifica la gravità dell'intossicazione. Al contrario, l'analisi delle amanitine nel siero o nel plasma non viene abitualmente utilizzata, ma potrebbe essere utile per stadiare la gravità dell'intossicazione.

Ad oggi, nessun metodo è stato sviluppato e convalidato per la determinazione simultanea di  $\alpha$ - e  $\beta$ -amanitina nel siero (o plasma) utilizzando la metodica (*UPLC-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography 65 coupled with single quadrupole mass spectrometry)*).

L'obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare un metodo semplice e veloce adatto a finalità tossicologiche e cliniche di routine che consentano una precoce e definitiva diagnosi nell'avvelenamento da funghi contenenti amatoossine. Pertanto, è stata sviluppata e convalidata una procedura che consente di risparmiare tempo e denaro utilizzando UPLC-MS per la rilevazione delle amanitine nel siero e nel plasma.

### **7.3 Reagenti e materiali**

L' $\alpha$ -,  $\beta$ -amanitina e la tilmicosina (purezza  $\geq 98\%$ ), utilizzati come standard interno, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

L'acido formico 99% HiPerSolv CHROMANORM<sup>®</sup> LC-MS e l'acido o-fosforico  $\geq 85\%$ , HiPerSolv CHROMANORM<sup>®</sup>, sono stati ottenuti da VWR International (Merck KGaA, Darmstadt).

Il metanolo-RS per UHPLC-MS, è stato acquistato da Carlo Erba Reagents Italia.

L'acqua ultra pura è stata ottenuta dal Millipore Milli-Q Integral 5 System (Merck KGaA, Darmstadt).

È stato utilizzato collettore per vuoto per estrazione in fase solida SPE a 20 posizioni Waters per l'elaborazione simultanea di un massimo di 20 cartucce. Le cartucce Oasis PRiME HLB da 1 cc (30 mg) sono state acquistate da Waters (Milford, MA, USA).

Gli estratti secchi dei campioni di siero sono stati ricostituiti in metanolo e quindi filtrati attraverso dispositivi di filtraggio a siringa (Waters AcrodiscGHP, 13 mm, dimensione dei pori 0,2  $\mu\text{m}$ ).

La colonna di separazione CORTECS UPLC C18 + (1,6  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm,) e la precolonna CORTECS C18 + VanGuard (90Å, 1,6  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 5 mm, sono state acquistate da Waters (Milford, MA, USA).

Il siero liofilizzato Blankcheck SE, certificato come controllo di qualità del bianco della matrice materiale, è stato ottenuto da ACQ Science GmbH (Rottenburg-Hailfingen, Germania).

### **7.4 Strumentazione**

La separazione cromatografica è stata eseguita sul sistema ACQUITY UPLC<sup>™</sup> accoppiato con un rilevatore di massa QDa (Waters, Milford, MA, USA).

Entrambi i sistemi sono stati controllati utilizzando MassLynx 4.1 (Waters, USA).

### **7.5 Condizioni UPLC**

La colonna utilizzata è stata una colonna CORTECS C18 + a fase inversa (Waters, USA), 100 mm x 2,1 mm, con una dimensione delle particelle di 1,6  $\mu\text{m}$ . Le fasi mobili erano 0,2% acido formico in acqua (fase mobile A) e acido formico 0,2% in metanolo (fase mobile B).

È stato avviato un programma a gradiente con il 95% di A e il 5% di B, con l'aumento della fase B. linearmente al 30% nei primi 4 min, raggiungendo il 40% a 6 min e rimanendo costante per 2 min. La fase mobile è poi tornata alla composizione iniziale ed equilibrata per 2 min prima della successiva iniezione. Il tempo di analisi totale per ogni campione è stato di 10 min. Il flusso della velocità era di 0,3 mL / min e il volume di iniezione era di 10 µL.

La temperatura della colonna era di 40 ° C.

### 7.6 Condizioni di Spettrometria di Massa (MS)

I campioni sono stati analizzati con lo spettrometro di massa a singolo quadrupolo (QDa) (Waters,), dotato di una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI) in positivo. Il rilevamento delle amanitine e dell'IS è stato ottenuto mediante la registrazione selettiva di ioni (SIR) degli ioni molecolari dei composti di interesse.

Le condizioni MS erano le seguenti: tensione capillare 132, 1,2 kV; sonda: 400 ° C. Il cono la tensione è stata ottimizzata per ogni ione come riportato nella **Tabella 7**.

Compound	Target ion	Cone voltage (V)	Qualifier ion	Cone voltage (V)
alfa- Amanitin	919.0	44	901.0	50
beta- Amanitin	920.0	44	902.0	50
Tilmicosin (IS)	869.6	45	695.5	45

**Tabella 7.** Condizioni di Spettrometria di Massa: cone volage per ogni ione

#### *Soluzione madre e standard di calibrazione*

Sono state preparate soluzioni standard individuali di  $\alpha$ -amanitina e  $\beta$ -amanitina in metanolo (100 µg / mL) e conservate al buio a -20 ° C. Una miscela contenente entrambi gli analiti alla concentrazione di 50 µg / mL è stata quindi preparata e suddivisa in aliquote, che sono state congelati a -20 ° C. Un'aliquota da 1 mL è stata scongelata ogni giorno.

Le soluzioni standard di lavoro di ciascun analita, variabili da 25 ng / mL a 1 µg / mL, sono state preparate giornalmente attraverso diluizioni seriali con metanolo.

1,00 mg di Tilmicosina è stata prima diluita in 10 mL di metanolo. Dopo diluizioni seriali,

la soluzione di lavoro IS è stata preparata fresca ogni giorno alla concentrazione di 0,50 µg / mL in metanolo.

Tutte le soluzioni standard sono state conservate al buio a +4 ° C.

Sono state preparate tre tipi di curve standard per tre giorni, non consecutivi.

Le curve del gruppo I erano curve di soluzione standard, tracciate utilizzando lo standard disciolto con metanolo in soluzioni di 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng / mL.

Le curve del gruppo II erano *matrix-matched standard curves* ottenute combinando aliquote di soluzioni di lavoro seguite da diluizione con estratti di campioni bianchi a concentrazioni di 2,5, 5, 10, 25, 50 e 100 ng / mL, che servivano come curve di calibrazione per calcolare i parametri di convalida.

Infine, le curve del gruppo III sono state ottenute da *matrix-fortified standard samples*, tracciati utilizzando estratti di campioni aggregati in bianco addizionati prima della preparazione del campione a livelli di 2,5, 5, 10, 25, 50 e 100 ng / mL.

### **7.7 Preparazione del campione**

Il metodo di estrazione e pulizia del campione è stato modificato da un precedente procedura riportata nel lavoro di Zhang S, 2016. La miscela di 1 mL di campione di plasma o siero e 1 mL di 4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in acqua distillata è stata caricata lentamente sulle cartucce PRIME HLB. Poi ciascuna cartuccia è stata lavata due volte con 1 mL di metanolo al 5% in acqua. Il trattenuto dei composti è stato infine eluito con 1 mL di metanolo prima dell'analisi LC-MS.

## **7.8 Recupero (RE) ed effetto matrice (ME)**

I valori RE e ME sono stati calcolati secondo l'approccio semplificato descritto da Matuszewski et al. (Matuszewski et al., 2003) La ME è stata determinata come rapporto percentuale tra la pendenza del gruppo II e la pendenza del gruppo I. RE è stata calcolata come rapporto percentuale tra la pendenza del gruppo III e la pendenza del gruppo II.

## **7.9 Studio di validazione**

Al fine di convalidare le prestazioni del metodo, l'accuratezza (precisione e veridicità) è stata studiata secondo le linee guida Eurachem (Magnusson & Örnemark U, 2014).

Il metodo di calibrazione dello standard esterno è stato utilizzato per la valutazione della linearità della calibrazione della matrice (2.5, 5.0, 10, 25, 50, 100 ng / ml). Sono stati preparati dieci replicati di ciascun campione di controllo qualità (QC) a concentrazioni diverse (2,5, 4,0, 40 e 80 ng / ml) in quattro giorni diversi.

L'incertezza di misura è stata valutata secondo la Guida EURACHEM / CITAC (Ellison & Williams, 2012). Per gli analiti selezionati, le concentrazioni sono influenzate dalla ripetibilità e dai componenti di calibrazione. Da notare che l'incertezza associata al recupero non viene considerata perché la curva di calibrazione era stata fatta utilizzando siero umano.

L'incertezza di campionamento è molto piccola e può essere ignorata.

Secondo la guida EURACHEM / CITAC, "l'incertezza estesa" è definita come "un intervallo che dovrebbe includere un'ampia frazione della distribuzione di valori ragionevolmente attribuibili al misurando".(Ellison & Williams, 2012) Un fattore di copertura di 2 è stato scelto in quanto fornisce un intervallo contenente circa il 95% della distribuzione dei valori.

Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è qui definito come il più basso valore che può essere determinato quantitativamente con adeguata precisione e accuratezza (veridicità).

Il limite di rilevamento (LOD) è la concentrazione con un rapporto segnale / rumore di 3: 1.

## **7.10 Risultati**

### **7.10.2 Selettività**

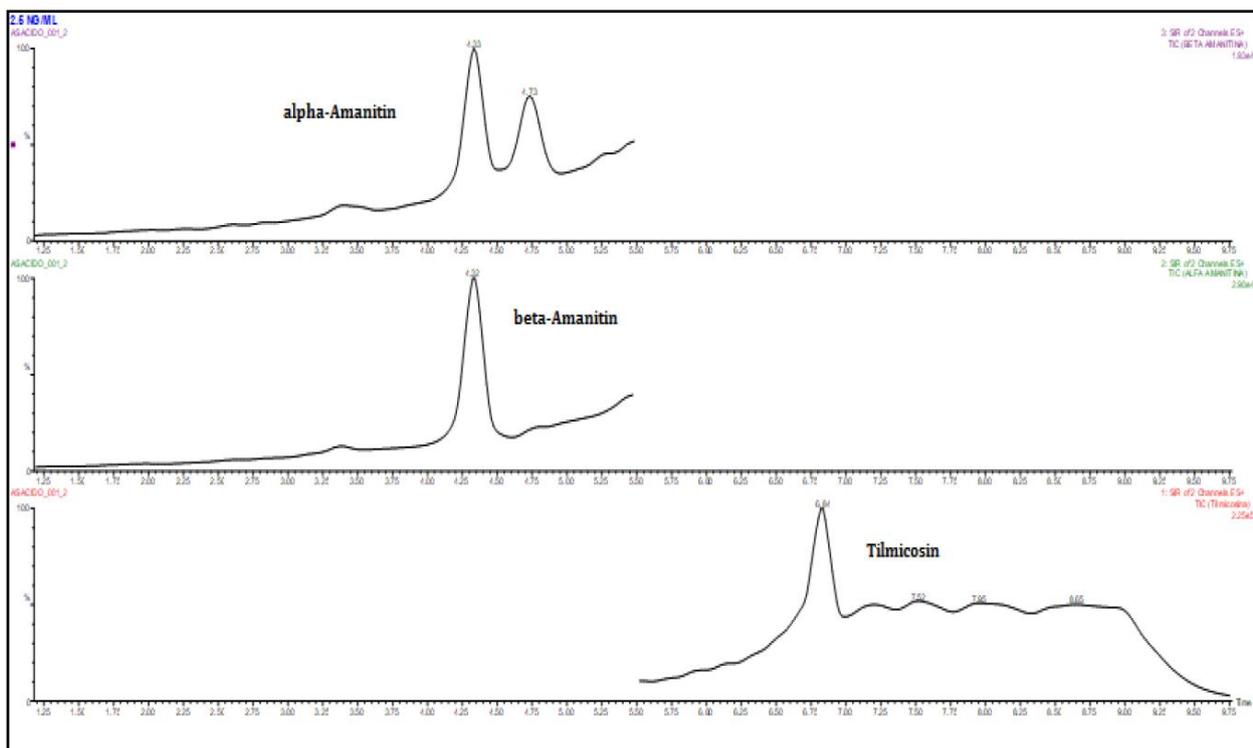
La  $\alpha$ -amanitina, la beta-amanitina e la tilmicosina sono state identificate e confermate dal loro tempo di ritenzione relativo (RRT), transizioni ioniche e spettro di massa. Ai fini della quantificazione, le transizioni ioniche erano 919,0> 200901,0 per  $\alpha$ -amanitina e 920,0> 902,0 per beta-amanitina.

La selettività / specificità è stata verificata analizzando diversi sieri “bianchi”. Ai tempi di ritenzione previsti per gli analiti, non è stato possibile rilevare picchi interferenti in uno qualsiasi dei campioni analizzati, che potrebbero portare a una erronea identificazione del composto.

Questo fatto può essere confermato attraverso le analisi comparative tra campioni fortificati con IS da solo e con entrambe le tossine.

Si è ottenuta una buona separazione cromatografica, che ha consentito la quantificazione dei due composti e dell'IS, in 10 min.

I tempi di ritenzione di  $\alpha$ -amanitina, beta-amanitina e tilmicosina sono stati rispettivamente 4.3, 4.7, e 6.8 (Figura 30). Le procedure di estrazione e pulizia utilizzate per il siero combinato con UPLC-MS hanno permesso di avere cromatogrammi con un'interferenza di fondo minima. Inoltre, le  $\alpha$ - e beta-amanitine, che sono molecole omologhe, si presentavano cromatograficamente separate in queste condizioni.



**Figura 30.** Cromatogramma rappresentativo del siero bianco addizionato con 2,5 ng / mL di  $\alpha$ -amanitina e beta-amanitina e 25 ng / ml di tilmicosina (IS)

## 7.11 Studio di validazione

### 7.11.2 Linearità

Le curve di calibrazione con corrispondenza della matrice (Matrix-matched calibration curves) sono state utilizzate per valutare i parametri di convalida.

Sono state create curve di calibrazione multilivello per la quantificazione e una buona linearità veniva raggiunta nell'intervallo di concentrazione 2,5 - 100 ng / ml per entrambi gli analiti.

Valori accettabili di linearità presentavano coefficiente di regressione  $r > 0,99$  e il diagramma dei residui ha confermato la bontà di adattamento del modello di regressione, con coefficienti di correlazione maggiori di 0,999.

Il limite di rilevamento è stato impostato a 0,7 ng / mL sia per gli analiti che per l'IS. Il limite inferiore di quantificazione (LLQ) sono stati impostati a 2,5 ng / mL.

### 7.11.3 Precisione e veridicità

L'accuratezza è stata valutata su campioni di siero arricchiti (10 replicati) a quattro diverse Concentrazioni (2,5, 4, 40 e 80 ng / ml). La precisione, espressa come coefficiente di variazione (CV), non ha mai superato il 10% (tabelle 2 e 3).

L'esattezza variava dal 97,3 al 126%. **Tabella 8 e 9**

QC	Nominal conc. (ng/mL)	Experimental conc. (ng/mL, n = 10)		Trueness (% , n = 10)	Precision (CV%)
		Mean	SD		
1 (LLOQ)	2.5	3.1	0.3	126	8.1
2	4.0	4.2	0.1	105	3.4
3	40	40.2	0.4	100	0.9
4	80	79.6	0.3	99.5	0.4

**Tabella 8.** Parametri di convalida (precisione e veridicità) per la  $\alpha$ -amanitina

QC	Nominal conc. (ng/mL)	Experimental conc. (ng/mL, n = 10)		Trueness (% , n = 10)	Precision (CV%)
		Mean	SD		
1 (LLOQ)	2.5	3.1	0.2	124	7.1
2	4.0	4.1	0.4	103	8.6
3	40	40.1	0.3	100	0.8
4	80	77.9	1.4	97.3	1.8

**Tabella 9.** Parametri di convalida (precisione e veridicità) per la beta-amanitina

#### 7.11.4 Recupero ed effetto matrice

I valori di recupero erano compresi tra l'88,2 e il 102% per la  $\alpha$ -amanitina e tra 86,4 e 116,8% per la beta-amanitina. Il valore medio (n = 3 giorni) dell'effetto matrice, determinato come rapporto percentuale tra la pendenza del gruppo II e la pendenza del gruppo I, era dell'11,8% e del 15,0% per la  $\alpha$ - e beta-amanitina, rispettivamente.

#### 7.11.5 Incertezza di misurazione

Per ottenere preziose informazioni sulla qualità e l'affidabilità dei risultati, una corretta valutazione dell'incertezza è inevitabile. La valutazione dell'incertezza è stata effettuata calcolando le componenti associate con ripetibilità e calibrazione strumentale.

L'incertezza del campionamento può essere ignorata in quanto trascurabile rispetto agli altri fattori. L'incertezza espansa relativa ha mostrato buone prestazioni nella determinazione degli analiti nel siero.

Il valore di incertezza della  $\alpha$ -amanitina e della beta-amanitina è stato fissato rispettivamente al 17,2% e 9,0%, al LLOQ dei QC. I valori ottenuti sono stati trovati accettabili e sempre <10% per tutte le altre concentrazioni di QC. **Tabella 10 e 11**

Poiché un metodo è convenzionalmente considerato affidabile quando il totale dell'incertezza è inferiore al 30% (Eurachem / CITAC Guide, 2012) questa procedura può essere ritenuta idonea allo scopo, vale a dire idonea alla routinaria analisi tossicologica in emergenza.

QC	Nominal conc. (ng/mL)	U exp.	u Comb.	u Cal.	u Rep.
1 (LLOQ)	2.5	17.2	6.7	6.2	2.5
2	4.0	1.7	0.6	0.2	0.1
3	40	1.6	0.7	0.2	0.3
4	80	7.0	2.7	2.5	1.1

**Tabella 10.** Incertezza espansa e componenti dell'incertezza per la  $\alpha$ -amanitina

QC	Nominal conc. (ng/mL)	U exp.	u Comb.	u Cal.	u Rep.
1 (LLOQ)	2.5	9.0	3.9	3.2	2.2
2	4.0	1.9	0.9	0.3	0.6
3	40	1.6	0.7	0.3	0.3
4	80	9.0	4.0	3.0	2.7

**Tabella 11.** Incertezza espansa e componenti dell'incertezza per la beta-amanitina

### 7.12 Applicazione su campioni di pazienti con intossicazione da amatossine

I campioni di 20 pazienti con sospetto avvelenamento accidentale da funghi sono stati analizzati utilizzando questo metodo UPLC-MS.

Un campione di urina e uno di sangue sono stati raccolti contemporaneamente per ogni singolo paziente, entro 20 ore dall'ingestione dei funghi. L'urina è stata analizzata secondo il metodo standard per la diagnostica di avvelenamento di amatossine, utilizzando un metodo ELISA, i risultati sono stati poi confrontati con quelli ottenuti dall'analisi UPLC-MS dei campioni di siero.

Data la piccola dimensione del campione, non è possibile eseguire 267 test di significatività statistica. Tuttavia, i dati preliminari hanno mostrato che esiste una buona corrispondenza tra le due serie di risultati. L' $\alpha$ -amanitina è stata rilevata in 10 campioni su 20, con un LLOQ di 1,0 ng / mL. Tra i corrispondenti campioni di siero, 5 erano positivi per  $\alpha$ -amanitina e 2 erano positivi anche per la beta-amanitina (Tabella 12). I campioni negativi per il dosaggio urinario sono risultati negativi anche nel dosaggio sierico.

Questi risultati sono coerenti con studi precedenti che confermano che le amanitine sono eliminate dal sangue entro 30 ore dall'ingestione, ma possono rimanere nelle urine fino a tre giorni. Inoltre, si può ipotizzare che alcuni campioni di urina risultino essere positivi per la presenza di  $\alpha$ -amanitina anche in altre specie di funghi. Questo potrebbe spiegare perché i valori di  $\alpha$ -amanitina urinari non sono direttamente correlati alla gravità dei sintomi.

Cinque pazienti su 20 hanno sviluppato un danno epatico significativo (ALT > 1000). In particolare, due soggetti (campione ID n. 4 e n. 8) hanno mostrato grave epatite con ALT 9900 e 2515 UI / L, rispettivamente (valori normali 20-60 UI / L). In questi due esempi, È stata rilevata anche la beta-amanitina, il che potrebbe suggerire che questa tossina abbia un ruolo nei casi di avvelenamento grave. Tutti i pazienti con livelli di amanitina urinaria inferiori a 10 ng / mL non hanno mostrato un quadro clinico grave.

Ulteriori ricerche potranno chiarire la correlazione tra livelli sierici ed urinari di amanitine, inclusa la determinazione della  $\gamma$ -amanitina, che potrebbe interferire con il test ELISA.

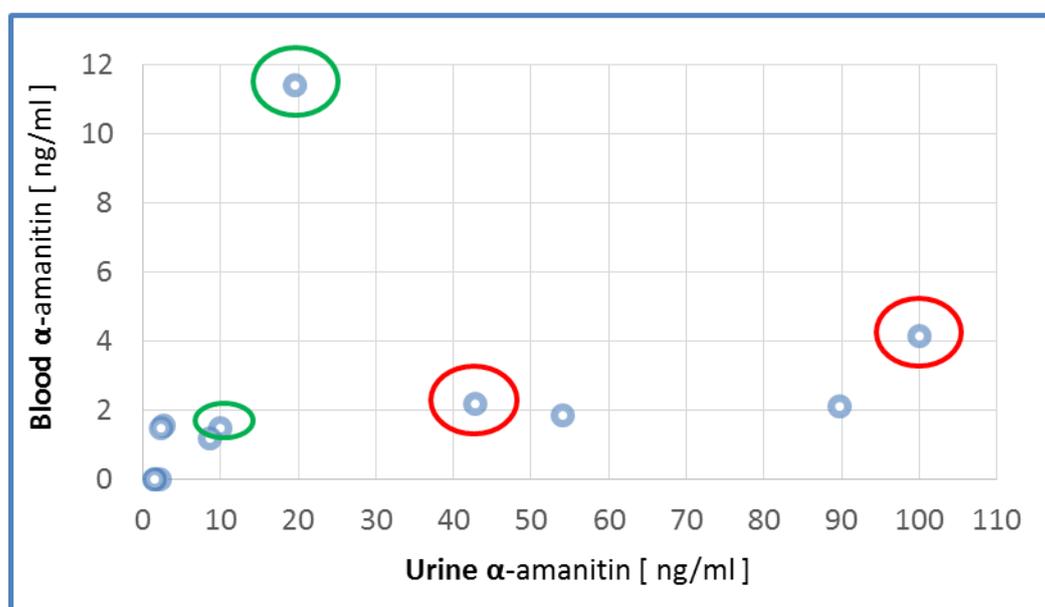
<b>Id sample</b>	<b>alpha-amanitin in urine (ng/mL)</b>	<b>alpha-amanitin in serum (ng/mL)</b>	<b>beta-amanitin in serum (ng/mL)</b>
1	< 1.0	< 2.5	< 2.5
2	< 1.0	< 2.5	< 2.5
3	< 1.0	< 2.5	< 2.5
4	42.7	2.5	22.4
5	19.6	11.4	< 2.5
6	2.2	< 2.5	< 2.5
7	9.9	< 2.5	< 2.5
8	> 100	4.1	3.3
9	89.8	2.5	< 2.5
10	8.5	< 2.5	< 2.5
11	2.5	2.5	< 2.5
12	1.5	< 2.5	< 2.5
13	1.4	< 2.5	< 2.5
14	< 1.0	< 2.5	< 2.5
15	< 1.0	< 2.5	< 2.5
16	< 1.0	< 2.5	< 2.5
17	< 1.0	< 2.5	< 2.5
18	< 1.0	< 2.5	< 2.5
19	< 1.0	< 2.5	< 2.5
20	< 1.0	< 2.5	< 2.5

**Tabella 12.** Risultati analitici sui campioni.

### 7.13 Risultati

Dieci pazienti sono risultati positivi per  $\alpha$ -amanitina urinaria. Di questi la metà (n=5) hanno sviluppato danno epatico clinicamente significativo (ALT > 1000). Di questi, due pazienti hanno presentato una epatite grave con picchi di transaminasi ALT 9900 and 2515 IU/L (normal value 20-60 IU/L).

Da notare che la gravità della clinica non è risultata correlata ai valori di  $\alpha$ -amanitina. I due pazienti con tossicità epatica più marcata avevano valori di  $\alpha$ -amanitina urinaria pari a 42.71 and 100.00 ng/mL. Gli altri tre pazienti con danno epatico avevano valori di  $\alpha$ -amanitina pari a 9.94, 19.59 e 89.79 ng/mL. I pazienti con transaminasi nella norma avevano tutti valori di  $\alpha$ -amanitina inferiori a 10 ng/mL, eccetto uno che presentava un valore pari 54 ng/ml. **Figura 31**

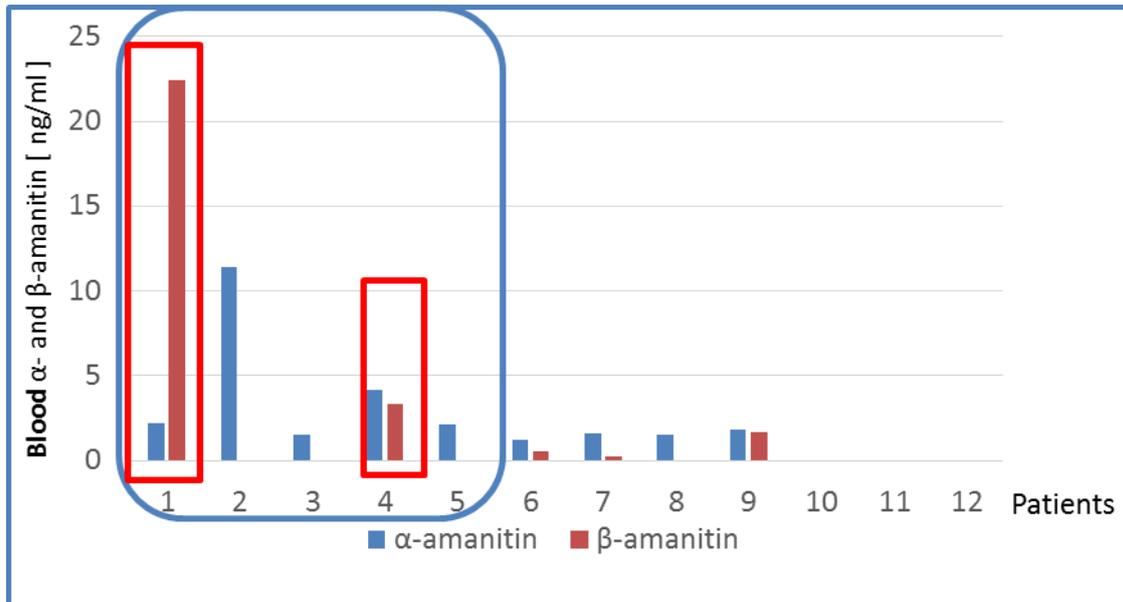


**Figura 31.** L' $\alpha$ -amanitina è rilevabile nelle urine e nei campioni di sangue di pazienti avvelenati, ma i valori non sono correlati alle caratteristiche cliniche. Cerchiato in verde i pazienti con danno epatico clinicamente significativo (ALT > 1000); cerchiato in rosso i pazienti con ALT più elevate: 9900 e 2515.

L'analisi della beta-amanitina ematica ha mostrato un risultato interessante. Questa è stata rilevata a valori elevati nei due pazienti che hanno avuto maggiore tossicità epatica (ALT 9900 and 2515 IU/L) e nel primo paziente presentava valori addirittura più alti rispetto a quelli dell' $\alpha$ -amanitina. Da notare, che questa tossina era assente nei campioni biologici degli altri tre pazienti con tossicità epatica ma presente in

in alcuni pazienti senza danno epatico (**Figura 31**). In quest'ultimo caso i valori erano comunque molto bassi e mai superiori a quelli dell' $\alpha$ -amanitina (**Figura 32**).

Quindi, al momento, potremmo suggerire un possibile ruolo della beta-amanitina nell'avvelenamento grave. Inoltre, nessuna correlazione tra  $\alpha$ -e beta-amanitina sembra essere presente.



**Figura 32.** I pazienti con epatite grave presentavano l'espressione di  $\alpha$ - e in particolare di  $\beta$ -amanitina all'analisi ematica. I pazienti da 1 a 5 hanno sviluppato un danno epatico clinicamente significativo (ALT >1000). I pazienti 1 e 4 (quadrati in rosso) hanno valori massimi di ALT 9900 e 2515, rispettivamente

## **8. Ruolo dei miRNAs nell'avvelenamento da funghi contenenti amatossine - studio clinico prospettico**

### **8.2 Scopo dello studio**

Questa seconda parte prevede una fase preliminare in cui vengono studiati gli effetti della  $\alpha$ -amanitina su una linea di cellule epatiche e la conseguente espressione di due selezionati microRNA. L'altra fase è rappresentata da uno studio clinico prospettico in cui viene testato il profilo di miRNA in campioni biologici di pazienti umani con sospetta intossicazione da funghi contenenti amatossine. Lo scopo principale è quello di valutare se vi siano uno o più miRNA che possano essere correlati con l'intossicazione da amatossine, così da poterli successivamente impiegare come strumento diagnostico sensibile e specifico, analogamente a quanto studiato per il miR-122 nell'intossicazione da paracetamolo.

### **8.3 Materiali e metodi**

#### *Disegno sperimentale*

La prima fase si è svolta testando l' $\alpha$ -amanitina su cellule HepG2, una linea cellulare di epatocarcinoma umano, usate spesso come modello per lo studio del metabolismo epatico e per testare la tossicità epatica di xenobiotici. Su queste cellule è stato poi eseguito un saggio di vitalità e conta cellulare. Infine è stata studiata l'espressione di due microRNA, il miR-122 e il miR-155, associati a danno epatico di diversa natura.

La fase clinica si è svolta in un arco temporale di 18 mesi in cui sono stati reclutati dal Centro Antiveneni di Pavia, IRCCS Maugeri, i pazienti con sospetto diagnostico di intossicazione da funghi contenenti amatossine. I pazienti sono stati selezionati tra i casi sul territorio nazionale per i quali il prelievo dei campioni biologici e il successivo stoccaggio potesse avvenire in tempi ragionevoli (inferiori alle 24 ore). Un secondo gruppo di campioni è stato individuato tra quelli afferenti, per competenza territoriale, al Laboratorio Generale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze.

L'arruolamento nello studio non ha previsto alcuna deviazione dalle procedure diagnostiche e terapeutiche standard messe in atto usualmente per questo tipo di patologia. I campioni biologici per lo studio sono stati raccolti contestualmente ai campioni necessari per la diagnosi laboratoristica classica.

I dati clinici dei pazienti sono stati raccolti e catalogati in modo da poterli confrontare successivamente con i risultati di laboratorio. Il personale clinico e di laboratorio è rimasto all'oscuro dei rispettivi dati fino a che il lavoro non è stato concluso.

#### *Popolazione in studio*

Pazienti con intossicazione accertata da funghi contenenti  $\alpha$ -amanitina, definita dalla presenza di questi tre criteri

1. anamnesi positiva per ingestione di funghi
2. presenza di sintomatologia gastroenterica tipica con latenza di comparsa maggiore di 6 ore)
3. positività per il dosaggio dell' $\alpha$  amanitina urinaria (cut-off 5 ng/ml)

#### **8.4 Procedure dello studio**

##### *Procedure cliniche*

Una anamnesi dettagliata verrà raccolta al momento del primo contatto con i medici del CAV Pavia in merito a tipologia di funghi, luogo di raccolta, conservazione, preparazione, tempistiche di ingestione / sintomatologia, tipologia di sintomi e presenza di commensali.

I pazienti verranno reclutati qualora vi sia un ragionevole sospetto clinico di intossicazione da funghi contenenti amatossine. La conferma di tale intossicazione avverrà tramite ricerca su campione urinario dell' $\alpha$ -amanitina.

Tutti i pazienti verranno trattati con i protocolli standard per la gestione dell'avvelenamento da amatossine. Verrà studiata la funzionalità epatica e renale per tutta la durata del ricovero oltre al dosaggio della  $\alpha$ -amanitina.

I campioni biologici (sangue e urina) necessari allo studio saranno prelevati contestualmente ai campioni necessari per la gestione clinica del paziente.

I campioni saranno mantenuti in frigorifero a 4 gradi e trasferiti presso il laboratorio di riferimento per l'analisi dell' $\alpha$ -amanitina il prima possibile, mantenendo la catena del freddo, poi conservati a -20 ° C fino alla loro analisi. I classici marcatori di laboratorio di danno epatico (AST, ALT, INR) e renale (creatinina) saranno determinati presso l'ospedale di provenienza come parte della normale gestione del paziente, insieme alle raccolte di dati clinici dei pazienti.

##### *Procedure laboratoristiche*

Le cellule HepG2 sono state coltivate in presenza del terreno Dulbecco's Modification of Minimum Essential Medium (DMEM), addizionato di Siero Fetale Bovino (FBS) al 10%, di L-glutammina al 1% e degli antibiotici penicillina/streptomina, anch'essi al 1%.

Le cellule sono state mantenute in coltura in un incubatore a 37°C, in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

Le cellule HepG2, dopo 24 ore dalla semina in multiwell da 12 pozzetti, alla densità di  $1 \times 10^5$  cellule/pozzetto, sono state esposte ad una concentrazione sub-tossica di amanitina, ad una concentrazione finale di 4 ng/ml, per vari intervalli di tempo (24, 48, 72 e 96 ore) alla fine dei quali sia i terreni che le cellule sono stati raccolti per le analisi successive.

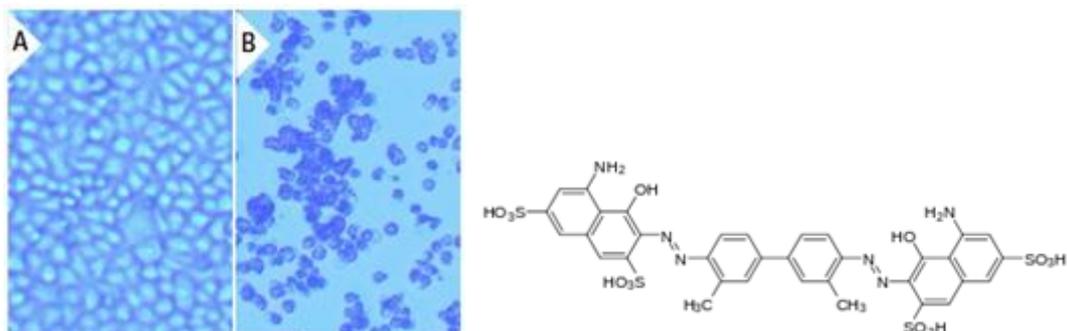
- *Saggio di vitalità cellulare MTS*

Per questa misurazione è stato usato il kit Titer 96™ Aqueous One solution cell proliferation (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) assay kit (Promega Madison, WI, USA).

Si tratta di un saggio colorimetrico basato sul sale giallo di tetrazolio che in cellule vive e quindi metabolicamente attive, viene captato e convertito nel sale formazano marrone dall'enzima succinato deidrogenasi della catena respiratoria mitocondriale. Il reattivo contiene un derivato tetrazolico (MTS o [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossilfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sale interno]) e un reagente accettore di elettroni (fenazina etosolfato, PES). Il sale giallo di tetrazolio è ridotto dalle cellule, in presenza di PES, in formazano bruno, solubile nel terreno di coltura. Il formazano che si forma dà una misura delle cellule vitali presenti in ogni pozzetto. I risultati vengono espressi come percentuale di vitalità cellulare tra cellule non esposte ad amanitina e cellule esposte.

- *Conta cellulare con colorante vitale*

Per effettuare questa determinazione, una piccola aliquota di sospensione cellulare viene mescolata ad una soluzione di Trypan blu. Il Trypan blu non penetra attraverso la membrana di cellule vitali mentre colora di blu quelle non vitali. **Figura 33**



**Figura 33.** Esempio di un trypan blue exclusion test e formula del trypan blue.

Nello specifico, si prelevano 10 µl di sospensione cellulare e si mescolano con 10 µl di Trypan blue: si prelevano 10 µl della sospensione risultante che vengono inseriti nell'apposito alloggiamento sul vetrino per la conta. Il vetrino viene posizionato nel contatore COUNTESS™ (Invitrogen™) che consente di visualizzare le cellule, di contarle e di valutarne la vitalità. **Figura 34**



**Figura 34.** Immagine di un contatore COUNTESS™ (Invitrogen™) nel quale si inserisce il vetrino contenente le cellule da contare, colorate con il trypan blu. Lo strumento visualizza le cellule e conta sia quelle vitali che quelle morte, il cui citoplasma risulta colorato di blu.

- Estrazione di RNA dal mezzo di coltura delle cellule e dai campioni di siero e urina umani

Per l'estrazione dell'RNA totale dai vari campioni abbiamo utilizzato il protocollo Trizol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen). 200µl di terreno, urina o siero vengono mescolati a 300µl di TRIzol, si mescola vigorosamente mediante un vortex e si lascia incubare 5 minuti a temperatura ambiente, per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici.

Si aggiungono 150 µl di cloroformio, si agita ancora con il vortex, si lascia incubare 3 minuti a temperatura ambiente e si centrifuga a 12000 rpm per 15 minuti.

Dopo centrifugazione si ha una separazione di fase, si recupera la fase acquosa superiore e la si trasferisce in un nuovo tubo da 1.5 ml. Si aggiungono 400 µl di isopropanolo, si mescola e si incuba 10 minuti a temperatura ambiente. Si centrifuga a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Si lava il pellet con 1 ml di etanolo 70% e si centrifugare a 9000 rpm per 10 minuti a 4°C. Si allontana l'etanolo e si fare asciugare il pellet in uno Speed vacuum. Infine si aggiungono 20 µl di H<sub>2</sub>O RNasi free.

L'analisi quantitativa del RNA ottenuto è stata effettuata usando lo spettrofotometro NanoPhotometer® (Implen), misurando l'assorbanza a 260 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbe l'RNA e a 280 nm, alla quale assorbono le proteine. Il rapporto tra questi due valori (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) permette di stimare la presenza di contaminazione proteica: un rapporto compreso tra 1,7 e 2 è indicativo dell'assenza di contaminazione proteica.

La concentrazione dell'RNA estratto viene automaticamente misurata in ng/ml.

- *Analisi dei miRNA q-PCR*

La trascrizione inversa dell'RNA è stata eseguita utilizzando il kit miRCURY LNA RT secondo le istruzioni del produttore (Qiagen). I saggi qRT-PCR sono stati eseguiti con il sistema Rotor-Gene®Q PCR (Qiagen) utilizzando il kit miRCURY LNA SYBR® Green PCR e il saggio miRCURY LNA miRNA PCR secondo le istruzioni del produttore (Qiagen).

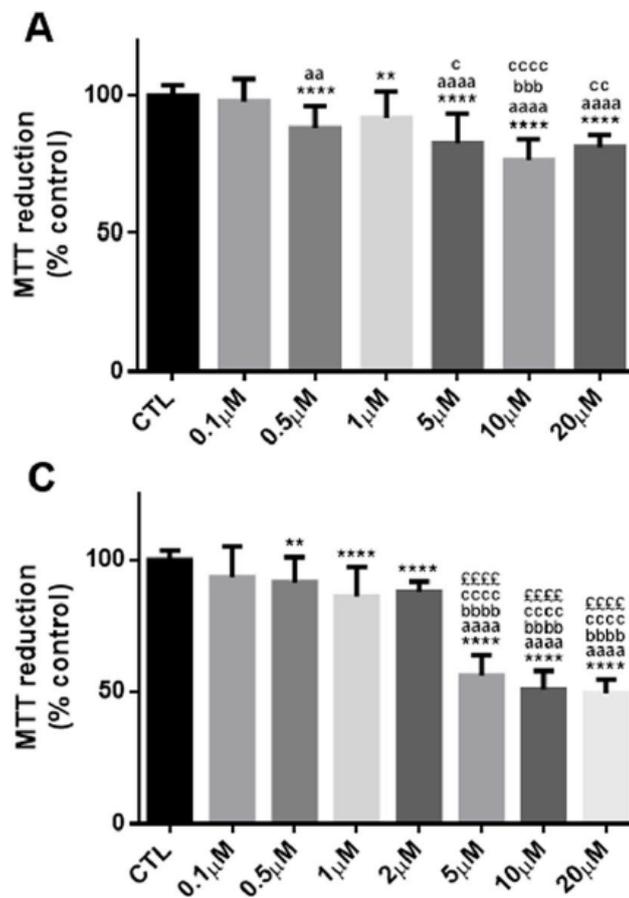
In breve, ogni reazione è stata eseguita in un volume finale di 10 µL contenente 2 µL di cDNA, un master mix contenente 5 µL di 2 × miRCURY SYBR Green PCR Master Mix, 1 µL di miRCURY LNA miRNA PCR Assay e acqua priva di RNasi.

Il protocollo di amplificazione è stato: iniziale step di attivazione a 95°C per 2 min, seguita da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 10 s, annealing/estensione combinata a 56°C per 60s. L'espressione dei miRNA di interesse è stata normalizzata a RNU6B e calcolata come  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ .

### 8.5 Risultati

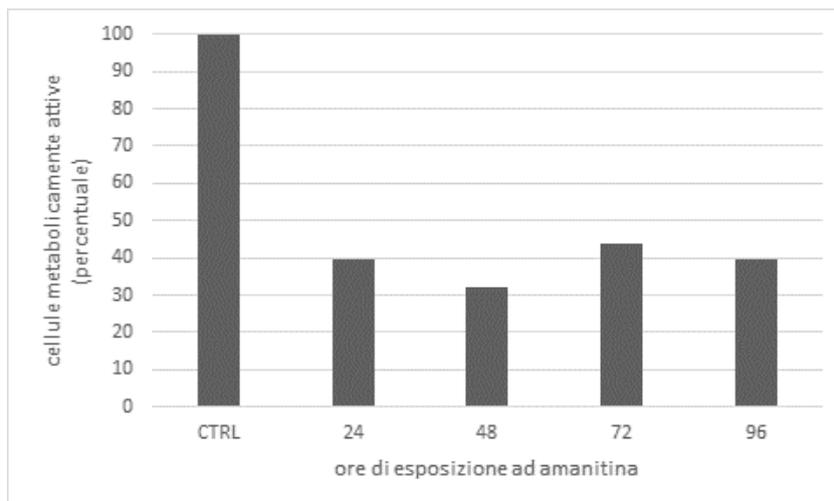
Per quello che riguarda lo studio su cellule di epatocarcinoma umano HepG2, la scelta della concentrazione finale di 4 ng/ml deriva dall'osservazione che le amanitine nelle urine sono rilevabili a concentrazioni comprese tra 48,0 e 4,8 ng/mL per l' $\alpha$ -amanitina e tra 75,0 e 7,1 ng/mL per la  $\beta$ -amanitina (Jaeger, 1993; Zhang, 2016).

Il nostro scopo era quello di non indurre una citotossicità troppo elevata e quindi ci siamo anche basati sui risultati riportati da Ferreira Rodrigues e collaboratori (2020) che esponendo per 24 e 48 ore ad  $\alpha$ -amanitina, cellule HepG2 a concentrazioni comprese tra 0,1 $\mu$ M e 20 $\mu$ M, alla concentrazione più bassa (che corrisponde a circa 100 ng/ml) non registravano alcuna tossicità. **Figura 35**



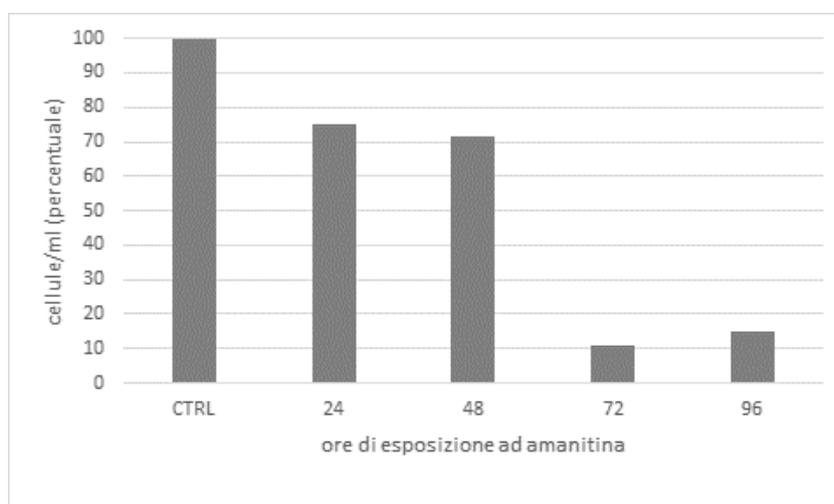
**Figura 35.** Risposta cellule HepG2 a concentrazioni comprese tra 0,1 $\mu$ M e 20 $\mu$ M per 24 (A) e 48 (B) ore. (Rodriguez F 2020)

Tuttavia, le nostre cellule hanno mostrato un notevole abbassamento della vitalità già a 24 ore (-60%) e questo abbassamento della vitalità si è mantenuto fino a 96 ore. **Figura 36**



**Figura 36.** Risultato del saggio MTS (saggio di attività metabolica) in cellule HepG2 di controllo ed esposte ad  $\alpha$ -amanitina, ai vari intervalli di tempo.

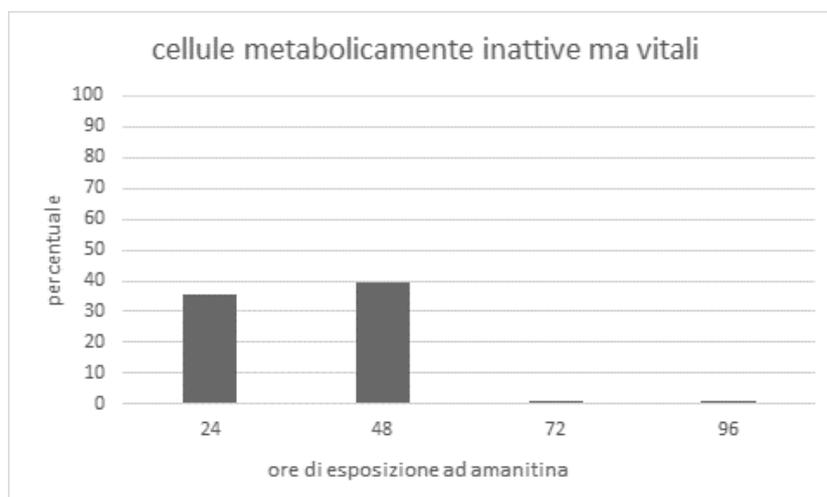
Per verificare se la ridotta attività metabolica fosse direttamente associata ad una morte cellulare, sono state contate le cellule presenti nei pozzetti ed è emerso che dopo 24 ore di esposizione ad amanitina, circa il 25-30% delle cellule muore e questa percentuale di mortalità si Mantiene fino a 48 ore. Dopo 72-96 ore di esposizione ad amanitina, il numero di cellule vive si riduce quasi completamente. **Figura 37**



**Figura 37.** Risultato del conteggio cellulare dopo esposizione ad amanitina 4 ng/ml, ai vari intervalli di tempo.

I dati di citotossicità suggeriscono che dopo 24-48 ore di esposizione ad amanitina, le cellule vadano in arresto, pur rimanendo vive mentre quando l'esposizione si prolunga esse non riescano a sopravvivere. Per

evidenziare meglio questo aspetto, è stata calcolata la frazione di cellule inattive ma vitali ad ogni intervallo di tempo. **Figura 38**

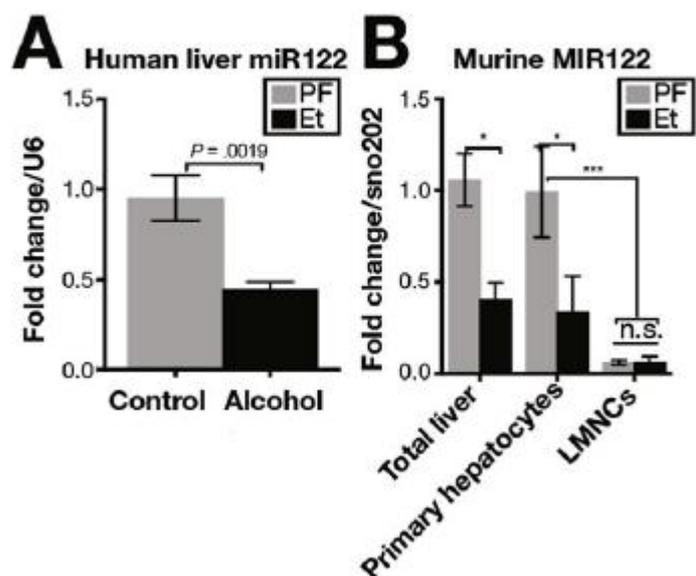


**Figura 38.** Percentuale di cellule vive ma inattive (in arresto metabolico).

Nello studio clinico sono stati reclutati un numero totale di 50 pazienti con manifestazioni cliniche riconducibili ad intossicazione da funghi contenenti amatossine. 24 pazienti presentavano una conferma laboratoristica con positività per amanitina urinaria. Tra questi sono stati selezionati 12 casi con livelli di amanitina urinari  $\geq$  a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (7 casi con sieri e urine, 4 con solo urine e 2 casi con sieri raccolti al momento del ricovero e dopo negativizzazione), e 7 casi negativi, come controlli (sieri più urine).

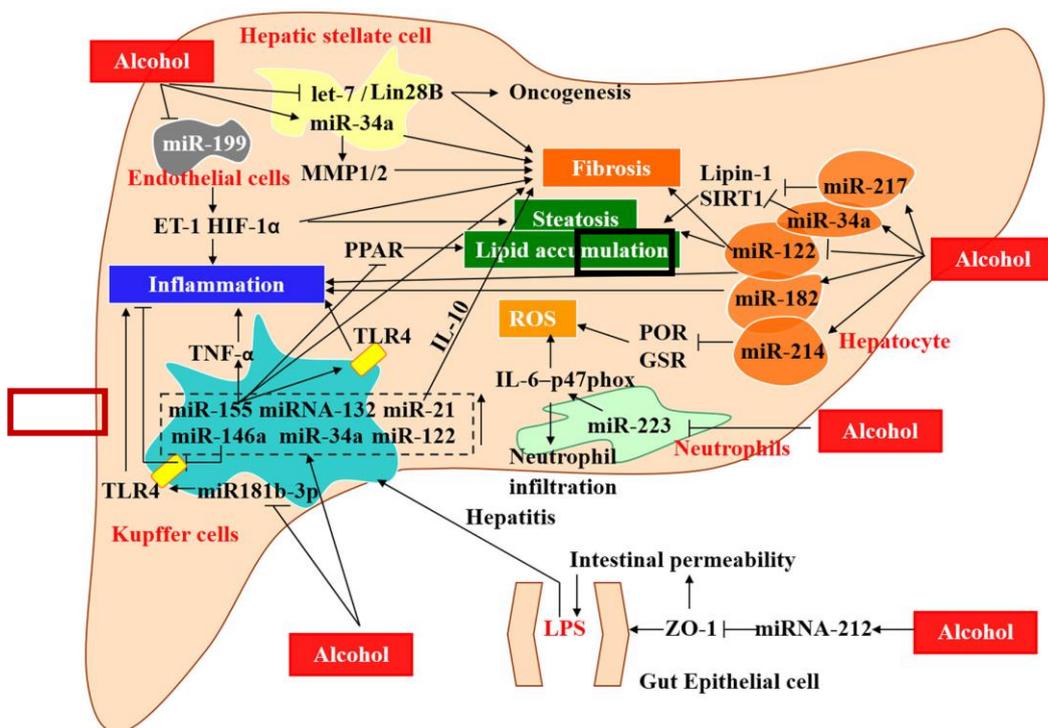
Per la ricerca di miRNA associabili all'avvelenamento da amanitina, abbiamo selezionato come possibili candidati 11 miRNA, **miR-122, -155, -146b-5p, -21-5p, -223-3p, -192-5p, -501-3p, -320a, -148a-3p, -200a-3p e -29b-3p**, tutti associati ad epatotossicità da farmaci, alcol e virus.

I livelli di miR-122 si abbassano nel fegato di pazienti con alcoholic liver disease (ALD) e in topi con danno epatico indotto da alcol (Satishchandran et al., 2018). **figura 39**



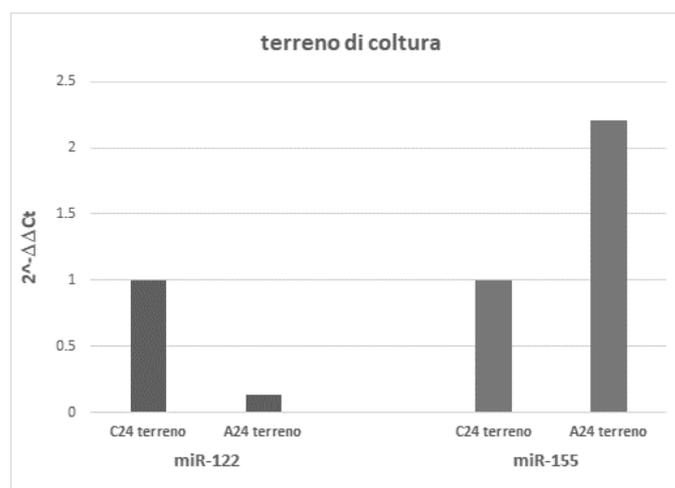
**Figura 39.** Livelli di miR-122 nel fegato di pazienti con ALD (A) e nel fegato di topi e cellule epatiche esposte ad alcol (B) (Satishchandran et al., 2018)

Il miR-155 risulta sovra-espresso in diverse condizioni patologiche epatiche. È stato suggerito che il miRNA-122 possa essere utile come marker di danno epatico e il miR-155 come marcatore di infiammazione e che la determinazione di entrambi possa consentire di discriminare i due tipi di danno epatico (Li et al., 2019). **Figura 40**



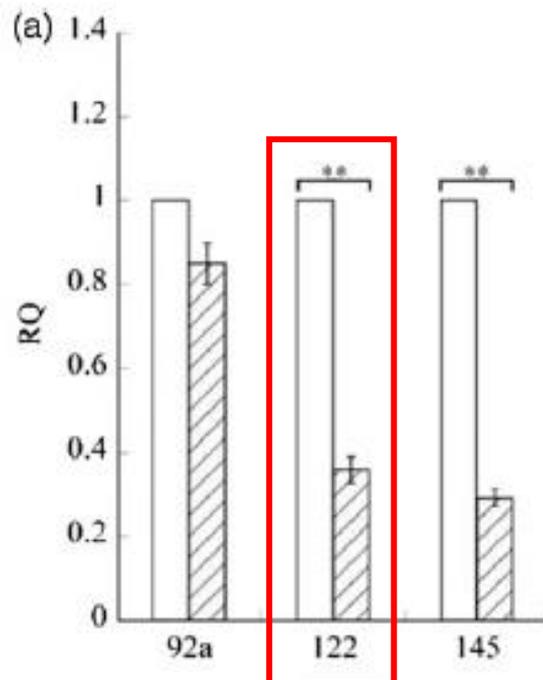
**Figura 40.** miRNA che vengono associati all'infiammazione/ danno epatico (Li et al., 2019).

La misura dei livelli di miR-122 e miR-155 nel terreno delle cellule HepG2 mostra che, mentre i livelli circolanti del miR-122 si abbassano, quelli del miR-155 aumentano, dopo 24 ore di esposizione ad amanitina. **Figura 41**



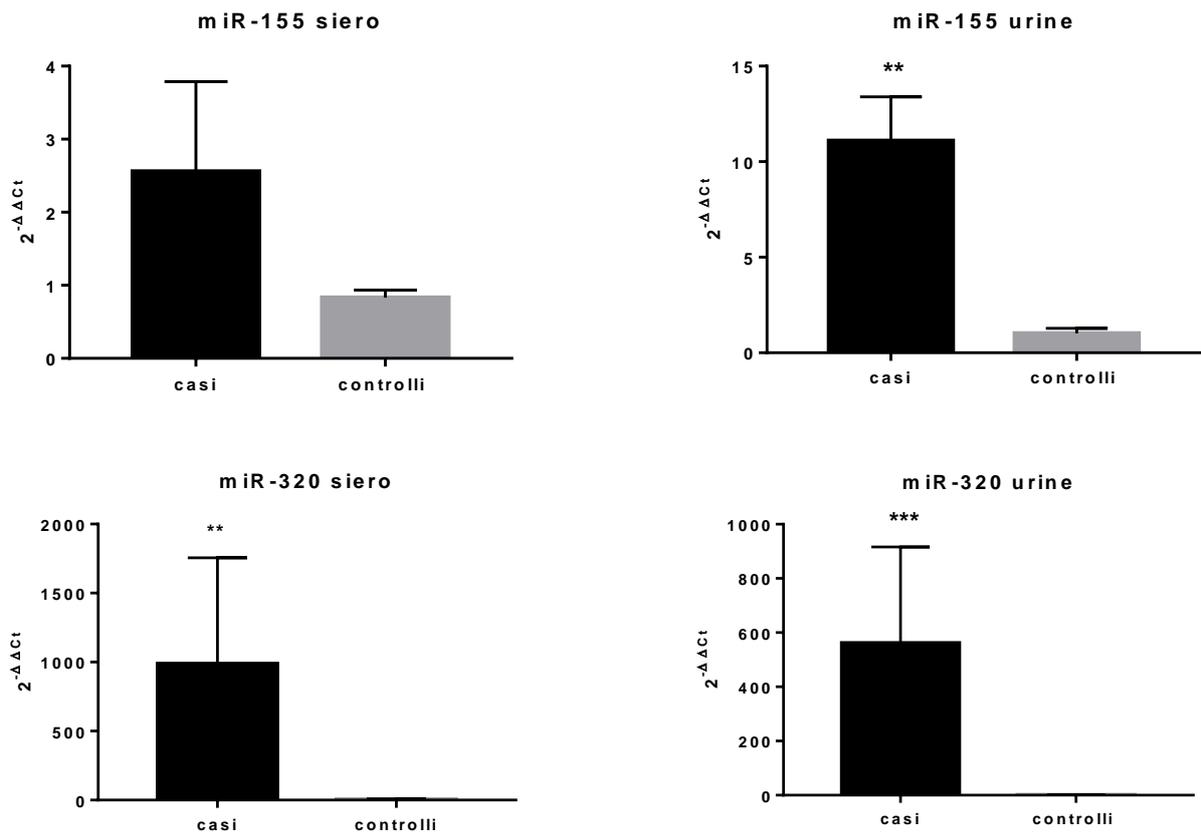
**Figura 41.** Livelli di miR-122 e miR-155 nel terreno di coltura delle cellule di controllo e in quelle esposte ad amanitina per 24 ore.

Una possibile interpretazione di questi risultati è che l'esposizione ad amanitina, dopo 24 ore produca più che una massiva morte cellulare (come emerge anche dal conteggio delle cellule), un danno da infiammazione. Abbiamo anche ipotizzato che i bassi livelli del miR-122 siano legati alla sua minore stabilità. Infatti, come riportato da Aiso e collaboratori, il miR-122 si degrada rapidamente a temperatura ambiente e non è stabile a 4°C (Aiso et al., 2018, **Figura 42**). Questo pone alcune riserve sulla possibile utilizzabilità del miR-122 come biomarcatore in campioni di origine umana come urina e plasma che in contesti clinici possono non essere trasportati e conservati in condizioni ottimali. La condizione perfetta sarebbe di avere la possibilità di stoccare direttamente in -20 o -80 °C i campioni subito dopo il prelievo come è avvenuto nella prima parte dello studio svoltosi nel reparto di Tossicologia Clinica di Edinburgo.



**Figura 42.** Variazione di concentrazione del miR-122 dopo 24h, a 4°C (Aiso et al., 2018)

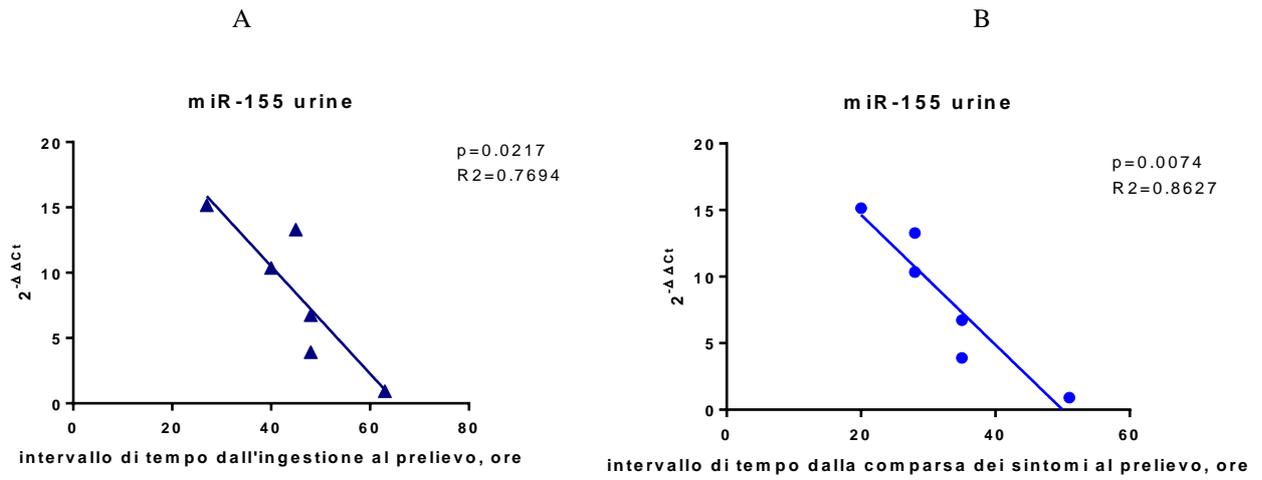
Una prova indiretta di questa ultima ipotesi sta nella mancata rilevabilità del miR-122 in tutti i campioni urinari e sierici raccolti da pazienti intossicati da *Amanita phalloides*, provenienti da Pavia e da Firenze. Nei campioni umani sono stati comunque analizzati tutti gli 11 miRNA selezionati dall'analisi della letteratura. Solo i miR-320 e miR-155 sono risultati espressi nei **pazienti intossicati**: il miR-155 è espresso in tutti i campioni di plasma e di urina mentre il miR-320 è espresso nel siero e in metà dei campioni urinari. Nei **controlli**, il miR-155 è sempre espresso nel plasma e in quasi tutte i campioni urinari, il miR-320 è assente nei campioni urinari e presente in 3 campioni di siero su 7. **Figura 43**



**Figura 43.** *Espressione dei miRNA 155 e 320 in siero e urina di pazienti intossicati da amatossine (casi) e in controllori sani (controlli)*

In considerazione dell'importanza del tempo intercorso dall'ingestione dei funghi contenenti amatossine e lo sviluppo di sintomatologia e le conseguenti modificazioni strutturali d'organo e biochimiche, ci siamo chiesti se i valori dei miRNA espressi potessero variare nel tempo.

Quello che emerge è che i livelli urinari del miR-155 si abbassano all'aumentare del tempo intercorso tra sintomi e prelievo e in generale tra ingestione e prelievo. Questo suggerisce che questo miRNA sia un marcatore di esposizione ad amanitina e/o di danno acuto d'organo che tende poi a ridursi nel corso dell'intossicazione. **Figura 44**



**Figura 44.** Andamento temporale del miR-155 in seguito all'ingestione dei funghi (A) e allo sviluppo dei sintomi (B)

## 9. Discussione

### PRIMA PARTE

Il paracetamolo rappresenta la principale causa di danno epatico indotto da farmaci ed è l'agente eziologico più comune di insufficienza epatica acuta in molti paesi occidentali (William Bernal ET AL., 2013).

L'antidoto, N-acetilcisteina, è ampiamente utilizzato da quasi mezzo secolo con ottimi risultati nei diversi regimi di somministrazione. Tuttavia, il trattamento con tale farmaco non è scevro da effetti collaterali e il suo utilizzo deve essere ponderato in base all'effettiva necessità (Bateman N et al., 2014).

Per valutare il rischio di epatotossicità in seguito al sovradosaggio da paracetamolo e dunque l'effettiva necessità del trattamento antidotale, attualmente sono utilizzati parametri di stima del rischio e marcatori di danno epatico: né l'uno né l'altro, purtroppo, presentano un'oggettività completa in quanto sono subordinati a una anamnesi, non sempre chiara e affidabile, e a marcatori con bassa specificità e sensibilità (Schraml et al. 2017).

Ne consegue, dunque, che vi è una forte esigenza in campo medico di identificare nuovi biomarcatori con migliori caratteristiche e possibilmente predittivi del danno d'organo indotto da paracetamolo.

Tra i vari biomarcatori studiati negli ultimi anni, i microRNA sono molecole individuate recentemente, ma che hanno già mostrato promettenti caratteristiche per un utilizzo in campo diagnostico e terapeutico (Chen X *et al.*, 2008). In questo lavoro, per le sue numerose caratteristiche positive come biomarcatore specifico di danno epatico, è stato appunto indagato il microRNA-122. (Szabo G *et al.*, 2013; Robles-Díaz M *et al.*, 2016).

Alcuni precedenti studi avevano dimostrato che il miR-122, misurato alla presentazione in ospedale di pazienti con sovradosaggio da paracetamolo, sia un marcatore sensibile e predittivo di danno epatico (Starkey LPJ *et al.*, 2011; Antoine DJ *et al.*, 2013) e inoltre che campioni prelevati da sangue capillare tramite puntura di un dito siano sufficienti per quantificare la presenza del miR-122 (Vliegenthart ADB *et al.* 2017).

In questo studio si è voluto indagare se al termine del ciclo antidotale il miR-122 potesse avere un ruolo predittivo di danno epatico evolutivo, paragonabile o migliore rispetto alle transaminasi. Inoltre, si è voluto indagare se il campione di sangue capillare periferico fosse adeguato come mezzo diagnostico per la ricerca del nuovo biomarcatore.

Dai risultati è emerso che il miR-122 può essere quantificato in maniera affidabile in un campione di sangue capillare con una tecnica semplice, poco invasiva ed economica, confermando quanto esposto in precedenza da Vliegenthart ADB et al (2017): ciò pone le basi per lo sviluppo di un test al point-of-care (POCT), ovvero di un'analisi svolta in prossimità del sito di cura del paziente, nel modo più comodo e immediato, permettendo che il personale sanitario e il paziente ricevano i risultati più rapidamente e avendo così l'opportunità di prendere decisioni diagnostiche e terapeutiche con una maggiore immediatezza (Kost G e Gerald J, 2002). Le molecole di RNA sono note per essere altamente instabili, tuttavia studi precedenti avevano indicato che i miRNA sono notevolmente stabili nel plasma / siero (Mitchell PS et al., 2008; Chen X et al., 2008).

Non è stato chiarito se il tempo tra la raccolta e l'elaborazione del sangue influenzi i livelli di miRNA, ma uno studio recente ha raccomandato di separare i campioni di sangue intero nella frazione plasma / siero, in modo tale che in seguito il materiale ottenuto può essere conservato a -80°C senza perdita di qualità per almeno 9 mesi (Glinge C et al., 2017). Da sottolineare che i risultati del nostro studio suggeriscono che un campione di sangue intero può essere conservato a -20°C fino a sei mesi prima dell'analisi, senza inficiare la possibilità di dosaggio dei miRNA.

Lo studio è stato eseguito in pazienti che venivano sottoposti al trattamento con NAC in vigore presso il Royal Infirmary di Edimburgo secondo il protocollo SNAP (Scottish Newcastle Antiemetic Pretreatment), che consiste nel somministrare il NAC in 12 ore per un totale di 300 mg/kg. Al termine del ciclo, il trattamento può essere esteso per ulteriori 10 ore con 200 mg/kg di NAC, qualora vi siano marcatori suggestivi di danno epatico (Thanacoody HK et al., 2013). Il miR-122 è stato dosato prima della fine del trattamento antidotale, alla 10<sup>a</sup> ora (con margine fino alla 12<sup>a</sup> ora, T10), con lo scopo di valutarne il potere predittivo nel decidere se estendere il trattamento o meno.

E' stato notato che i valori di miR-122 a T10 presentano una correlazione lineare con i valori di ALT misurati a 10 (T10) e 20 (T20) ore dall'inizio del trattamento antidotale: nello specifico, il miR-122 a T10 è stato riscontrato più elevato nei pazienti che presentavano elevati valori di ALT a T10 e in particolare nei pazienti che avevano sviluppato un danno epatico clinicamente significativo a T20, suggerendo così un ruolo predittivo del nuovo biomarcatore.

Attualmente, l'epatotossicità può essere esclusa 24-36 ore dopo il sovradosaggio con l'ALT (Dear JW e Antoine DJ 2014). I nostri risultati suggeriscono che il miR-122 capillare può essere usato precocemente per escludere lesioni epatiche.

In precedenza, era stato dimostrato che il miR-122 presentava valori aumentati nel sangue di pazienti con insufficienza epatica da paracetamolo prima dell'elevazione di ALT e che quindi il miR-122 ha una specificità epatica superiore rispetto a ALT (Dear JW et al., 2014).

Il miR-122 può, inoltre, essere utilizzato con sicurezza in pazienti con overdose acuta singola, con sovradosaggio frazionato e con eccesso terapeutico di paracetamolo.

I nostri risultati dovrebbero essere interpretati con cautela a causa della piccola dimensione del campione: solo due pazienti della nostra coorte hanno sviluppato un danno epatico clinicamente significativo. Il primo paziente, un maschio di 30 anni, si è presentato dopo un sovradosaggio di paracetamolo dovuto a eccesso terapeutico ingerito nel corso di due giorni e il miR-122 è stato misurato circa 60 ore dopo la prima dose; il secondo paziente, un maschio di 24 anni, si è presentato dopo un singolo sovradosaggio acuto e il miR-122 è stato misurato circa 18 ore dopo l'assunzione del farmaco.

Inoltre, la variabile di tempo tra sovradosaggio e misura di miR-122 potrebbe essere soggetta a bias da rievocazione, in quanto i pazienti potrebbero aver erroneamente riportato questo intervallo. Peraltro, la validità di questo studio potrebbe essere inficiata da una significativa perdita di follow-up.

Andrebbe infine tenuta in considerazione una limitazione generale degli studi effettuati sul miR-122 nella epatotossicità, il fatto che l'ALT sia il test diagnostico di riferimento: la stessa ALT, infatti, non è mai stata pienamente qualificata rispetto all'istologia e il miR-122 è di conseguenza paragonato all'ALT senza una biopsia tissutale che rifletta il reale grado di danno d'organo (Waring WS, 2012).

Al fine di ottenere una maggiore affidabilità dei risultati, questo studio dovrebbe essere ripetuto in una coorte di pazienti più ampia; inoltre, studi futuri potrebbero valutare l'utilità della misura del miR-122 in punti temporali diversi, dopo il sovradosaggio.

Resterebbe anche da stabilire se il miR-122 capillare abbia un'utilità clinica nell'insufficienza epatica causata da altri xenobiotici.

La principale sfida nello sviluppo del test al point-of-care è che il miR-122 è attualmente quantificato mediante PCR, la quale richiede troppo tempo per essere utilizzata nel processo decisionale clinico in acuto. Tuttavia, sono attualmente in fase di sviluppo promettenti metodi di rilevamento dei miRNA in volumi di campioni minimi e *bed-side* (Corrigan DK et al., 2013; Huang JM et al., 2015).

## SECONDA PARTE

L'avvelenamento da funghi è un'emergenza medico-tossicologica non rara. Il punto cruciale nella gestione risiede nella distinzione precoce tra le intossicazioni a bassa tossicità e quelle potenzialmente letali. Quest'ultime sono dovute alla presenza nei funghi delle amatossine.

Un trattamento tempestivo può scongiurare esiti infausti o la necessità di trapianto epatico, per questo la corretta selezione del paziente da trattare è di primaria importanza. Una diagnosi rapida è essenziale per evitare prolungate e non necessarie ospedalizzazioni.

### Sezione 1

La scelta della matrice biologica (urina o siero) dovrebbe dipendere dal tempo trascorso tra l'ingestione e l'inizio dei primi sintomi. In fasi precoci, secondo i principi di tossicocinetica, le amanitine dovrebbero essere maggiormente rappresentate nel circolo ematico, piuttosto che nelle urine. Dunque, in caso di diagnosi precoce, l'analisi del siero si rivela più accurata e consente un trattamento tempestivo e dunque più appropriato. L'analisi del siero dovrebbe essere considerata di scelta, a causa degli svantaggi del plasma rispetto al siero, come l'interferenza dell'anticoagulante del dosaggio e il rischio di formazione di piccoli coaguli.

L'utilizzo di questa matrice potrebbe giovare anche per quantificare i livelli delle diverse amatossine, permettendo anche di fare una stima precoce del rischio di tossicità, prima ancora che l'epatite cominci ad evidenziarsi con i classici biomarcatori.

In questa parte dello studio è stato sviluppato un metodo UPLC-MS rapido, conveniente e ad alta produttività, che permette l'analisi simultanea di  $\alpha$ -amanitina e beta-amanitina nel siero utilizzando SPE con HLB307 PRIME cartridge. Il metodo è stato completamente convalidato, inclusa la misurazione dell'incertezza.

Rispetto ai metodi ELISA, che sono i più comunemente usati per scopi clinici, questo metodo fornisce un'identificazione univoca delle amanitine. Questo è il primo metodo che utilizza UPLC-MS per la determinazione routinaria clinico-tossicologica di emergenza di  $\alpha$  e beta-amanitine nel siero di umani.

Può essere utilizzato per confermare le identificazioni positive fatte con metodo ELISA, in modo che la presenza di amanitine possa essere confermata senza risultati falsi positivi o negativi. Prossimamente l'obiettivo è quello di riuscire a quantificare le diverse amatossine e correlarle con il grado di tossicità.

In particolare dobbiamo sottolineare che l'analisi della beta-amanitina ematica ha mostrato un risultato interessante. Questa amatossina è stata rilevata a valori elevati nei due pazienti che hanno avuto maggiore

tossicità epatica e in un paziente presentava valori addirittura più alti rispetto a quelli dell' $\alpha$ -amanitina. La amatossina era presente anche in paziente che non presentavano danno epatico, tuttavia in questi i valori erano comunque molto bassi e mai superiori a quelli dell' $\alpha$ -amanitina.

Quindi, al momento, potremmo suggerire un possibile ruolo della beta-amanitina nell'avvelenamento grave. Inoltre, nessuna correlazione tra  $\alpha$ -e beta-amanitina sembra essere presente.

## Sezione 2

L'espressione dei miRNAs è stata valutata in numerosi tipi di intossicazione (Sharmil E et al., 2017). Ad oggi non vi sono studi in merito nell'intossicazioni da funghi contenenti amatossine.

Lo studio in vitro utilizzando cellule HepG2 ha mostrato come queste cellule siano influenzate dall' $\alpha$ -amanitina, suggerendo che fino a 48 ore le cellule vanno in arresto ma sono ancora vitali, quindi possono teoricamente recuperare vitalità. Ciò è in linea con il fatto che una presentazione tardiva dopo l'ingestione di funghi è un fattore predittivo negativo nei pazienti umani.

Inoltre, in questa coltura è stata valutata l'espressione di miR-122 e miR-155. I livelli di miR-122 sono ridotti nel fegato di pazienti con malattia epatica alcolica (ALD) e nei topi con danno epatico indotto da alcol; miR-155 è sovraespresso in varie condizioni patologiche del fegato. È stato suggerito che il miRNA-122 può essere utile come marker di danno epatico e il miR-155 come marker di infiammazione e che la determinazione di entrambi può consentire la discriminazione tra i due tipi di danno epatico. Tuttavia fattore confondente nel campione in studio è la conservazione del campione, considerando che alcuni autori hanno suggerito che il miR-122 non si conservi correttamente se mantenuto a temperatura ambiente per un tempo variabile, ovvero se non immediatamente congelato (Aiso et al., 2018).

L'intossicazione da funghi a lunga incubazione è un evento stagionale ma comunque comune se consideriamo il punto di vista di un centro antiveneni nazionale; su piccola scala però i campioni biologici di pazienti avvelenati potrebbero scarseggiare. Pertanto in questo studio i campioni sono stati raccolti sul territorio nazionale del centro e nord Italia in regioni geograficamente vicine al Centro Antiveneni di Pavia e al Laboratorio di Tossicologia Clinica dell'AOU Careggi, dove i campioni hanno potuto essere stoccati in freezer alla corretta temperatura di conservazione -20 o -80 °C. Tuttavia va considerato come la variabilità di presentazione dei pazienti, in merito ad orario, e la variabilità delle strutture ospedaliere di afferenza abbia potuto generare un *bias* nella raccolta e conservazione iniziale dei campioni.

La condizione sperimentale ottimale si potrebbe ottenere selezionando i pazienti afferenti ad un singolo centro dove i campioni possano essere subito conservati alla corretta temperatura, come è avvenuto per la

parte prima di questo lavoro presso la Tossicologia Clinica di Edinburgo. In questo caso l'inconveniente sarebbe che necessiteremmo di molti anni per selezionare un numero di pazienti significativo.

Per quanto riguarda lo studio sui campioni umani, solo i miR-320 e miR-155 sono risultati espressi nei pazienti intossicati.

In particolare è emerso che i livelli urinari del miR-155 si abbassano all'aumentare del tempo intercorso tra sintomi e prelievo e in generale tra ingestione e prelievo. Questo suggerisce che questo miRNA sia un marcatore di esposizione ad amanitina e/o di danno acuto d'organo che tende poi a ridursi nel corso dell'intossicazione

Va considerato che ci siamo dovuti limitare ad analizzare un gruppo ristretto di miRNA seppur ben descritti in letteratura come associati a danno epatico di varia origine, ma con il rischio di non includere potenziali nuovi miRNA marcatori più specifici di epatotossicità indotta da funghi contenenti amatossine. Un futuro studio del miRNOMA potrebbe forse far emergere nuovi miRNA da tenere in considerazione in questa intossicazione.

## 10. Conclusioni

Questo lavoro supporta l'uso del miR-122, misurato anche solo in una goccia di sangue ottenuta mediante puntura del dito, per predire un possibile danno epatico nel sovradosaggio da paracetamolo.

Nel danno epatico indotto da Funghi, invece, sembra che un ruolo diagnostico lo possano avere il miR-155 e, in particolar modo il miR-320.

Inoltre, nell'intossicazione da  $\alpha$ -amanitina, l'utilizzo della diagnostica su siero potrebbe essere utile non solo per la conferma laboratoristica, ma anche per la stima del rischio di progressione verso quadri clinici gravi.

Questi risultati aprono la strada a un trattamento più individualizzato e mirato per queste intossicazioni e potrebbero permettere una migliore gestione clinica del paziente, con riduzione della durata del ricovero e di conseguenza della spesa sanitaria, diminuzione dell'incidenza di effetti avversi legati alla terapia antidotale e principalmente potrebbero limitare i rischi di complicazioni gravi a carico del paziente.





## Bibliografia

- Acharya M.L., Lau-Cam C.A., Simple reversed-phase HPLC method with spectrophotometric detection for measuring acetaminophen-protein adducts in rat liver samples, *Scientific World Journal* (2012); 2012:145651
- Adeneye A.A., Olagunju J.A., Benebo A.S., Elias S.O., Adisa A.O., Idowu B.O., Oyedeji M.O., Isioye E.O., Braimoh O.B., Oladejo O.O., Alana E.O., Nephroprotective effects of the aqueous root extract of *Harungana madagascariensis* (L). In acute and repeated dose acetaminophen renal injured rats, *Int J Appl Res Nat Prod* (2008); 1: 6-14.
- Alleva FR. Thiocetic acid and mushroom poisoning. *Science* 1975; 187: 216
- Andersson, P., Gidlöf, O., Braun, O. Ö., Götberg, M., van der Pals, J., Olde, B., & Erlinge, D. (2012). Plasma Levels of Liver-Specific miR-122 Is Massively Increased in a Porcine Cardiogenic Shock Model and Attenuated by Hypothermia. *Shock*, 37(2). <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31823f1811>
- Antoine D. J., Dear, J. W., Lewis, P. S., Platt, V., Coyle, J., Masson, M., Thanacoody, R. H., Gray, A. J., Webb, D. J., Moggs, J. G., Bateman, D. N., Goldring, C. E., & Park, B. K. (2013). Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*, 58(2), 777–787. <https://doi.org/10.1002/hep.26294>
- Antoine D.J., Jenkins R.E., Dear J.W., Williams D.P., McGill M.R., Sharpe M.R., Craig D.G., Simpson K.J., Jaeschke H., Park B.K., Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity, *J Hepatol* (2012); 56: 1070–1079.
- Antoine D.J., Sabbisetti V.S., Francis B., Jorgensen A.L., Craig D.G., Simpson K.J., Bonventre J.V., Park B.K., Dear J.W., Circulating kidney injury molecule-1 predicts prognosis and poor outcome in patients with acetaminophen-induced liver injury, *Hepatology* (2015); doi: 10.1002/hep.27857.
- Bala S.L., Petrasek J., Mundkur S., Catalano D., Levin I., Ward J., Alao H., Kodys K., Szabo G., Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases, *Hepatology* (2012); 56(5): 1946-1957.
- Balasubramanyam, M., Aravind, S., Gokulakrishnan, K., Prabu, P., Sathishkumar, C., Ranjani, H., & Mohan, V. (2011). Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0727-3>
- Baskerville S. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11(3). <https://doi.org/10.1261/rna.7240905>
- Bateman D.N., Paracetamol poisoning: beyond the nomogram, *Br J Clin Pharmacol* (2015); 80: 45–50.
- Bateman N.D., Carroll R., Pettie J., Yamamoto T., Elamin M.E., Lucy Peart L., Dow M., Judy Coyle J., Cranfield K.R., Hook C., Sandilands E.A., Veiraiah A., Webb D., Gray A., Dargan P.I., Wood D.W., Thomas S.H.L., Dear J.W.,

- and Eddleston M., Effect of the UK's revised paracetamol poisoning management guidelines on admissions, adverse reactions and costs of treatment, *Br J Clin Pharmacol* (2014); 78(3): 610–618.
- Becker CE, Tong TG, Boerner U, Roe RL, Scott AT, MacQuarrie MB, Bartter F. Diagnosis and treatment of Amanita phalloides-type mushroom poisoning: use of thiocetic acid. *West J Med* 1976 Aug; 125(2): 100-109
- Beer C., Pakravan N., Hudson M., Smith L.T., Simpson K., Bateman D.N., Thomas S.H., Liver unit admission following paracetamol overdose with concentrations below current UK treatment thresholds, *QJM-Mon J Assoc Phys* (2007); 100: 93–96.
- Bhattacharyya S.N., Habermacher R., Martine U., Closs E.I., Filipowicz W., Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress, *Cell* (2006); 125: 1111–1124.
- Bianchi M.E., Beltrame M., Paonessa G., Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1, *Science* (1989); 243: 1056-1059.
- Bitiren M., Musa D., Ozgonul A., Ozaslan M., Kocyigit A., Protective effects of Green tea (*Camelia Sinensis*), *Hypericum perforatum*, and *Urtica dioica*, on hepatic injury and lymphocytes DNA damage induced by carbon tetrachloride, *Winstar Rats. Int J Pharm* (2010); 6: 241-248.
- Boyer T.D., Rouff S.L., Acetaminophen-induced hepatic necrosis and renal failure, *JAMA* (1971); 218: 440-441.
- Bozza Marrubini M, Ghezzi-Laurenzi R, Uccelli P. Intossicazioni acute: meccanismi, diagnosi e terapia (2a ed, ristampa riveduta e aggiornata). OEMF Organizzazione Editoriale Medico Farmaceutica, Milano, 1989; 13: pp. 1010-1025
- Bresinsky A, Besl H. A Colour Atlas of Poisonous Fungi. Wolfe Publishing Ltd, Stuttgart Germany, 1990; p. 295
- Broussard CN, Aggarwal A, Lacey SR, Post AB, Gramlich T, Henderson JM, Younossi ZM. Mushroom poisoning – from diarrhea to liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2001 Nov; 96(11): 3195-3198
- Bühlmann Laboratories. Amanitin-ELISA, instruction manual. Bühlmann Laboratories, Allschwil (Switzerland), September 2001
- Bunchorntavakul C., Reddy K.R., Acetaminophen-related hepatotoxicity, *Clin Liver Dis* (2013); 17: 587–607.
- Busi C, Fiume L, Costantino D, Borroni M, Ambrosino G, Olivotto A, Bernardini D. The determination of amanitines in the serum of patients poisoned by amanita phalloides. *Nouv Presse Med* 1977 Oct 1; 6(32): 2855-2857
- Busi C, Fiume L, Costantino D, Langer M, Vesconi F. Amanita toxins in gastro-duodenal fluid of patients poisoned by the mushroom Amanita phalloides. *N Engl J Med* 1979 Apr 5; 300(14): 800
- Butera R, Locatelli C, Maccarini D, Candura SM, Manzo L. Emploi de la N-acetylcystéine dans l'intoxication par Amanita phalloides: résultats cliniques. XXXIème Congrès de la Société de Toxicologie Clinique, Nancy (France), 16-17 septembre 1993 ; p. 29
- Campion S., Aubrecht J., Boekelheide K., Brewster D.W., Vaidya V.S, Anderson L., Burt D., Dere E., Hwang K., Pacheco S., Saikumar J., Schomaker S., Sigman M., Goodsaid F., The current status of biomarkers for predicting toxicity, *Expert Opin DrugMetab Toxicol* (2013); 9: 1391–1408.

- Caparrotta T.M., Antoine D.J., Dear J.W., Are some people at increased risk of paracetamol-induced liver injury? A critical review of the literature, *Eur J Clin Pharmacol* (2018); 74: 147–160.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Castell, J. v, & Castell, M. (n.d.). *Allergic hepatitis induced by drugs*. <http://journals.lww.com/co-allergy>
- Cessi C, Fiume L. Increased toxicity of beta-amanitin when bound to a protein. *Toxicon* 1969 May; 6(4): 309-310
- Chambon P, Gissinger F, Kedinger C, Mandel JL, Meilhac M, Nuret P. Structural and functional properties of three mammalian nuclear DNA-dependent RNA polymerases. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1972; 168: 222-246
- Chekulaeva, M., & Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.009>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10). <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051). <https://doi.org/10.1038/nature03868>
- Chung WC, Tso SC, Sze ST, Separation of polar mushroom toxins by 400 mixed-mode hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* (2007). <https://doi.org/10.1093/chromsci/45.2.104>.
- Conaco, C., Otto, S., Han, J.-J., & Mandel, G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.0511041103>
- Costantino D, Fiume L, Busi C, Brega A, Gavazzeni V, Iapichino G, Langer M, Vesconi S, Rivolta E. Contributo allo studio della Cinetica della Amanitina nell'uomo. *Anestesia Rianimazione* 1977, 18:267--274
- Court M.H., Peter I., Hazarika S., Candidate gene polymorphisms in patients with acetaminophen-induced acute liver failure, *Drug Metab Dispos* (2014); 42: 28–32.
- Craig D.G., Bates C.M., Davidson J.S., Martin K.G., Hayes P.C., Simpson K.J., Staggered overdose pattern and delay to hospital presentation are associated with adverse outcomes following paracetamol-induced hepatotoxicity, *Br J Clin Pharmacol* (2012); 73: 285–294.
- Crevani M, Tesi di laurea in Medicina e Chirurgia. "L'avvelenamento da funghi: studio retrospettivo sulla casistica afferente ad un Centro Antiveneni nazionale " 2015
- Daly F.F., Fountain J.S., Murray L., Graudins A., Buckley N.B., Guidelines for the management of paracetamol poisoning in Australia and New Zeland- A consensus statement from clinical toxicologists consulting to the Australasian poisons information centres, *MJA* (2008); 188 (5): 296-301.

- Davidson D.G., Eastham W.N., Acute liver necrosis following overdose of paracetamol, *Br Med J* (1966); 2: 497-499.
- Deakin C.D., Gove C.D., Fagan E.A., Tredger J.M., Williams R., Delayed calcium channel blockade with diltiazem reduces paracetamol hepatotoxicity in mice, *Hum Exp Toxicol* (1991); 10: 119-123.
- Dear J.W., Clarke J., Risk stratification after paracetamol overdose using mechanistic biomarkers: results from two prospective cohort studies, *Lancet Gastroenterol Hepatol* (2018); 3: 104-113.
- Delaney A. K. (2011). *Goldfrank's Toxicologic Emergencies 9th Ed* (S. L. Nelson, A. N. Lewin, M. A. Howland, S. R. Hoffman, R. L. Goldfrank, & E. N. Flomenbaum, Eds.; 9th ed., pp. 367–380). Mc Graw Hill - Medical.
- Derenzini M, Fiume L, Marinozzi V, Mattioli A, Montanaro L, Sperti S. Pathogenesis of liver necrosis produced by amanitin-albumin conjugates. *Lab Invest* 1973 Aug; 29(2): 150-158
- Doxakis E. (2010). Post-transcriptional Regulation of  $\alpha$ -Synuclein Expression by mir-7 and mir-153. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086827>
- El-Bahay C, Gerber E, Horbach M, Tran-Thi QH, Röhrdanz E, Kahl R. Influence of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Silibin on the Cytotoxic Action of  $\alpha$ -Amanitin in Rat Hepatocyte Culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999 Aug 1;158(3):253-260
- Elizabeth M., Lancaster J., Hiatt R., Zarrinpar A., Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review, *Arch Toxicol* (2015); 89: 193–199.
- Ellison, S.L.R. and Williams, A. (Eds). *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30- 3. Available from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)."
- Emeka E.J.I., Atinuke O.O., Biochemical, haematological and histological effects of dietary supplementation with leaves of *Gnetum africanum* Welw. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats, *Int J Pharm* (2010); 6: 872-879.
- Enjalbert F, Cassanas G, Salhi SL, Guinchard C, Chaumont JP. Distribution of the amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides*. Influence of the tissues and the collection site. *C R Acad Sci III* 1999 Oct; 322(10): 855-862
- Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H. Toxin content, phalloxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon* 1993 Jun; 31(6): 803-807
- Enjalbert F, Rapior S, Nouguié-Soule J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002; 40: 715-757.
- Esau C., Davis S., Murray S.F., Yu X.X., Pandey S.K., Pear M., Watts L., Booten S.L., Graham M., McKay R., Subramaniam A., Propp S., Lollo B.A., Freier S., Bennett C.F., Bhanot S., Monia B.P., MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting, *Cell Metab* (2006); 3: 87–98.
- Fang J., Hsu B.Y., MacMullen C.M., Poncz M., Smith T.J., Stanley C.A., Expression, purification and characterization of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations, *Biochem J* (2002); 363: 81–87.

- Faulstich H, Fauser U. Untersuchungen zur Frage de Hämodialyse bei der Knollenblätterpilzvergiftung. Detsch Med Wschr 1973; 98: 1133-1138
- Faulstich H, Talas A, Wellhoner HH. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. Arch Toxicol 1985 Jan; 56(3): 190-194
- Faulstich H. New aspects of amanita poisoning. Klin Wochenschr 1979 Nov 2; 57(21): 1143-1152
- Faulstich H. Structure of poisonous components of Amanita phalloides. Curr Probl Clin Biochem 1977; 7: 1-10
- Filigenzi MS, Poppenga RH, Tiwary AK et al. Determination of  $\alpha$ -388 amanitin in serum and liver by multistage linear ion trap mass spectrometry, J. Agric. Food Chem. (2007). <https://doi.org/10.1021/jf063194w>.
- Fischereder M., Jaffe J.P., Thrombocytopenia following acute acetaminophen overdose, Am J Hematol (1994); 45: 258-259.
- Fiume L, Busi C, Campadelli-Fiume G, Franceschi C. Production of antibodies to amanitins as the basis for their radioimmunoassay. Experientia 1975 Oct 15; 31(10): 1233-1234
- Fiume L, Marinozzi V, Nardi F. The effects of amanitin poisoning on mouse kidney. Br J Exp Pathol 1969 Jun; 50(3): 270-276
- Floersheim GL, Schneeberg J, Bucher K. Curative potencies of penicillin in experimental Amanita phalloides poisoning. Agents Actions 1971 Nov; 2(3): 138-141
- Floersheim GL. Antagonistic effects of phalloidin  $\square$ -Amanitin and extracts of Amanita phalloides. Agents Actions 1971 Nov; 2(3): 142-149
- Floersheim GL. Treatment of human amatoxin mushroom poisoning: myths and advances in therapy. Med Toxicol 1987 Jan-Feb; 2(1): 1-9
- Ganey P.E., Luyendyk J.P., Newport S.W., Eagle T.M., Maddox J.F., Role of the coagulation system in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, Hepatology (2007); 46: 1177-1186.
- Gaughwin, P. M., Ciesla, M., Lahiri, N., Tabrizi, S. J., Brundin, P., & Björkqvist, M. (2011). Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 20(11). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr111>
- Giannini L, Vannacci A, Missanelli A, Mastroianni R, Mannaioni PF, Moroni F, Masini E. Amatoxin poisoning: a 15-year retrospective analysis and follow-up evaluation of 105 patients. Clin Toxicol (Phila) 2007 Jun-Aug; 45(5): 539-542
- Giboney P.T., Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient, Am Fam Physician (2005); 71(6): 1105–1110.
- Goldfrank LR. Mushrooms: Toxic and Hallucinogenic. In: Goldfrank LR, Flomenbraum NE, Hoffman RS, Howland MA, Lewin NA, Nelson LS (eds). Goldfrank's Toxicologic Emergencies (8th ed). McGraw-Hill, 2006, pp. 1564-1576

- Gonmori K, Minakata K, Suzuki M, Yamagishi I, H. Nozawa, K. Hasegawa, A. Wurita, K. Watanabe, O. Suzuki, MALDI-TOF mass spectrometric analysis of  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin, and phalloidin in urine, *Forensic Toxicol.* (2012). <https://doi.org/10.1007/s11419-012-0145-6>.
- Gujral J.S., Knight T.R., Farhood A., Bajt M.L., Jaeschke H., Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis?, *Toxicol Sci* (2002); 67: 322-328.
- Gunawan, B. K., & Kaplowitz, N. (2007). Mechanisms of Drug-Induced Liver Disease. In *Clinics in Liver Disease* (Vol. 11, Issue 3, pp. 459–475). <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.06.001>
- Gunnell D., Reporting suicide: the effect of media coverage on patterns of self-harm, *Br Med J* (1994); 308: 1446.
- Hans Persson Mushrooms BOTANICAL AND ANIMAL POISONS 2016, 44 (2), 116-119
- Hawton K., Simkin S., Deeks J.J., O'Connor S., Keen A., Altman D.G., Philo G., Bulstrode C., Effects of a drug overdose in a television drama on presentations to hospital for self-poisoning: time series and questionnaire study, *Br Med J* (1999); 318 (7189): 972–977.
- Helfer AG, Meyer MR, Michely JA, et al. Direct analysis of the mushroom poisons  $\alpha$ - and  $\beta$ -amanitin in human urine using a novel on-line turbulent flow chromatography mode coupled to liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* (2014).
- Hendrickson R.G., Bizovi K.E., Acetaminophen, in Flomenbaum N.E., Goldfrank L.R., Hoffman R.S., Howland M.A., Lewin N.A., Nelson L.S., Goldfrank's Toxicologic Emergencies 8th Edition, Copyright ©2006 McGraw-Hill.
- Horton A.A., Wood J.M., Effects of inhibitors of phospholipase A2, cyclooxygenase and thromboxane synthetase on paracetamol hepatotoxicity in the rat, *Eicosanoids* (1989); 2: 123-129.
- Hwang J.H., Kim Y.H., Noh J.R., The protective role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 on acetaminophen-induced liver injury is associated with prevention of adenosine triphosphate depletion and improvement of mitochondrial dysfunction, *Arch Toxicol.* (2015); 89(11): 2159-2166.
- Isbister G.K., Bucens I.K., Whyte I.M., Paracetamol overdose in a preterm neonate, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (2001); 85: F70-F72.
- Jaeger A, Jehl F, Flesch F, Sauder P, Kopferschmitt J. Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *J Toxicol Clin Toxicol* 1993; 31(1): 63-80
- Jaeschke H., Williams C.D., Ramachandran A., Bajt M.L., Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity, *Liver Int* (2012), 32: 8–20.
- Juma K.K., David M.N., Joseph J.N.N., A Review of the Biochemical, Hematological and Histological Modulations in Acetaminophen Induced Hepatotoxicity and the Potential of *Urtica Dioica* in the Regeneration of the Liver, *J Drug Metab Toxicol* (2015); 6: 182.
- Junn E., Lee K.W., Jeong B.S., Chan T.W., Im J.Y., Mouradian M.M., Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009); 106(31): 13052-13057.

- Junn, E., Lee, K.-W., Jeong, B. S., Chan, T. W., Im, J.-Y., & Mouradian, M. M. (2009). Repression of  $\alpha$ -synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31). <https://doi.org/10.1073/pnas.0906277106>
- Kedinger C, Gniazdowski M, Mandel JL Jr, Gissinger F, Chambon P. Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. *Biochem Biophys Res Commun* 1970 Jan 6; 38(1): 165-171
- Kennon J., Heard M.D., Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning, *N Engl J Med* (2008); 359: 285-292.
- Kerr F., Dawson A., Whyte I.M., The Australasian Clinical Toxicology Investigators Collaboration randomized trial of different loading infusion rates of N-acetylcysteine, *Ann Emerg Med* (2005); 45: 402–408.
- Klan J. A review of mushrooms containing amanitins and phalloidines. *Cas Lek Cesk* 1993 Aug 5; 132(15): 449-451
- Klein AS, Hart J, Brems JJ, Goldstein L, Lewin K, Busuttill RW. Amanita poisoning: treatment and the role of liver transplantation. *Am J Med* 1989 Feb; 86(2): 187-193
- Koutedakis Y., Raafat A., Sharp N.C.C., Rosmarin M.N., Beard M.J., Robbins S.W., Serum enzyme activities in individuals with different levels of physical fitness, *J Sports Med Phys Fitness* (1993); 33: 252-257.
- Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M. B., Ribí, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H. J., Schübeler, D., Oertner, T. G., Schratt, G., Bibel, M., Roska, B., & Filipowicz, W. (2010). Characterizing Light-Regulated Retinal MicroRNAs Reveals Rapid Turnover as a Common Property of Neuronal MicroRNAs. *Cell*, 141(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.039>
- Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K.G., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M., Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs', *Nature* (2005); 438: 685–689.
- Krysko D.V., Agostinis P., Krysko O., Garg A.D., Bachert C., Lambrecht B.N., Vandenabeele P., Emerging role of damage associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation, *Trends Immunol* (2011); 32: 157–164.
- Ku N.O., Zhou X., Toivola D.M., Omary M.B., The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease, *Am J Physiol* (1999); 277: G1108–G1137.
- Landon E.J., Naukam R.J., Rama Sastry B.V., Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents, *Biochem Pharmacol* (1986); 35: 697-705.
- Lederman S., Fysh W.J., Tredger M., Gamsu H.R., Neonatal paracetamol poisoning: treatment by exchange transfusion, *Arch Dis Child* (1983); 58: 631-633.
- Lee K.K., Imaizumi N., Chamberland S.R., Targeting mitochondria with methylene blue protects mice against acetaminophen-induced liver injury, *Hepatology* (2015); 61(1): 326-336.
- Lee, W. M. (2003). medical progress Drug-Induced Hepatotoxicity. In *N Engl J Med* (Vol. 349). [www.nejm.org](http://www.nejm.org)

- Leist M, Gantner F, Naumann H, Bluethmann H, Vogt K, Brigelius-Flohé R, Nicotera P, Volk HD, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. *Gastroenterology*. 1997 Mar; 112(3): 923-934
- Lemini C., Jaimez R., Franco Y., Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice, *Thromb Res* (2007); 120: 415-419.
- Letscher K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci* 2006 May;91(1):140-149. Epub 2006 Feb 22
- Liang Y., Ridzon D., Wong L., Chen C., Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues, *BMC Genomics* (2007); 8: 166.
- Lindell TJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG, Rutter WJ. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science* 1970 Oct 23;170(3956):447-449
- Lindow, M., & Kauppinen, S. (2012). Discovering the first microRNA-targeted drug. *Journal of Cell Biology*, 199(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.201208082>
- Liu, J. (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science*, 305(5689). <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Locatelli C, Butera R, Petrolini V, Manzo L. Gastroenterite da funghi: quale fungo? *Decidere in Medicina* 2001; 1 (2): 37-46
- Locatelli C, Butera R, Varango C, Petrolini V, Gandini C, Manzo L. N-acetilcisteina in tossicologia clinica: terapia protratta nelle intossicazioni da *Amanita phalloides* e da idrocarburi clorurati. Atti del II Congresso Nazionale della Federazione Italiana di Medicina d'Urgenza e Pronto Soccorso, Napoli, 8-11 novembre 1995, pp. 1491-1497
- Locatelli C, Maccarini D, Travaglia A, Manzo L. Prolonged high dose N-acetylcysteine treatment of *Amanita phalloides* and chlorinated hydrocarbon poisoning. *Pharmacol Res* 1992; 26: 201
- Lynen F, Wieland U. Ueber die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. *Justus Liebigs Ann Chem*;1937. IV 533, 93-117
- McGill M.R., Sharpe M.R., Williams C.D., Taha M., Curry S.C., Jaeschke H., The mechanism underlying acetaminophen induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation, *J Clin Invest* (2012); 122: 1574–1583.
- Michaut A., Moreau C., Robin M.A., Fromenty B., Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease, *Liver Int* (2014); 34: e171–e179.
- Miller L.F., Rumack B.H., Clinical safety of high oral doses of acetylcysteine. *Semin Oncol, Suppl* (1983); 10:76–85.
- Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proc Natl Acad Sci USA* (2008); 105: 10513–10518.
- Monte S., Lyons G., In vitro evidence of gender-related heparin resistance, *Int J Obstet Anesth* (2004); 13: 91-94.

- Mullins EM, Horowitz BZ. The futility of hemoperfusion and hemodialysis in *Amanita phalloides* poisoning. *Vet Hum Toxicol* 2000 Apr; 42(2): 90-91
- Mydlik M, Mizla P, Derzsiova K, Beno P, Matheova E. Extracorporeal treatment of acute renal failure (ARF) and acute poisoning (AP) in children and adolescents. 27 year experiences. XXXth Congress of EDTA, Vienna, Austria, 1994, p. 82
- Myers R.P., Shaheen A.A., Li B., Impact of liver disease, alcohol abuse, and unintentional ingestions on the outcomes of acetaminophen overdose, *Clin Gastroenterol Hepatol* (2008); 6: 918–25; quiz 837.
- Naguib Y.M.L., Azmy R.M., Samaka R.M., Salem M.F., Pleurotus ostreatus opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen-induced hepato-renal injury, *BMC Complement Altern Med* (2014) D; 14: 494, doi: 10.1186/1472-6882-14-494.
- Nomura M, Suzuki Y, Kaneko R, T. Ogawa, H. Hattori, H. Seno, A. Ishii. Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS, *Forensic Toxicol.* (2012). <https://doi.org/10.1007/s11419-012-0146-5>.
- O'Carroll, D., & Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 38, Issue 1, pp. 39–54). <https://doi.org/10.1038/npp.2012.87>
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. v., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043). <https://doi.org/10.1038/nature03677>
- Olivieri, F., Rippo, M. R., Procopio, A. D., & Fazioli, F. (2013). Circulating inflamma-miRs in aging and age-related diseases. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00121>
- Omary M.B., Ku N.O., Tao G.Z., Toivola D.M., Liao J., 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights, *Trends Biochem Sci* (2006); 31: 383–394.
- Oyedeji K.O., Bolarinwa A.F., Adabanjia R.B., Evaluation of haematological and reproductive effect of paracetamol (acetaminophen) in Female Albino Rats, *IOSR J Dent Med Sci* (2013); 3: 72-75.
- Payasi A., Chaudhary M., Singh B.M., Gupta A., Sehgal R., SubAcute Toxicity Studies of Paracetamol Infusion in Albino Wista Rats, *Intern J Pharm Sci Drug Res* (2010); 2: 142-145.
- Petrov P, Sekeris C E. Early action of  $\alpha$ -Amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins, as revealed by electron microscopic observation. *Exp Cell Res* 1971 Dec;69(2):393-401
- Piperno E, Berssenbruegge DA.Reversal of experimental paracetamol toxicosis with N-acetylcysteine. *Lancet* 1976 Oct 2;2(7988):738-739
- Piqueras J. Hepatotoxic mushroom poisoning: diagnosis and management.*Mycopathologia* 1989 Feb; 105(2): 99-110
- Possamai L.A., McPhail M.J., Khamri W., The role of intestinal microbiota in murine models of acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Liver Int.* (2015); 35: 764-73.
- Possamai L.A., McPhail M.J., Quaglia A., Character and temporal evolution of apoptosis in acetaminophen-induced acute liver failure, *Crit Care Med* (2013); 41: 2543–2550.

- Prescott L.F., Illingworth R.N., Critchley J.A., Stewart M.J., Adam R.D., Proudfoot A.T., Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine, *Lancet* (1977); 2: 432–434.
- Pugh, A. J., Barve, A. J., Falkner, K., Patel, M., & McClain, C. J. (2009). Drug-Induced Hepatotoxicity or Drug-Induced Liver Injury. In *Clinics in Liver Disease* (Vol. 13, Issue 2, pp. 277–294). <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.02.008>
- R. Butera, C. Locatelli, T. Coccini, L. Manzo, Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: A pilot study, *J. Toxicol. - Clin. Toxicol.* (2004). <https://doi.org/10.1081/CLT-200035472>.
- R. Butera, C. Locatelli, T. Coccini, V. Petrolini, D. Lonati, A. Giampreti, L. Manzo, Urinary amanitin analysis in mushroom poisoning, *Eur. J. Emerg. Med.* (2006). <https://doi.org/10.1097/00063110-200610000-00060>.
- Resina A, Fedi S, Lippi G, Blandina P, Fantozzi R, Masini E, Mannaioni P, Dono A. Disordini dell'emostasi in corso da avvelenamento da *Amanita phalloides*. *Eur Rev Med Pharm Sci* 1984; 4: 603-608
- Robles-Díaz M., Medina-Caliz I., Stephens C., Andrade R.J., Isabel M.L., Biomarkers, in *DILI: One More Step Forward* *Frontiers in Pharmacology* (2016); 7: 267.
- Roeder RG, Rutter WJ. Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970 Mar; 65(3): 675-682
- Rosbach, M. (2010). Small Non-Coding RNAs as Novel Therapeutics. *Current Molecular Medicine*, 10(4). <https://doi.org/10.2174/156652410791317048>
- Ruike, Y., Ichimura, A., Tsuchiya, S., Shimizu, K., Kunimoto, R., Okuno, Y., & Tsujimoto, G. (2008). Global correlation analysis for micro-RNA and mRNA expression profiles in human cell lines. *Journal of Human Genetics*, 53(6). <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0279-x>
- Rumack B.H., Bateman D.N., Acetaminophen and acetylcysteine dose and duration: past, present and future, *Clin Toxicol* (2012); 50: 91–98.
- Rumack B.H., Matthew H., Acetaminophen poisoning and toxicity, *Pediatrics* (1975); 55(6): 871-876.
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3). <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Sabbisetti V.S., Waikar S.S., Antoine D.J., Smiles A., Wang C., Ravisankar A., Ito K., Sharma S., Ramadesikan S., Lee M., Briskin R., De Jager P.L., Ngo T.T., Radlinski M., Dear J.W., Park K.B., Betensky R., Krolewski A.S., Bonventre J.V., Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes, *J Am Soc Nephrol* (2014); 25: 2177–2186.
- Sassen, S., Miska, E. A., & Caldas, C. (2008). MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Archiv*, 452(1). <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0532-2>
- Sayed, A. S. M., Xia, K., Salma, U., Yang, T., & Peng, J. (2014). Diagnosis, Prognosis and Therapeutic Role of Circulating miRNAs in Cardiovascular Diseases. *Heart, Lung and Circulation*, 23(6). <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.01.001>

- Schipper, H. M., Maes, O. C., Chertkow, H. M., & Wang, E. (2007). MicroRNA Expression in Alzheimer Blood Mononuclear Cells. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1. <https://doi.org/10.4137/GRSB.S361>
- Schraml E, Hackl M, Grillari J. MicroRNAs and toxicology: A love marriage. *Toxicology Reports* 4 (2017) 634–636635.
- Schutte B., Henfling M., Kolgen W., Bouman M., Meex S., Leers M.P., Nap M., Bjorklund V., Bjorklund P., Bjorklund B., Lane E.B., Omary M.B., Jornvall H., Ramaekers F.C., Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis, *Exp Cell Res* (2004); 297: 11–26.
- Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. A., & Pantel, K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(3). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.5>
- Seeger R, Stijve T. Amanitin content and toxicity of *Amantia verna* Bull. Z Naturforsch C 1979 May-Jun;34C(5-6):330-333
- Sekeris C E, Schmid W. Action of  $\alpha$ -amanitin in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 1972 Oct 15; 27(1): 41-45
- Sen CK. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *J Nutr Biochem* 8; 1997
- Sen, G. L., & Blau, H. M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology*, 7(6). <https://doi.org/10.1038/ncb1265>
- Sgambelluri RM, Epis S, Sasser S et al. Profiling of amatoxins and phallotoxins in the genus *Lepiota* by liquid chromatography combined with UV absorbance and mass spectrometry, *Toxins (Basel)*. (2014). <https://doi.org/10.3390/toxins6082336>.
- Shannon MW, Haddad LM. The emergency management of poisoning. In: Haddad LM, Shannon MW, Winchester JF (eds): *Clinical management of poisoning and drug overdose* (3rd ed). WB Saunders Company, Philadelphia PA, 1998, pp. 2-31
- Sheen C.L., Dillon J.F., Bateman D.N., Simpson K.J., Macdonald T.M., Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system, *Q J Med* (2002); 95: 609–619.
- Skenderi K.P., Kavouras S.A., Anastasiou C.A., Yiannakouris N., Matalas A.L., Exertional rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race, *Med Sci Sports Exerc* (2006); 38: 1054-1057.
- Smilkstein M.J., Knapp G.L., Kulig K.W., Rumack B.H., Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the National Multicenter Study (1976 to 1985), *N Engl J Med* (1988); 319: 1557–1562.
- Sotaniemi AE, Arranto AJ, Pelkonen O, & Pasanen M. (1997). *Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: An analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions*.
- Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988 Apr; 63(4): 381-389
- Speeg K.V. Jr, Mitchell M.C., Maldonado A.L., Additive protection of cimetidine and N-acetylcysteine treatment against acetaminophen-induced hepatic necrosis in the rat, *J Pharmacol Exp Ther* (1985); 234: 550-554.

- Staack RF, Maurer HH. New Bühlmann ELISA for determination of Amanitins in urine. Are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites? 2002, in press
- Starkey Lewis, P. J., Dear, J., Platt, V., Simpson, K. J., Craig, D. G. N., Antoine, D. J., French, N. S., Dhaun, N., Webb, D. J., Costello, E. M., Neoptolemos, J. P., Moggs, J., Goldring, C. E., & Park, B. K. (2011). Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*, 54(5).  
<https://doi.org/10.1002/hep.24538>
- Stijve T, Seeger T. Determination of alpha-, beta-, and gamma-amanitin by high performance thin-layer chromatography in *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) secr. from various origin. *Z Naturforsch C* 1979 Dec; 34(12): 1133-1138
- Stirpe F, Fiume L. Effect of alpha-amanitin on ribonucleic acid sintesi and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver. *Biochem J*; 1967
- Streeter A.J., Dahlin D.C., Nelson S.D., Baillie T.A., The covalent binding of acetaminophen to protein. Evidence for cysteine residues as major sites of arylation in vitro, *Chem Biol Interact* (1984); 48: 349–366.
- Suzuki A., Yuen N., Walsh J., Co-mediations that modulate liver injury and repair influence clinical outcome of acetaminophen-associated liver injury. *Clin Gastroenterol Hepatol*, (2009); 7: 882–888.
- Szabo G., Shashi Bala S., MicroRNAs in liver disease, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2013); 10(9): 542–552.
- Tanahashi M, Kaneko R, Hirata Y, M. Hamajima, T. Arinobu, T. Ogawa, A.Ishii, Simple analysis of  $\alpha$ -amanitin and  $\beta$ -amanitin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry, *Forensic Toxicol.* (2010).  
<https://doi.org/10.1007/s11419-010-0098-6>.
- Tang, G., Tang, X., Mendu, V., et al. (2008). The art of microRNA: Various strategies leading to gene silencing via an ancient pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(11).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.06.006>
- Tata JR, Hamilton MJ, Shields D.Effects of alpha-amanitin in vivo on RNA polymerase and nuclear RNA synthesis. *Nat New Biol* 1972 Aug 9; 238(84): 161-164
- Thanacoody H.K.R., Gray A., Dear J.W., Coyle J., Sandilands E.A., Webb D.J., Lewis S., Eddleston M., Thomas S.H.L., Bateman N.D., Scottish and Newcastle Antiemetic Pre-treatment for paracetamol poisoning study (SNAP), *BMC Pharmacology and Toxicology* (2013); 4: 14:20.
- Tittarelli R., Pellegrini M., Scarpellini M.G., Marinelli E., Bruti V., Di Luca N.M., Busardò F.P., Zaami S., Hepatotoxicity of paracetamol and related fatalities, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2017); 21 (1): 95-101.
- Tomková J, Ondra P, Válka I, Simultaneous determination of mushroom toxins  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* (2015).  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.007>.
- TOXBASE® <https://www.toxbase.org/> , 1983-2017.

- Tsai W.C., Hsu S.D., Hsu C.S., Lai T.C., Chen S.J., Shen R., Huang Y., Chen H.C., Lee C.H., Tsai T.F., Hsu M.T., Wu J.C., Huang H.D., Shiao M.S., Hsiao M., Tsou A.P., MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis, *J Clin Invest* (2012); 122: 2884–2897.
- Tsang, J., Zhu, J., & van Oudenaarden, A. (2007). MicroRNA-Mediated Feedback and Feedforward Loops Are Recurrent Network Motifs in Mammals. *Molecular Cell*, 26(5).  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.018>
- Vercellone A, Piccoli G, Ragni R, Cavalli PL, Varese D, Zuccaro G. Mushroom nephropathy. *Minerva Nefrol* 1968 Jan-Apr; 15(1): 31-48
- Vesconi S, Langer M, Costantino D. Mushroom poisoning and forced diuresis. *Lancet* 1980 Oct 18;2(8199):854-854
- Vesconi S, Langer M, Iachipino G, Costantino D, Busi C, Fiume L. Therapy of cytotoxic mushroom intoxication. *Crit Care Med* 1985 May; 13(5): 402-406
- Vetter J, Toxins of Amanita phalloides. *Toxicon* 1998, 36:13-24
- Vijayaraj P., Sohl G., Magin T.M., Keratin transgenic and knockout mice: functional analysis and validation of disease-causing mutations, *Methods Mol Biol* (2007); 360: 203–251.
- Vliegenthart A.D., Antoine D.J., Dear J.W., Target biomarker profile for the clinical management of paracetamol overdose, *Br J Clin Pharmacol* (2015); 80: 351–362.
- Vliegenthart, A. D.Bastiaan, Berends, C., Potter, C. M. J., Kersaudy-Kerhoas, M., & Dear, J. W. (2017). MicroRNA-122 can be measured in capillary blood which facilitates point-of-care testing for drug-induced liver injury. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(9), 2027–2033. <https://doi.org/10.1111/bcp.13282>
- Vliegenthart, Adriaan D.B., Starkey Lewis, P., Tucker, C. S., del Pozo, J., Rider, S., Antoine, D. J., Dubost, V., Westphal, M., Moulin, P., Bailey, M. A., Moggs, J. G., Goldring, C. E., Park, B. K., & Dear, J. W. (2014). Retro-Orbital Blood Acquisition Facilitates Circulating microRNA Measurement in Zebrafish with Paracetamol Hepatotoxicity. *Zebrafish*, 11(3). <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0912>
- Vujović M, Ilić I, Kilibarda V, Determination of mushroom toxin alpha amanitin in serum by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction, *Acta Medica Median.* (2015).  
<https://doi.org/10.5633/amm.2015.0102>.
- Wallace C.I., Dargan P.I., Jones A.L., Paracetamol overdose: an evidence based flowchart to guide management, *Emerg Med J* (2002); 19: 202–205.
- Walls L., Baker C.F., Sarkar S., Acetaminophen-induced hepatic failure with encephalopathy in a newborn, *J Perinatol* (2007); 27: 133-135.
- Wang X.L., Sun R., Wei H., Tian Z., High-mobility group box 1 (HMGB1)-Toll-like receptor (TLR)4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of  $\gamma\delta$  T cells with macrophages, *Hepatology* (2013); 57(1): 373-384.

- Wang Y., Tang N., Hui T., Wang S., Zeng X., Li H., Ma J., Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR analysis of plasma microRNAs levels in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity, *J Appl Toxicol* (2013); 33(11): 1330-1336.
- Wang, D., Lu, M., Miao, J., Li, T., Wang, E., & Cui, Q. (2009). Cepred: Predicting the Co-Expression Patterns of the Human Intronic microRNAs with Their Host Genes. *PLoS ONE*, 4(2).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004421>
- Wieland T, Buku A. Ueber die Inhaltstoffe des grünen Knollenblätterpilzes. XXXVIII, Konstitution des  $\alpha$ -Amanitina und Amanullina. *Justus Liebigs Ann Chem* 1968; 717: 215-220
- Wieland T, Gebert U. Ueber die Inhalstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, XXX, Die Strukturen der Amanitins. *Justus Liebigs Ann Chem* 1966 Dec; 700: 157-173
- Wieland T. Peptides of Amanita phalloides. *Pure Appl Chem* 1964; 9: 145-157
- Wieland T. Structure and mode of action of the amatoxins. *Naturwissenschaften* 1972 Jun;59(6):225-231
- Wieland T. The toxic peptides of Amanita phalloides. *Fortschr Chem Org Naturst* 1967;25:214-250
- Wieland TH, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: The biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. *CRC Crit Rev Biochem* 1978 Dec;5(3):185-260
- Wilkinson, G. R. (2005). *Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response*. [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
- Williams C.D., Antoine D.J., Shaw P.J., Benson C., Farhood A., Williams D.P., Kanneganti T.D., Park B.K., Jaeschke H., Role of the Nalp3 inflammasome in acetaminophen-induced sterile inflammation and liver injury, *Toxicol Appl Pharmacol* (2011); 252: 289–297.
- Wong L.T., Whitehouse L.W., Solomonraj G., Paul C.J., Effect of a concomitant single dose of ethanol on the hepatotoxicity and metabolism of acetaminophen in mice, *Toxicology* (1980); 17: 297-309.
- Wong S.G., Card J.W., Racz W.J., The role of mitochondrial injury in bromobenzene and furosemide induced hepatotoxicity, *Toxicol Lett* (2000); 116: 171–181.
- Yip L., Dart R.C., Hurlbut K.M., Intravenous administration of oral N-acetylcysteine, *Crit Care Med* (1998); 26: 40–43.
- Yu, H. W., & Cho, W. C. (2015). The role of microRNAs in toxicology. *Archives of Toxicology*, 89(3).  
<https://doi.org/10.1007/s00204-014-1440-2>
- Yuan X., Waterworth D., Perry J.R., Lim N., Song K., Chambers J.C., Population based genome wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes, *Am J Hum Genet* (2008); 83: 520–528.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., & Graves, P. R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochemical Journal*, 413(3). <https://doi.org/10.1042/BJ20080599>
- Zhang X, Liang S, Zhang Z, Chen Z. Determination of toxic peptides in Amanita virosa and Amanita verna. *Wei Sheng Yan Jiu* 1998 Nov 30; 27(6): 418-420

- Zhang Y., Jia Y., Zheng R., Guo Y., Wang Y., Guo H., Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases, *Clin Chem* (2010); 56: 1830-1838.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>
- Zhao L., Pickering G., Paracetamol metabolism and related genetic differences, *Drug Metab Rev* (2011); 43: 41–52.
- ZHAO, Y., & SRIVASTAVA, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(4). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.02.006>
- Zheleva A, Benov L, Zhelev Z. Amanitin-induced toxicity may involve free radicals. *Toxicon* 1990
- Zheleva A, Michelot D, Zhelev Z, Carpenter B, Dobрева Z. Reactivity of the tryptathionin moiety of alpha-amanitin and implication in the toxic process. *Toxicon* 1994
- Zheleva A, Michelot D, Zhelev ZD. Sensitivity of alpha-amanitin to oxydation by a lactoperoxidase-hydrogen peroxide system. *Toxicon* 2000 Aug; 38(8): 101055-63
- Zheleva A, Tolekova A, Zhelev M, Uzunova V, Platikanova M, Gadzheva V. Free radical reactions might contribute to severe alpha amanitin hepatotoxicity – A hypotesis. *Med Hypotheses* 2007;69(2):361-367. Epub 2007 Mar 2